

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РОССИЙСКИЙ ЦЕНТР СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(125284, Москва, ул. Поликарпова, д. 12/13)**



«Утверждаю»

Директор ФГБУ «РЦСМЭ»

Минздрава России

Главный внештатный специалист

по судебно-медицинской экспертизе

Минздрава России

доктор медицинских наук

А.В. Ковалев

«18» Октября 2019 г.

**Обнаружение и количественное определение летучих
токсичных веществ и гликолей в биологических объектах
методами газовой хроматографии и хромато-масс-
спектрометрии**

Информационное письмо

Москва, 2019

Авторы:

Савчук Сергей Александрович - главный научный сотрудник отдела специальных инновационных исследований ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России, доктор химических наук.

Ризванова Лилия Нажиповна – заведующая клинико-диагностической лабораторией БУ ХМАО-Югры «Нижевартовская психоневрологическая больница», биолог высшей квалификационной категории.

Франко Тальяро – профессор, заведующий кафедрой судебной медицины и токсикологии, заведующий отделением судебной медицины центрального клинического госпиталя «G.V. Rossi», директор PhD программы по Нанонаукам и Передовым технологиям, директор PhD школы общественного здоровья Университета Вероны (Италия).

Джакомо Музиле - PhD, научный сотрудник кафедры судебной медицины и токсикологии Университета Вероны (Италия).

Методы разработаны с участием специалистов:

ГБУЗ Псковской области «Наркологический диспансер Псковской области», заведующая химико-токсикологической лабораторией Никитина Наталья Михайловна;

ОГБУЗ «Бюро судебно-медицинской экспертизы Томской области», заведующая судебно-химическим отделением Пипина Елена Борисовна;

ГУЗ «Бюро судебно-медицинской экспертизы Саратовской области», заведующая судебно-химическим отделением Горина Оксана Сергеевна;

ГБУЗ Рязанской области «Бюро судебно – медицинской экспертизы», заведующая судебно-химическим отделением Мусинова Мария Александровна;

ГБУЗ ЯНАО «Новоуренгойский психоневрологический диспансер», заведующая химико-токсикологической лабораторией Самышкина Наталья Васильевна;

ГБУЗ ЯНАО «Нобрьский психоневрологический диспансер», заведующий химико-токсикологической лабораторией Айгумов Магомед Шапиевич;

БУ ХМАО-Югры «Сургутская клиническая психоневрологическая больница», заведующая клинико-диагностической лабораторией Майданец Ирина Владимировна.

Благодарность:

Авторы выражают глубокую благодарность и признательность главному внештатному специалисту по судебно-медицинской экспертизе Минздрава России, директору ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Минздрава России, профессору, доктору медицинских наук Андрею Валентиновичу Ковалеву за неоценимую помощь в выборе научного и методологического подхода к проблеме дифференциации прижизненного употребленного и постмортального новообразованного этанола в биологических объектах.

Оглавление

Введение.....	9
1. Методы хроматографического и хромато-масс-спектрометрического определения этанола и летучих токсичных веществ в биологических жидкостях.....	9
1.1 Термины и определения	9
1.2 Список сокращений	10
1.3 Показания и противопоказания к применению метода	10
1.4 Описание метода	11
1.5 Формула метода	13
1.6 Критерии выбора внутреннего стандарта для количественного определения этанола.....	13
1.7 Теоретические основы метода.....	14
1.7.1 Общие сведения о парофазном хроматографическом анализе.....	14
1.7.2 Физико-химические основы метода	14
1.7.3 Влияние экспериментальных факторов на чувствительность и точность количественного парофазного анализа	16
1.7.3.1 Влияние температуры	16
1.7.3.2 Влияние высаливающего агента [8, 9].....	17
1.7.3.3 Количественный парофазный анализ	17
1.7.3.4 Оценка возможностей метода Парофазного Анализа без Термостатирования для определения летучих веществ в биологических объектах	18
1.7.3.5 Метрологические характеристики определения летучих веществ методом Парофазного Анализа без Термостатирования [1].....	18
1.7.3.6 Исследование влияния температуры окружающей среды на правильность определения [1].....	18
1.7.3.7 Исследование влияния температуры пробы на чувствительность анализа [1].....	19
2. Объекты исследований для обнаружения и количественного определения летучих токсичных веществ и гликолей.....	20
2.1 Объекты исследований	20
2.2 Отбор и хранение проб	20
2.2.1 Кровь	20

2.2.2 Моча	21
2.2.3 Слюна	22
2.2.4 Внутриглазная жидкость.....	23
2.2.5 Волосы.....	23
2.2.6 Ногтевые пластины.....	23
2.2.7 Содержимое желудка.....	24
2.2.8 Органы и ткани трупа.....	24
2.3 Определение пригодности объекта к исследованию	25
2.3.1 Рекомендуемый алгоритм действий по определению пригодности объектов к исследованию на этанол и летучие токсичные вещества	25
2.3.2 Маркеры изменения биологических объектов в результате микробной активности	27
2.3.2.1 Снижение уровня глюкозы крови	27
2.3.2.2 Летучие маркеры брожения, выявляемые методами газовой хроматографии и хромато-масс-спектрометрии	28
3. Маркеры прижизненного употребления алкоголя	30
3.1 Ацетальдегид	300
3.2 Этилглюкуронид	31
3.2 Карбогидрат-дефицитный трансферрин (CDT).....	32
4. Суррогаты алкоголя и экспертная оценка результатов их идентификации в биологических объектах	32
4.1 Диагностика смертельных отравлений алкоголем и его суррогатами ...	33
4.2 Диагностика не смертельных отравлений алкоголем и его суррогатами	35
5. Метод Парофазного Анализа без Термостатирования	36
5.1 Сущность метода.....	36
5.2 Требования к рабочему месту.....	37
5.3 Аппаратура, материалы и реактивы.....	38
5.4 ГХ-МС метод Парофазного Анализа без Термостатирования для идентификации и количественного определения этанола и летучих токсичных соединений с хроматографической колонкой HP-FFAP.....	39
5.4.1 Приготовление градуировочных растворов.....	39

5.4.1.1 Приготовление градуировочных растворов (‰) содержащих этанол, метанол, ацетон, изопропанол. Калибровочные точки 0.3, 1.0, 3.0, 6.0 ‰.....	40
5.4.1.2. Приготовление градуировочных растворов (г/л), содержащих этанол, метанол, изопропанол, изобутанол, бутанол, ацетон. Калибровочные точки 0.3, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 г/л	40
5.4.2 Пробоподготовка	41
5.4.3 Аппаратура и условия хроматографирования	42
5.4.4 Результаты исследования.....	42
5.5 ГХ-МС определение компонентов технических жидкостей в биологических объектах методом прямого ввода с хроматографической колонкой HP-FFAP.....	51
5.5.1 Приготовление раствора внутреннего стандарта циклогексанола для количественного определения компонентов технических жидкостей, определяемых прямым вводом мочи (этиленгликоль, диэтиленгликоль и вещества близкие им по летучести)	51
5.5.2 Приготовление градуировочных растворов (хлорорганических соединений, ароматических летучих веществ, этиленгликоля, диэтиленгликоля, а также других веществ, близких им по летучести).....	51
5.5.2.1 Приготовление градуировочных растворов концентрациями 500 мкг/мл.....	51
5.5.2.2 Приготовление градуировочных растворов концентрациями 50 мкг/мл.....	51
5.5.2.3 Приготовление градуировочных растворов концентрациями 5 мкг/мл.....	52
5.5.3 Подготовка проб мочи для определения малолетучих соединений (гликолей) и ввод внутреннего стандарта.....	52
5.5.4 Аппаратура и условия хроматографирования	52
5.5.5 Результаты исследования.....	53
5.6 ГХ-МС метод для идентификации и количественного определения летучих токсичных соединений с колонкой HP-5MS	57
5.6.1 Приготовление градуировочных растворов.....	57
5.6.2 Пробоподготовка	57
5.6.3 Аппаратура и условия хроматографирования	57
5.6.4 Результаты исследования.....	58

5.7 ГХ-ДИП метод обнаружения и количественного определения этанола и других летучих веществ с колонкой HP-FFAP	59
5.7.1 Приготовление градуировочных растворов.....	59
5.7.2 Пробоподготовка	59
5.7.3 Аппаратура и условия хроматографирования	59
5.7.4 Результаты исследования.....	59
5.8 ГХ-ДИП метод определения этанола и других летучих веществ, обнаружение компонентов «газа для зажигалок» и газов-пропеллентов дезодорантов: пропана, изобутана, бутана с колонкой HP-B ALC.....	60
5.8.1 Приготовление градуировочных растворов.....	60
5.8.2 Пробоподготовка	60
5.8.3 Аппаратура и условия хроматографирования	60
5.8.4 Результаты исследований.....	60
5.9 Эффективность использования метода Парофазного Анализа без Термостатирования.....	65
5.9.1. Оперативный контроль качества измерений.....	65
5.9.2. Достоверность метода.....	65
6. Методы определения этилглюкуронида – прямого метаболита этанола..	66
6.1 Предварительное выявление этилглюкуронида иммунохроматографическим методом	67
6.2 Определение этилглюкуронида методом ВЭЖХ-МС/МС	69
6.2.1 Пробоподготовка	69
6.2.1.1 Подготовка проб крови для определения этилглюкуронида	69
6.2.1.2 Подготовка проб мочи для определения этилглюкуронида	69
6.2.1.3 Подготовка проб волос и ногтевых пластин.....	69
6.2.2 Аппаратура ВЭЖХ-МС/МС и условия хроматографирования и масс-спектрометрического детектирования.....	69
6.2.2.1 Метод ВЭЖХ-МС/МС с масс-селективными детекторами ионная ловушка и тройной квадруполь в изократическом режиме элюирования	69
6.2.2.2 Метод ВЭЖХ-МС/МС с масс-селективным детектором тройной квадруполь в градиентном режиме элюирования	70

6.2.2.3 Метод ВЭЖХ-МС/МС с масс-селективным детектором высокого разрешения в градиентном режиме элюирования.....	71
6.2.3 Результаты исследований.....	72
7. Карбогидрат-дефицитный трансферрин.....	81
7.1 Реагенты	83
7.2 Аппаратура и условия хроматографирования	83
7.3 Пробоподготовка.....	84
7.4 Результаты исследований.....	85
8. ГХ-МС метод определения гамма-гидроксибутирата (ГНВ) в биологических образцах.....	86
8.1 Пробоподготовка.....	87
8.2 Аппаратура и условия хроматографирования	87
8.3. Результаты исследований.....	88
Список литературы	93

Введение

Информационное письмо предназначено для специалистов в области судебно-химического и химико-токсикологического анализа.

Цель: предоставить специалистам комплексную методику хроматографического и хромато-масс-спектрометрического анализа по определению алкоголя, его прямого метаболита/маркера этилглюкуронида, непрямого маркера карбогидрат-дефицитного трансферрина (CDT), некоторых летучих ядов и нелетучих низкомолекулярных токсичных веществ (компонентов антифризов, других технических жидкостей, оксибутирата) в биологических объектах и биологических жидкостях организма человека.

Информационное письмо содержит разделы, посвященные исследованию биологических объектов: кровь цельная или гемолизированная от живых лиц и трупов; моча от живых лиц и трупов; слюна; внутриглазная жидкость трупа; содержимое желудка; органы и ткани трупа; волосы, срезы краев ногтевых пластин от живых лиц и трупов, или сами ногтевые пластины с пальцев рук и ног от трупов.

Представлены критерии определения пригодности биообъектов к исследованию на алкоголь. Также впервые представлен метод определения карбогидрат-дефицитного трансферрина в цельной и гемолизированной крови.

Предлагаемая к рассмотрению методика является переработанной и дополненной версией методического пособия «Обнаружение и количественное определение летучих токсичных веществ и гликолей в биологических объектах методами газовой хроматографии и хромато-масс-спектрометрии», утвержденного ММА им. И.М.Сеченова в 2003 году.

1. Методы хроматографического и хромато-масс-спектрометрического определения этанола и летучих токсичных веществ в биологических жидкостях

1.1 Термины и определения

Газовая экстракция – извлечение газом летучих веществ из конденсированной фазы.

Анализ равновесной паровой фазы (Парофазный анализ, Head Space Analysis) – совокупность методов и технических приемов получения информации о природе, составе или состоянии жидких и твердых тел путем анализа контактирующей с ними газовой фазы. Подразделяется на статический и динамический парофазный анализ.

Анализ равновесной паровой фазы без термостатирования – парофазный анализ при котором равновесная газовая фаза отбирается в

газоплотный шприц при температуре окружающей среды и вводится в хроматограф в автоматическом режиме.

1.2 Список сокращений

AMDIS	Automated Deconvolution and Identification System (Система автоматической масс-спектрометрической деконволюции и идентификации)
CDT	карбогидрат-дефицитный трансферрин
EtG	этилглюкуронид
GHB	гамма-гидроксибутират
RI	индекс удерживания или индекс Ковача. Позволяет рассчитать время удерживания вещества в отсутствие стандартных образцов
RT	время хроматографического удерживания (Retention Time)
SCAN	режим полного сканирования
SIM	режим селективной регистрации по выбранным ионам (Simultaneous Ion Monitoring)
BC	внутренний стандарт
ВЭЖХ-МС/МС	гибридный метод анализа, основанный на сочетании двух аналитических методов: градиентной высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии
ГХ-ДИП	метод анализа, основанный на газовой хроматографии с детектором ионизации пламени
ГХ-МС	гибридный метод анализа, основанный на сочетании двух аналитических методов: капиллярной газовой хроматографии и масс-спектрометрии
ИХА	иммуно-хроматографический анализ
ЖЖЭ	жидкость-жидкостная экстракция
СКО	среднеквадратическое отклонение
СХА	судебно-химический анализ
ХТИ	химико-токсикологическое исследование
ФВУ (RTL)	фиксация времён удерживания (Retention Time Locking)

1.3 Показания и противопоказания к применению метода

Показания:

- диагностика факта употребления алкоголя и степени опьянения;
- диагностика отравления летучими токсичными веществами и нелетучими низкомолекулярными токсичными веществами (компонентами антифризов, моторных и ракетных топлив, оксибутиратом).

Противопоказания: отсутствуют

1.4 Описание метода

Настоящая методика с использованием газохроматографического метода с пламенно-ионизационным (ГХ-ДИП) и масс-селективным (ГХ-МС) детектированием позволяет определять этанол, сопутствующие ему вещества, компоненты технических жидкостей в крови, моче, слюне и других биологических объектах. Диагностика факта употребления алкоголя, алкогольного опьянения или отравления летучими токсичными веществами (растворителями) производится хроматографическим или хромато-масс-спектрометрическим методом путем анализа равновесной паровой фазы при температуре окружающей среды, диагностика отравлений нелетучими низкомолекулярными веществами (гликоли, компоненты антифризов) производится прямым вводом биожидкости в хроматограф после соответствующей пробоподготовки.

Метод газовой хроматографии основан на принципах разделения веществ на хроматографической колонке, внутренняя поверхность которой покрыта слоем неподвижной фазы - вязкотекучей жидкости. Процесс хроматографического разделения основан на различном сродстве веществ - компонентов пробы к неподвижной фазе. Компоненты анализируемой пробы перемещаются по колонке в потоке газа-носителя гелия или азота, аналитическим параметром является время выхода вещества из колонки (время хроматографического удерживания). При выходе из хроматографической колонки вещества (в виде узких зон) попадают в детектирующую систему и формируют аналитический сигнал - хроматографический пик. В неселективном пламенно-ионизационном детекторе молекулы вещества сгорают в водородно-воздушном пламени, ионизируются, при этом повышается электрическая проводимость пламени, которая регистрируется как аналитический сигнал. В селективном квадрупольном масс-спектрометрическом детекторе (способном идентифицировать несколько веществ, элюирующихся одним хроматографическим пиком) молекулы вещества попадают в вакуумную камеру, ионизируются электронами с энергией 70 эВ. Образовавшиеся ионы фокусируются системой электромагнитных линз и направляются в анализатор - квадрупольный фильтр масс, где под действием электромагнитного поля происходит их разделение и регистрация по отношению массы к заряду (m/z). Набор ионов, образующихся при ионизации детектируемого вещества, регистрируется в виде масс-спектра - структурной характеристики присущей только этому веществу. По сравнению с УФ и ИК спектрами масс-спектр является наиболее характеристическим структурным параметром. Хромато-масс-спектрометрические приборы оснащаются библиотеками масс-спектров, содержащих до 500 тысяч масс-спектров. Идентификация компонентов исследуемой пробы может выполняться по совпадению библиотечного и

полученного при анализе масс-спектра (обзорный анализ неизвестной пробы) или при совпадении масс-спектра и времени хроматографического удерживания определяемого вещества и вещества сравнения - компонента градуировочной смеси (направленный анализ). Масс-спектрометрическое детектирование выполняется в режиме полного сканирования (SCAN), при этом регистрируются масс-спектры, по которым проводится идентификация по библиотеке масс-спектров. Для более чувствительного анализа используют режим селективной регистрации по выбранным ионам (SIM, Селективный Ионный Мониторинг) при этом идентификация вещества выполняется по времени удерживания и отношению интенсивностей регистрируемых ионов.

При ГХ-ДИП и ГХ-МС анализе для идентификации компонентов используют программу Фиксации Времен Удерживания (ФВУ), включающую библиотеку времен удерживания и масс-спектров определяемых веществ. Программа ФВУ позволяет регулировать параметры хроматографического анализа таким образом, что времена удерживания исследуемых соединений остаются неизменными при замене хроматографической колонки, а также при использовании этой методики на аналогичном оборудовании в другой лаборатории. Программа ФВУ позволяет унифицировать процедуры анализа в различных лабораториях.

Для обнаружения и количественного определения летучих токсичных веществ в биологических объектах разработан новый вариант парофазного анализа: Анализ Равновесной Паровой Фазы Без Термостатирования, который позволяет получать результаты с повышенной воспроизводимостью и отсутствием ложноположительных результатов.

В отличие от традиционного метода парофазного анализа, для которого используют статический парофазный пробоотборник (стоимость которого составляет до половины от стоимости хроматографа) с необходимостью термостатирования как флакона с исследуемой пробой, так и прогрева всех транспортных коммуникаций для предотвращения сорбции определяемых компонентов, для методики Анализа Равновесной Паровой Фазы Без Термостатирования используют стандартный автоинжектор, в котором обычный хроматографический шприц заменяют на газоплотный. Анализ проводят в стандартных флаконах вместимостью 2 мл. Флаконы герметично укупоривают стандартными крышками с тефлонированной мембраной. Отсутствие системы коммуникаций (от пробоотборника к хроматографу) позволяет вводить пробу в инжектор хроматографа без потерь и получать улучшенные метрологические характеристики. Проверено, что методика анализа Равновесной Паровой Фазы Без Термостатирования работает воспроизводимо в температурном диапазоне помещения лаборатории от +15°C до +35°C. Сравнивали чувствительность определения методик анализа равновесной паровой фазы без термостатирования и анализа равновесной паровой фазы с термостатированием. При нагреве вials с

пробой до 80°C чувствительность определения (в варианте ГХ-ДИП) по этанолу и 1,2-дихлорэтану увеличивалась в 1,5 раза. Применение хромато-масс-спектрометрического детектирования в сочетании с методикой анализа Равновесной Паровой Фазы Без Термостатирования позволило повысить чувствительность определения по 1,2-дихлорэтану в 340 раз по сравнению с пламенно-ионизационным детектированием.

Исследование влияния температурных факторов и оценка метрологических параметров методики анализа Равновесной Паровой Фазы Без Термостатирования даны в публикациях [1, 2, 3, 4]. Традиционные методы парофазного пробоотбора и многокомпонентного хроматографического анализа описаны в работах [5, 6, 7, 8, 9], принципы метода фиксации времен удерживания в сочетании с приемами Образцовой Лабораторной Практики даны в работах [2, 10, 11, 12].

1.5 Формула метода

Методика Анализа Равновесной Паровой Фазы без Термостатирования от существующих методик парофазного анализа отличается следующим. По разработанной методике алкоголь в биологических объектах определяют без предварительного получения алкилнитритных производных, что делает анализ более воспроизводимым (отсутствует составляющая погрешности, связанная с возможной неполнотой дериватизации). Также отсутствует необходимость работы с токсичными дериватизирующими агентами. От существующих методик парофазного пробоотбора настоящая методика отличается тем, что не требует дорогостоящего статического парофазного пробоотборника, вместо которого используют стандартный автоинжектор с газоплотным шприцем, что позволяет улучшить воспроизводимость и предотвратить получение ложноположительных и ложноотрицательных результатов за счет минимизации геометрических размеров пробоотборника и исключения сорбционных потерь определяемых веществ. В отличие от существующих, разработанная методика базируется на новых принципах хроматографического анализа - программе Фиксации Времени Удерживания, которая позволяет стандартизировать методику по условиям анализа и получать одинаковые времена удерживания в каждой из лабораторий. В отличие от существующих, разработанная методика позволяет применять для идентификации и количественного анализа масс-селективный детектор, что повышает чувствительность анализа и надежность идентификации.

1.6 Критерии выбора внутреннего стандарта для количественного определения этанола

В качестве внутреннего стандарта при определении алкоголя в биологических объектах используют пропанол-1, а не изопропанол, что

повышает надежность анализа. (Примечание: до 20% изопропанола в водных растворах окисляется до ацетона в течение 3-х дней даже при хранении раствора в холодильнике). Следует отметить, что пропанол-1 является одним из маркеров новообразования этанола вследствие микробной активности при ненадлежащем отборе и хранении проб крови, органов и тканей. Для выявления пропанола-1 в объектах от трупа (или от живых лиц при хранении проб до анализа) предварительно выполняют качественный анализ без добавления внутреннего стандарта пропанола-1. После этого выполняют количественный анализ с добавлением внутреннего стандарта пропанола-1. Следует отметить, что отсутствие пропанола-1 в биологическом объекте не позволяет сделать однозначный вывод об отсутствии микробной активности в биологическом объекте, поскольку пропанол-1 является только одним из маркеров подобной активности. Полный набор маркеров микробной активности (брожения) и метод их определения даны ниже.

1.7 Теоретические основы метода

1.7.1 Общие сведения о парофазном хроматографическом анализе

Парофазный хроматографический анализ основан на сочетании газовой экстракции (ее разнообразных статических и динамических вариантов с хроматографией. Теоретические основы метода изложены в классических монографиях [5, 6] и обзоре [7].

1.7.2 Физико-химические основы метода

Необходимым требованием равновесного распределения вещества между сосуществующими фазами является равенство химических потенциалов μ каждого i -го компонента в каждой из равновесных фаз:

$$\mu_1^i = \mu_2^i = \dots = \mu_n^i$$

Так как химический потенциал компонента i (с молярной долей x^i и коэффициента активности γ^i) в данной фазе является функцией его активности ($x^i\gamma^i$)

$$\mu^i = \mu_0 + RT \ln(x^i\gamma^i),$$

то для системы конденсированная фаза-газ можно записать:

$$\ln \frac{x_L^i \gamma_L^i}{x_G^i \gamma_G^i} X_{ст} = \frac{\mu_{0G}^i - \mu_{0L}^i}{RT} = \frac{A^i}{RT} \quad (1)$$

где индекс "L" обозначает параметры конденсированной фазы, а индекс "G" - газовой фазы; μ_0 - стандартное значение химического потенциала; T - температура; R - универсальная газовая постоянная.

Записанная в правой части уравнения (1) разность стандартных значений химических потенциалов i -го компонента в газовой (μ_{0G}) и конденсированной (μ_{0L}) фазах (A^i) является постоянной величиной в изотермических условиях, при неизменных давлении и способе выбора стандартного состояния. Отношение активностей компонента в разных фазах также должно быть константой

$$K^i = \frac{x_L^i \gamma_L^i}{x_G^i \gamma_G^i}$$

Следовательно, отношение молярных долей i -го компонента в конденсированной и газовой фазах будет постоянным при неизменности коэффициентов активности. Однако, такой вывод правомерен исключительно при выполнении условия постоянства давления сосуществующих фаз, которое реализуется только при фиксированной молярной доле x_L^i . В практике парофазного анализа измерению подлежат различные составы растворов, для которых коэффициент распределения является функцией x_L^i . Поэтому для физико-химического описания основ парофазного анализа первостепенное значение имеет концентрационная зависимость коэффициента распределения. Показано [7], что числовое значение концентрационной зависимости K^i в идеальной системе из j -компонентов, независимо от способа выражения концентраций C_L и C_G , но одинакового для обеих фаз, подчиняется общему уравнению:

$$K^i = \frac{C_L^i}{C_G^i} = \sum a_{ij} \cdot C_L^j \quad (2)$$

Константы a_{ij} при разных способах выражения состава фаз имеют различные значения, определяемые физико-химическими свойствами компонентов. Согласно уравнению (2) независимо от способа выражения составов равновесных фаз коэффициент распределения каждого компонента является аддитивной величиной, включающей вклады от всех составляющих раствор компонентов. Постоянное, независимое от концентрации в растворе i -го компонента значение коэффициента распределения реализуется только при малых концентрациях C_L^i , когда их значения пренебрежимо малы в сравнении с концентрацией растворителя и других компонентов. В неидеальных системах форма концентрационной зависимости коэффициентов распределения, определяемая уравнением (2), сохраняется в достаточно широком для практических целей интервале концентраций ($x_L^i=0,6-0,7$ [7]), но значения констант a_{ij} отличаются от идеальных и

приобретают смысл эмпирических постоянных, измеряемых экспериментально.

Таким образом, закон распределения, выраженный через молекулярные доли распределяемого компонента

$$K_i = \frac{x_L^i}{x_G^i} \quad (3)$$

без концентрационных ограничений применим только к предельно разбавленным растворам, т.е. при $\gamma^i = \text{const}$. В случае реальных растворов коэффициент K^i функционально связан с величиной x_L^i , и во избежание серьезных погрешностей, имеющих систематический характер, эту зависимость следует учитывать при анализе равновесного пара. Закон распределения (3) применительно к разбавленным растворам можно преобразовать в соотношение:

$$K^i = \frac{C_L}{C_G} \quad (4)$$

Здесь равновесные концентрации распределяемого вещества C_L и C_G могут быть представлены в любых удобных для расчета единицах. Поскольку коэффициент распределения зависит от способа выражения концентраций, то в парофазном анализе C_L и C_G принято выражать в единицах массовой концентрации (мг/л, г/м³ и т.д.), так как эти единицы существенно упрощают расчеты, в которых не требуется использовать молекулярные массы или плотности жидких сред. Поэтому в парофазном анализе в основном используются безразмерные значения коэффициентов распределения, представляющие собой соотношение массовых концентраций.

Изложенные физико-химические основы метода касаются модели статического парофазного анализа.

1.7.3 Влияние экспериментальных факторов на чувствительность и точность количественного парофазного анализа

1.7.3.1 Влияние температуры

Чувствительность и точность парофазного анализа лимитируются прежде всего процессом газовой экстракции, который имеет ряд особенностей. В первую очередь это газообразное состояние экстрагента. В отличие от гетерогенных систем, включающих только конденсированные фазы, константа распределения вещества между конденсированной и газовой фазами очень чувствительна к температуре. Установлено [7], что для большинства органических веществ изменение температуры на 10 оС приводит к изменению значений коэффициента распределения на 3- 8%. При анализе водных растворов повышение температуры на 60°С может привести

к увеличению чувствительности в 10-20 раз [7].

Другой важный аспект влияния температуры заключается в термостатировании пробы, т.е. позволяет проводить анализ в стандартных условиях, что обеспечивает приемлемую погрешность определения.

1.7.3.2 Влияние высаливающего агента [8, 9]

Чувствительность парофазного анализа можно повысить добавлением в анализируемую пробу высаливающего агента.

Высаливание - выделение определяемого вещества из раствора в другую фазу (газовую) путем введения в раствор другого вещества - высаливателя, как правило хорошо растворимого в фазе из которой проводят высаливание. В случае газовой экстракции имеет место высаливание веществ неэлектролитов под действием веществ электролитов из водных растворов, к которым можно отнести и биологические жидкости. К наиболее часто используемым высаливающим агентам при анализе биологических объектов на летучие вещества можно отнести сульфаты аммония и натрия, а также хлорид натрия. Процесс высаливания малорастворимых неэлектролитов под действием электролитов при невысоких концентрациях высаливающего агента описывается эмпирическим уравнением Сеченова:

$$\log C^0/C = K_S C_S,$$

где C^0 и C - растворимость (в моль/л) неэлектролита соответственно в чистом растворителе (в нашем случае в водной фазе) и в растворе соли с концентрацией C_S (в моль/л), K_S - коэффициент высаливания (коэффициент Сеченова). Процесс высаливания также хорошо описывается модифицированным уравнением Дебая:

$$C^0/C = 1 - K_D C_S + A C_S^{4/3}$$

где K_D и A постоянные коэффициенты. Это уравнение основано на представлении о том, что молекулы высаливаемого неэлектролита электростатически выталкиваются из околоионных областей более полярными молекулами растворителя.

1.7.3.3 Количественный парофазный анализ

Поскольку большинство объектов парофазного анализа представляет собой системы с неизвестными параметрами фазового распределения количественном парофазном анализе превалирует направление, реализующее методы газовой экстракции с частичным извлечением определяемого вещества из исследуемого объекта. Этот подход также справедлив и для определения летучих веществ в биологических жидкостях, поскольку из-за значительных колебаний минерального состава анализируемого объекта

игнорировать вариации коэффициента распределения K недопустимо, а использовать его постоянное значение для всех случаев невозможно. Поэтому в современном статическом парофазном анализе в настоящее время применяют подход, сочетающий однократную газовую экстракцию в замкнутом объеме с использованием градуировочной характеристики для получения количественных результатов.

1.7.3.4 Оценка возможностей метода Парофазного Анализа без Термостатирования для определения летучих веществ в биологических объектах

Анализ теоретических основ метода газовой экстракции в статических условиях показал, что основными факторами, влияющими на чувствительность и правильность анализа является термостатирование образца. В случае применения нового метода Парофазного Анализа без Термостатирования можно было ожидать резкого снижения чувствительности и повышения значений погрешности результатов при сравнении их с результатами анализа тех же проб методом парофазного анализа с термостатированием. Процесс влияния температуры на метрологические характеристики Парофазного Анализа без Термостатирования проведен в работе [1].

1.7.3.5 Метрологические характеристики определения летучих веществ методом Парофазного Анализа без Термостатирования [1]

Исследование проводили с использованием проб слюны с известным введенным содержанием определяемых компонентов: ацетона, метанола и этанола. Определяемые вещества вводили в пробы в концентрациях 0,02%, 0,05%, 0,1%. Согласно методике в пробы вводили внутренний стандарт - пропанол-1, во всех трех пробах его концентрация составляла 0,05%. Лимитирующей стадией, влияющей на погрешность определения является случайная погрешность, связанная с вариацией объема парогазовой пробы, введенной в колонку. Значения относительного стандартного квадратичного отклонения ($СКО_{отн}$) при обсчете результатов по методу внутреннего стандарта, не превышали 1,6% при анализе методом парофазного ввода пробы без термостатирования, при этом максимальное значение ($СКО_{отн}$) не должно превышать 5%.

1.7.3.6 Исследование влияния температуры окружающей среды на правильность определения [1]

Исследование влияния температуры окружающей среды на результаты парофазного анализа проводили с использованием образцов мочи с введенным содержанием компонентов 0,05% об. Виалы с пробой выдерживали 30 мин при различной температуре: +5°C (выдерживали в холодильнике), +15°C (в химическом стакане с проточной водопроводной

водой), +21°C (в помещении лаборатории). Температуру контролировали термометрами, которые помещали в те же условия, что и пробу. Результаты исследований показали, что в диапазоне температур от +5°C до +21°C погрешность анализа не превышает 1,6-5%.

Эффект «химической памяти» аналитической системы исследовали после ввода образцов с содержанием компонентов 0,1% об. Использовали две процедуры промывки шприца: «воздухом над водой» и воздухом лаборатории. Условия промывки - 5 прокачек шприца до анализа и 5 прокачек после анализа. Результаты анализа показали отсутствие эффекта памяти при использовании обеих процедур.

Следует отметить, что в сравнении с традиционным вариантом парофазного анализа с использованием статического парофазного пробоотборника с большими геометрическими размерами коммуникаций, предлагаемый вариант гораздо менее подвержен влиянию эффекта «химической памяти» от предыдущих проб, поскольку в конструкции отсутствуют системы трубопроводов, петель, кранов, на внутренних поверхностях которых могут сорбироваться вещества и переходить в прибор с парами последующей пробы.

1.7.3.7 Исследование влияния температуры пробы на чувствительность анализа [1]

Исследование влияния температуры окружающей среды на чувствительность анализа проводили с использованием образцов мочи с введенным содержанием компонентов 0,05% об. Пробы с одинаковым содержанием компонентов анализировали без Термостатирования и с предварительным нагревом до 80°C. Виалу с пробой помещали в нагревательное устройство, выдерживали 15 мин и переносили в автоинжектор для анализа. Сравнивали площади пиков соответствующих компонентов при анализе без нагрева и с предварительным нагревом виалы с пробой. Результаты показали, что нагрев пробы позволяет увеличить чувствительность анализа без перегрузки колонки в 8-10 раз. Однако, потери чувствительности варианта газовой экстракции без термостатирования успешно компенсировались чувствительностью используемых хроматографических детекторов. В случаях реальных исследований были получены сопоставимые результаты по идентификации 1,2-дихлорэтана, ацетона, толуола, метилэтил- и метилпропилкетонов в крови и моче токсикологических больных при сравнительном ГХ-ДИП анализе с использованием статического парофазного пробоотборника (с нагревом пробы до 80°C) в сравнении с отбором пробы газоплотным шприцем без термостатирования. При использовании масс-спектрометрического детектора чувствительность метода парофазного анализа без термостатирования пробы, оцененная по 1,2-дихлорэтану, увеличивается в 350 раз.

2. Объекты исследований для обнаружения и количественного определения летучих токсичных веществ и гликолей

2.1 Объекты исследований

В информационном письме представлены методики исследования следующих биологических объектов: кровь цельная или гемолизированная от живых лиц и трупа; моча от живых лиц и трупа; слюна; внутриглазная жидкость трупа; содержимое желудка; органы и ткани трупа; волосы, срезы краев ногтевых пластин от живых лиц и трупа, или сами ногтевые пластины с пальцев рук и ног от трупа.

2.2 Отбор и хранение проб

Отбор, оформление и хранение проб биологических объектов производят согласно действующим нормативным документам: в соответствии с п.73 приказа МЗСР РФ от 12.05.2010 № 346н [13] для судебно-химических и с приложением № 2 приказа МЗСР РФ от 27.01.2006г. № 40 [14] для химико-токсикологических исследований.

С целью предотвратить возможное новообразование этанола в результате микробиальной активности в период хранения и доставки образцов к месту проведения исследования, рекомендована консервация замораживанием [15] и добавлением консерванта NaF [15, 16, 17].

В соответствии с Приказом МЗ РФ от 12.05.2010 № 346н «Об утверждении порядка организации производства судебно-медицинских экспертиз в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации» [13], для определения этанола необходимо брать два объекта (кровь и мочу), а при невозможности взятия мочи берется мышечная ткань.

Учитывая важность дифференциальной диагностики прижизненно употребленного этанола от новообразованного (например, при повреждении трупа с возможностью бактериального загрязнения), авторы рекомендуют брать максимально возможный набор объектов от трупа (не менее трех), включая внутриглазную жидкость.

При исследовании легколетучих соединений, к которым относится этиловый спирт, исследования начинают в день поступления объектов.

2.2.1 Кровь

Взятие крови производят с соблюдением правил асептики, в две вакуумные пробирки с наполнителем: фторидом натрия/ЭДТА К2, объемом не менее 5,0 мл в каждой (например, IMPROVACUTER размером 13×100 мм, объемом 5,0 мл, кат. номер 673050112 или аналогичные). Содержимое флаконов необходимо сразу тщательно перемешать. Одна из пробирок –

анализируемый образец, вторая – контрольный образец. Пробирки маркируют в соответствии с действующим регламентом.

ВАЖНО! Для обработки рук персонала и рабочего стола, а также инъекционного поля категорически нельзя использовать спиртосодержащие дезинфицирующие средства.

От живых лиц кровь берут из поверхностной вены с помощью специальной двусторонней иглы для вакуумных пробирок, с соблюдением правил асептики.

Кровь трупа берут стерильным одноразовым шприцем из периферических венозных сосудов (бедренной, подвздошной вен) или пазух твердой оболочки головного мозга.

ВАЖНО! Недопустимо зачерпывать кровь для исследования из полостей тела или выдавливать ее из внутренних органов.

Если исследование не проводят сразу после взятия крови, пробы следует немедленно заморозить при температуре не выше -18°C во избежание новообразования этанола в результате микробиальной активности.

Предварительно замороженные образцы крови допускается транспортировать к месту исследования в сумке-холодильнике при температуре не выше $+4^{\circ}\text{C}$. При приемке проб фиксируют температуру в сумке-холодильнике.

Непосредственно перед проведением исследования анализируемый образец полностью размораживают при температуре от $+20^{\circ}\text{C}$ до $+25^{\circ}\text{C}$.

2.2.2 Моча

Моча является предпочтительным объектом исследования на этанол и этилглюкуронид, поскольку содержит меньшие, по сравнению с кровью и извлечениями из органов, содержания глюкозы, других сахаров и органических веществ, способных трансформироваться в этанол под действием бактерий. При этом, содержание этилглюкуронида в моче обычно на порядок превышает его содержание в крови.

Мочу отбирают в две одноразовые емкости из бесцветного прозрачного материала (стекло, полипропилен и т.д.) с герметично закрывающейся крышкой, в количестве не менее 30,0 мл в каждой: анализируемый образец и контрольный образец. Необходимо, чтобы объем воздуха над пробой в каждой емкости был минимальным (набрать доверху, «под пробку»). На каждые 10,0 мл мочи добавить 200 мг NaF в качестве консерванта.

Емкости маркируют в соответствии с действующим регламентом.

ВАЖНО! Сбор мочи от живых лиц производят в условиях, исключающих возможность замены или фальсификации биологического объекта. Рекомендуется предпринять следующие меры: перед сдачей анализа мочи обследуемому предложить снять верхнюю одежду, сдать личные вещи (кошелёк, кейс и другие) вымыть и высушить руки. Часто подменные образцы

хранятся на теле обследуемых в гибких контейнерах (презервативы, грелки и другие накладные емкости); в момент отбора пробы осуществлять прямое или косвенное наблюдение персоналом; обеспечить подкрашивание воды туалетного бачка; ограничить доступ обследуемого к воде, мылу, другим моющим и дезодорирующим средствам.

В течение первых 5 минут после сбора мочи от живых лиц, необходимо оценить показатели подлинности образца:

- температура должна быть в пределах 32,5–39,0°C (измеряется с помощью бесконтактного термометра);
- рН должен быть в пределах 4–8;
- относительная плотность в пределах 1,008-1,025;
- содержание креатинина в пределах 4,4-17,7 ммоль/л.

рН, относительную плотность и содержание креатинина определяют диагностическими тест-полосками для анализа мочи (например, «БиосенсорАН Уриреал-1рН», «БиосенсорАН Уриреал 1sg», «БиосенсорАН Уриреал-1сп», DiuH13-Cr или аналогичными).

Если исследование не проводят сразу после сбора мочи, пробы следует немедленно заморозить при температуре не выше –18°C.

Предварительно замороженные образцы мочи допускается транспортировать к месту исследования в сумке-холодильнике при температуре не выше +4°C. При приемке проб фиксируют температуру в сумке-холодильнике.

Непосредственно перед проведением исследования анализируемый образец полностью размораживают при температуре от +20°C до +25°C.

2.2.3 Слюна

Не менее двух стерильных ватных тампона помещают под язык обследуемого на 10 минут без стимуляции слюноотделения. После того как тампоны пропитаются слюной, их помещают в стерильные одноразовые шприцы объемом 10-20 мл и отжимают поршнем в чистые одноразовые пробирки с герметично закрывающейся пробкой: анализируемый образец и контрольный образец. На каждые 1,0 мл слюны добавляется 20 мг NaF в качестве консерванта.

Пробирки маркируют в соответствии с действующим регламентом.

Если исследование не производят сразу после изъятия, пробы замораживают при температуре не выше –18°C.

Предварительно замороженные образцы транспортируют к месту исследования в сумке-холодильнике при температуре не выше +4°C. При приемке проб фиксируют температуру в сумке-холодильнике.

Непосредственно перед проведением исследования анализируемый образец полностью размораживают при температуре от +20°C до +25°C.

2.2.4 Внутриглазная жидкость

Внутриглазная жидкость является предпочтительным объектом от трупa для определения этанола и этилглюкуронида, хорошо защищенным от действия бактерий, при отсутствии повреждений глазного яблока.

Материал отбирают стерильным одноразовым шприцем в две одноразовые емкости с герметично закрывающейся крышкой, в количестве не менее 5,0 мл в каждой: анализируемый образец и контрольный образец. Необходимо, чтобы объем воздуха над пробой в каждой емкости был минимальным. На каждые 5,0 мл объекта добавить 100 мг NaF в качестве консерванта.

Емкости маркируют в соответствии с действующим регламентом.

Если исследование не производят сразу после изъятия, пробы следует немедленно заморозить при температуре не выше -18°C .

Предварительно замороженные образцы допускается транспортировать к месту исследования в сумке-холодильнике при температуре не выше $+4^{\circ}\text{C}$. При приемке проб фиксируют температуру в сумке-холодильнике.

Непосредственно перед проведением исследования анализируемый образец полностью размораживают при температуре от $+20^{\circ}\text{C}$ до $+25^{\circ}\text{C}$.

2.2.5 Волосы

Необходимо отобрать не менее 300 мг волос. Волосы срезают как можно ближе к коже с трех участков волосистой части головы (с теменной, затылочной, височных областей), предварительно стянув круглой резинкой или связав нитью необходимое количество (пучки толщиной около 0,5 см). Только при невозможности отбора волос с волосистой части головы, волосы берут с подмышечных впадин или лобковой области.

Отобранные пробы делят на две равные части и помещают в конверты: анализируемый образец и контрольный образец.

Производят маркировку и опечатывание конвертов в соответствии с действующим регламентом.

Образцы хранят в холодильнике при температуре не выше $+4^{\circ}\text{C}$. Образцы допускается транспортировать к месту исследования при температуре до $+25^{\circ}\text{C}$.

2.2.6 Ногтевые пластины

Необходимо отобрать не менее 70 мг объекта по отдельности: ногтевые пластины с пальцев рук и с пальцев ног. Края ногтевых пластин обрезают и помещают в отдельные конверты.

Каждую отобранную пробу делят на две равные части: анализируемый образец и контрольный образец.

Производят маркировку и опечатывание конвертов в соответствии с действующим регламентом.

Образцы хранят в холодильнике при температуре не выше $+4^{\circ}\text{C}$. Образцы допускается транспортировать к месту исследования при температуре до $+25^{\circ}\text{C}$.

2.2.7 Содержимое желудка

Содержимое желудка отбирают в две одноразовые емкости с герметично закрывающейся крышкой, в количестве не менее 10,0 мл в каждой: анализируемый образец и контрольный образец. Необходимо, чтобы объем воздуха над пробой в каждой емкости был минимальным. На каждые 10,0 мл объекта добавить 200 мг NaF в качестве консерванта.

Емкости маркируют в соответствии с действующим регламентом.

Пробы следует немедленно поместить в морозильную камеру при температуре не выше -18°C .

Предварительно замороженные образцы допускается транспортировать к месту исследования в сумке-холодильнике при температуре не выше $+4^{\circ}\text{C}$. При приемке проб фиксируют температуру в сумке-холодильнике.

Непосредственно перед проведением исследования анализируемый образец полностью размораживают при температуре от $+20^{\circ}\text{C}$ до $+25^{\circ}\text{C}$.

2.2.8 Органы и ткани трупа

Каждый вид объекта отбирают в две одноразовые емкости с герметично закрывающейся крышкой, в количестве не менее 50,0 г в каждой: анализируемый образец и контрольный образец. Емкости необходимо подобрать такого объема, чтобы количество воздуха над пробой было минимальным. На каждые 10,0 г объекта насыпать 200 мг NaF в качестве консерванта.

ВАЖНО! Нельзя помещать образцы в консервирующую жидкость, так как целевые соединения могут элюироваться из объекта в консервант.

Емкости маркируют в соответствии с действующим регламентом.

Объекты необходимо немедленно заморозить при температуре не выше -18°C .

Предварительно замороженные объекты допускается транспортировать к месту исследования в сумке-холодильнике при температуре не выше $+4^{\circ}\text{C}$. При приемке проб фиксируют температуру в сумке-холодильнике.

Непосредственно перед проведением исследования объекты размораживают при температуре от $+20^{\circ}\text{C}$ до $+25^{\circ}\text{C}$. Для анализа используют межклеточную и внутриклеточную жидкость, образующуюся в результате лизиса после замораживания и размораживания образцов.

2.3 Определение пригодности объекта к исследованию

Имеются многочисленные данные о новообразовании этанола или о его деградации при ненадлежащем хранении биологических объектов. Например, при хранении крови в течение суток при комнатной температуре, концентрация новообразованного этанола может достигнуть 1,0 промилле [18]. Новообразование этанола при хранении мочи, собранной от живого обследуемого, даже в холодильнике может достигнуть 0,5 промилле, а при сахарном диабете – до 1,1 промилле [18].

Потери этанола и снижение его содержания в объекте могут происходить из-за испарения, например, при большом объеме воздуха во флаконе над образцом, или ввиду окисления кислородом крови и воздуха (присутствие консервантов не оказывает влияния) [18, 19].

Ошибки в процедуре сбора и оформления объектов исследования также могут стать причиной ложноположительных или ложноотрицательных результатов анализа. Важно знать и применять на практике критерии пригодности биологических объектов к исследованию на этанол и летучие яды.

При интерпретации результатов судебно-химических исследований следует учитывать, что возможны процессы микробного загрязнения до изъятия объектов от трупа (при наличии повреждений и возможности бактериального обсеменения, например, при нарушении целостности кожных покровов).

2.3.1 Рекомендуемый алгоритм действий по определению пригодности объектов к исследованию на этанол и летучие токсичные вещества

1. Объекты исследования принимают в упакованном и опечатанном виде. Изучают состояние упаковки (целость, наличие и характер ее нарушения). Выполняют визуальный осмотр доставленных объектов. Объекты должны быть достаточными по количеству для проведения исследования и возможного повторного анализа.

Упаковка должна содержать соответствующие пояснительные надписи и исключать возможность несанкционированного доступа к содержимому без ее повреждения [13, 14]. На каждой емкости с объектами должны быть этикетки с необходимыми записями, включая дату и время отбора/изъятия пробы. Емкости должны быть герметично укупорены, объем воздуха над биологическим объектом должен быть минимальным.

Образцы для исследования наличия этанола и летучих ядов должны быть направлены в лабораторию в сумке-холодильнике немедленно после изъятия. При невозможности немедленной доставки на исследование, должны быть заморожены и храниться при температуре не выше -18°C . Условия хранения отмечают в сопроводительной документации.

При несоблюдении условий хранения биологических объектов после отбора и при их транспортировке биологические объекты на химико-токсикологические исследования не принимаются [14].

При нарушении требований по отбору, укупорке и транспортировке крови, мочи и тканей объекты, направленные в судебно-химическое отделение, исследованию не подлежат [22].

2. При поступлении объектов в лабораторию в соответствующих журналах фиксируют дату и время доставки, а также дату и время начала исследований.

Контрольные образцы биологических объектов сразу же помещаются на хранение при температуре не выше -18°C . Анализируемые образцы биологических объектов хранятся до начала исследования при температуре не выше $+2^{\circ}\text{C}$ [14]. Объекты хранят в герметически закрытой посуде в условиях, исключающих их хищение, утрату, порчу или видоизменение [13].

Судебно-химическое исследование биологических образцов на наличие этанола и летучих ядов должно быть начато в день их поступления, учитывая возможность летучести и/или разложения целевых аналитов [13].

Предварительные химико-токсикологические исследования биологического материала, взятого от живых лиц при проведении медицинского освидетельствования на состояние опьянения должны быть выполнены не позднее 2 часов с момента отбора биологического объекта. Сроки проведения подтверждающих химико-токсикологических исследований не должны превышать трех рабочих дней с момента поступления пробы биологического объекта в лабораторию [20].

При оказании специализированной медицинской помощи взрослым и детям при токсическом действии алкоголя выполняют исследования уровня этанола, метанола в крови и в моче методом газо-жидкостной хроматографии в течение 2-х часов от момента поступления в стационар [21]. Обязательно одномоментное взятие крови и мочи, интервал не должен превышать 5 – 10 минут [19].

3. При необходимости дифференцировать прижизненно употребленный этанол от возможно новообразованного из сахаров (вследствие микробиальной активности), рекомендуется измерить уровень глюкозы в крови непосредственно перед началом исследования. Для определения уровня глюкозы в цельной крови и в гемолизированных образцах крови хорошо зарекомендовал себя экспрессный метод «сухой химии» (глюкометры с тест-полосками). Критерием пригодности образца для определения этанола (кроме случаев гипогликемического состояния) определен уровень не ниже 0,5 ммоль/л.

4. При необходимости убедиться в пригодности образца мочи, определяют физико-химические свойства (тест-полосками): рН мочи должна быть в пределах 4–8, относительная плотность в пределах 1,008-1,025.

Таблица 1

Интерпретация результатов определения в крови и в моче этанола, этилглюкуронида, летучих маркеров брожения, глюкозы

Объект	Этанол	EtG	Летучие маркеры брожения	Глюкоза, ммоль/л	Варианты интерпретации
Кровь	+	+	-	$\geq 0,5$	Прижизненное употребление этанола
Моча	+	+	-		
Кровь	+	-	-	$\geq 0,5$	С момента употребления алкоголя прошло менее 45 мин. Или: не исключена контаминация образцов этанолом
Моча	+	-	-		
Кровь	-	+	-	$\geq 0,5$	Время, прошедшее после употребления алкоголя, превышает время элиминации этанола из крови
Моча	+	+	-		
Кровь	-	+	-	$\geq 0,5$	Этанол вывелся из организма, но прошло недостаточно времени для полного выведения EtG. Или: испарение и окисление этанола в случае большого объема воздуха над образцом
Моча	-	+	-		
Кровь	+	+	+	$< 0,5$	Возможно завышение содержания этанола в крови за счет сбраживания глюкозы
Моча	+	+	-		
Кровь	+	-	+	$< 0,5$	Новообразование этанола при ненадлежащем отборе или хранении образца, а также при повреждении трупа с возможностью бактериального загрязнения
Моча	-	-	-		
Кровь	-	-	+	$< 0,5$	Достоверно установить факт употребления алкоголя не представляется возможным
Моча	+	-	-		

2.3.2 Маркеры изменения биологических объектов в результате микробной активности

2.3.2.1 Снижение уровня глюкозы крови

Уровень глюкозы в крови человека, не страдающего нарушениями углеводного обмена, может колебаться от 2,8 до 7,8 ммоль/л (в зависимости от возраста, приема пищи, физических нагрузок и т.д.) [16]. Известно, что брожение вследствие микробной активности может стать причиной

новообразования этанола в крови, при этом уровень глюкозы с течением времени будет снижаться как вследствие микробиальной, так и ферментативной активности.

При содержании глюкозы в крови ниже 0,5 ммоль/мл, следует принимать во внимание тот факт, что возможно новообразование этанола из сахаров крови вследствие микробиальной активности. В подобных случаях заключение о прижизненном употреблении алкоголя или иных жидкостей, содержащих этанол, выполняют на основании результатов определения этанола, летучих маркеров протеолиза и микробной активности (прежде всего метантиола, диметилсульфида и дисульфида, высших спиртов, включая пропанол-1, эфиров альдегидов, прежде всего ацетона, и летучих кислот, включая уксусную кислоту) и прямого метаболита/маркера употребления этанола - этилглюкуронида в крови, моче и извлечениях из органов и тканей.

Возможные варианты интерпретации результатов определения в крови и в моче этанола, этилглюкуронида, летучих маркеров брожения, глюкозы даны в таблице 1.

2.3.2.2 Летучие маркеры брожения, выявляемые методами газовой хроматографии и хромато-масс-спектрометрии

При ферментации биологического сахарсодержащего субстрата, в том числе крови и других биологических объектов, отобранных от трупа, в результате микробного брожения могут образоваться такие продукты, как этанол, его эфиры: лактат, пропионат, формиат, бутират, сукцинат, капронат, ацетат, спирты: н-бутанол, 2,3-бутандиол, ацетон, н-пропанол, 2-пропанол, а также CO₂ и H₂. Уксусная кислота может образоваться при участии уксуснокислых бактерий. Пропанол-1, 2-бутанол, 2-метилпропанол, и изоамиловый (триметилбутанол) спирты представляют собой продукты метаболизма дрожжей и обнаруживаются при их росте в сложных питательных растворах, содержащих аминокислоты [23]. Широко распространены в природе бактерии, образующие в процессе своей жизнедеятельности в значительном количестве ацетон и бутиловый спирт. Некоторые виды клостридий образуют бутанол как главный продукт брожения при небольшом количестве этанола, уксусной и масляной кислоты, но не ацетона.

Наиболее часто в крови и извлечениях из органов и тканей трупа, отобранных или хранившихся в ненадлежащих условиях, способствующих микробному загрязнению, методами газовой хроматографии и хромато-масс-спектрометрии обнаруживают следующие вещества:

Диметилсульфид и диметилдисульфид - могут быть продуктами спиртового брожения или деградации серосодержащих белков крови.

Метантиол - может быть продуктом деградации серосодержащих белков крови при микробном росте.

Ацетальдегид может являться как продуктом спиртового брожения - маркером микробного загрязнения образца, так и продуктом преобразования этанола в организме человека при жизни. Для проверки достоверности первой и второй гипотез проводят исследование образца крови на наличие этилглюкуронида – достоверного маркера прижизненного употребления алкоголя. Также ацетальдегид может содержаться в употребленных спиртных напитках (рис.1).

Этилацетат - возможный продукт взаимодействия этанола и уксусной кислоты, сопутствует продуктам спиртового брожения.

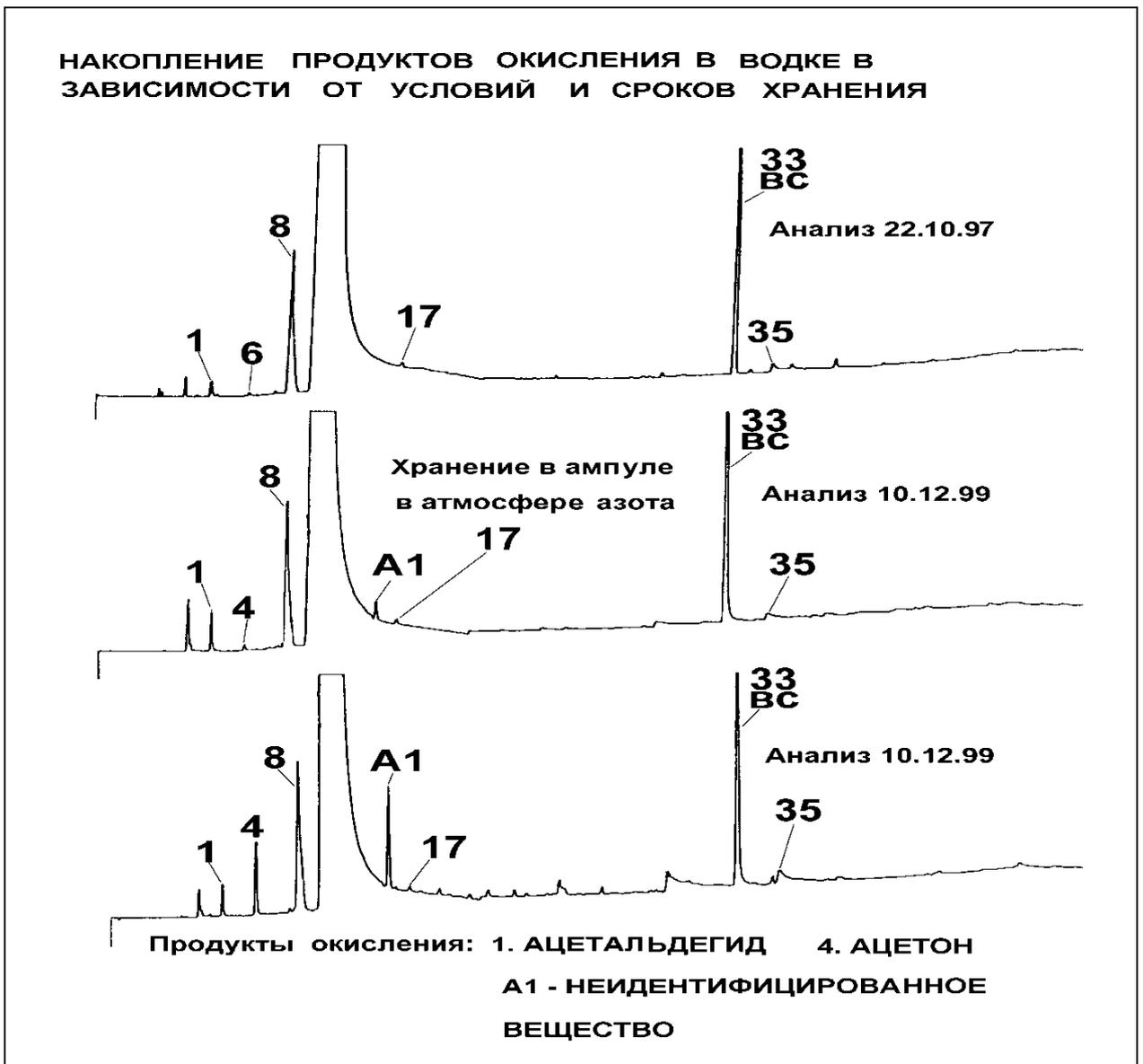


Рисунок 1. Хроматограммы образца водки на разных сроках и в разных условиях хранения. Верхняя хроматограмма: анализ перед хранением. Средняя хроматограмма после хранения в инертной атмосфере, нижняя: при хранении стеклянной бутылке укупоренной винтовой пробкой.

Ацетон - может образоваться в результате микробного брожения и часто сопутствует серосодержащим соединениям. Ацетон может содержаться в длительно хранившихся спиртных напитках как продукт окисления изопропанола (рис.1). Также может образоваться в организме как основной продукт метаболизма при употреблении изопропанола. В случаях отравлений химическими агентами, такими как 1,2-дихлорэтан, наряду с ацетоном в моче пациента обнаруживали метилэтилкетон, метилпропилкетон и метилизобутилкетон.

Повышенное содержание ацетона в биологических средах организма человека наблюдается также при диабетическом или голодном кетоацидозе, истощении, строгом ограничении углеводов [16].

Референтные пределы содержания ацетона в крови – менее 0,2 мг/дл, в моче – менее 0,3 мг/дл. При кетоацидозе значение в крови нарастает до 10 – 70 мг/дл. Токсичной считается концентрация в крови, превышающая 20 мг/дл [16].

Пропанол-1 - не всегда выявляется в крови в числе продуктов микробиальной активности, но если обнаруживается – всегда в сочетании с другими маркерами брожения, перечисленными выше. Кроме перечисленных выше веществ пропанолу-1 могут сопутствовать изобутанол, изоамиловый спирт и уксусная кислота

Ни один из летучих маркеров брожения не может быть моно-критерием. Всегда оценивают набор признаков, включая присутствие серосодержащих веществ.

ГХ-МС метод Парофазного Анализа без Термостатирования позволяет выявить характерные летучие соединения, образующиеся вследствие микробной активности.

3. Маркеры прижизненного употребления алкоголя

Алкоголь и его метаболиты оказывают токсическое действие на многие системы организма, вызывая нарушения работы нервной системы, сердечно-сосудистой системы, внутренних органов. Основные последствия потребления алкоголя для обмена веществ это - диспропорция в окислительно-восстановительных процессах, отвлечение ферментов от нормального метаболизма содержащих спиртовые и альдегидные группы эндогенных субстратов, образование высокотоксичного ацетальдегида, усиленное образование жирных кислот и холестерина [24].

3.1 Ацетальдегид

Уксусный альдегид является первичным метаболитом этилового спирта. Метаболизм этанола осуществляется в несколько стадий. На первом этапе происходит окисление этанола до ацетальдегида. На втором -

ацетальдегид окисляется до уксусной кислоты. На третьем этапе из ацетата образуется ацетил-коэнзим А, окисляющийся в цикле Кребса до воды и углекислого газа [25]. У лиц, страдающих алкоголизмом, метаболизм уксусного альдегида замедлен, а его уровень в крови существенно выше, чем у здоровых людей [25].

Хотя ацетальдегид и образуется в процессе метаболизма этанола, он может иметь эндогенное происхождение. Образование уксусного альдегида как промежуточного продукта обмена веществ происходит как в растительных, так и в животных организмах. [26]. Ацетальдегид встречается в кофе, в спелых фруктах, хлебе, а также ацетальдегид — значительная часть дыма табака. Также ацетальдегид может образоваться в результате микробиального загрязнения объекта. Поэтому наличие в пробе ацетальдегида не может являться единственным признаком, указывающим на прижизненное употребление алкоголя.

Референтные пределы содержания ацетальдегида в крови здорового человека - менее 0,2 мг/л, при профессиональном воздействии – менее 0,5 мг/л, токсические пределы – от 1,0 до 2,0 мг/л. Умеренное употребление этанола повышает концентрацию ацетальдегида в крови до 0,9-1,3 мг/л, тогда как у хронических алкоголиков – до концентрации 1,7 – 2,5 мг/л [16].

3.2 Этилглюкуронид

Этилглюкуронид (EtG) образуется в результате II фазы биотрансформации этанола в организме путем глюкуронизации этанола. Это прямой метаболит этилового спирта. EtG приобрел диагностическую значимость благодаря его использованию в качестве физиологического показателя для скрининга предшествовавшего потребления алкоголя. Этилглюкуронид накапливается не ранее 45 минут после появления этанола в крови и сохраняется в крови до 14 часов [27], а в моче – до 80 часов, поэтому наряду с другими данными, показатель используется для установления ретроспективы употребления этилового спирта, что крайне необходимо при судебно-медицинской экспертизе живых лиц и трупов.

Определение этилглюкуронида возможно практически во всех объектах, перечисленных в п.2.1 (кроме содержимого желудка), однако наиболее изучены такие объекты как моча и кровь. Выявление этилглюкуронида в образцах волос и ногтевых срезов или пластин (от трупов) может считаться признаком систематического употребления алкоголя.

По нашим данным, длительное хранение при +4°C ранее проанализированных образцов биологических жидкостей и тканей, содержащих и не содержащих этилглюкуронид, показало, что в течение 1,0 – 1,5 лет этилглюкуронид не образовался и значимо не деградировал в

образцах, находящихся в разных стадиях микробной порчи. В настоящее время эти исследования продолжаются.

3.2 Карбогидрат-дефицитный трансферрин (CDT)

Среди маркеров хронического употребления алкоголя наиболее специфичным считается карбогидрат-дефицитный трансферрин (CDT). Трансферрин - белок, обеспечивающий в организме транспорт железа. Основная фракция трансферрина представлена изоформой с 4 остатками сиаловой кислоты. При хроническом употреблении значительных количеств алкоголя (40-60 г этанола в день на протяжении длительного времени) возрастает доля изоформ с двумя остатками сиаловой кислоты, а в более тяжелых случаях выявляется полностью десиализированный трансферрин (0-форма). В норме CDT не превышает 1,3% – 1,6%.

4. Суррогаты алкоголя и экспертная оценка результатов их идентификации в биологических объектах

Суррогат (от лат. *surrogatus*) – заменитель, обладающий лишь некоторыми свойствами заменяемого предмета, продукта.

Суррогаты алкоголя – жидкости, употребляемые с целью опьянения вместо обычных алкогольных напитков из-за недоступности последних. Это понятие объединяет различные по своему химическому составу и физико-химическим свойствам жидкости или их смеси. Таким образом, термин «суррогаты алкоголя» является собирательным и базируется исключительно на субъективном признаке (употребление вместо алкогольных напитков) [28, 29]. В отечественной токсикологии применяется классификация Е.А.Лужникова [19], согласно которой суррогаты алкоголя подразделяют на две категории:

- препараты, приготовленные на основе этилового спирта и содержащие различные примеси (истинные суррогаты);
- препараты, не содержащие этилового спирта и представляющие собой другие одно- или многоатомные спирты, хлорированные углеводороды; их токсическая опасность значительно выше (ложные суррогаты).

Жидкости и растворы, отнесенные к первой группе (истинные суррогаты) при приеме внутрь вызывают интоксикацию, сходную по клиническим проявлениям с алкогольной. Из них наиболее распространены следующие [19]:

- гидрозильный и сульфитный спирты, которые представляют собой спирт этиловый, полученный из древесины путем гидролиза;
- денатурат – технический спирт с незначительной примесью метилового спирта и альдегидов;

- одеколоны и лосьоны – распространенные косметические средства, содержащие до 60% этилового спирта, эфирные масла и прочие примеси;
- клей БФ, основой которого является фенольно-формальдегидная смола, поливинилацеталь, растворенные в этиловом спирте, ацетоне;
- политура – технический этиловый спирт с содержанием ацетона, бутилового и амилового спиртов;
- «нигрозин» - морилка для дерева, которая содержит этиловый спирт и красящие вещества, вызывающие интенсивное и длительное прокрашивание кожного покрова и слизистых оболочек в синий цвет;
- спиртовые настойки лекарственных растений (настойки боярышника, чеснока и др.), водно-спиртовые экстракты лекарственных растений (экстракты родиолы розовой, элеутерококка и др.), спиртованные соки растений (соки алоэ, коланхое и др.);
- другие растворы, содержащие значительное количество этилового спирта.

Ко второй группе относят жидкости, не содержащие этиловый спирт, но по своим органолептическим свойствам или по способности оказывать психоактивное действие напоминающие этанол. Клиническая картина отравления этими жидкостями зачастую существенно отличается от таковой при отравлении этанолом. Наиболее часто встречаются отравления метанолом, пропиловыми спиртами (н-пропанол, изопропанол), бутиловыми спиртами (н-бутанол, бутанол-2), амиловым спиртом и его изомерами, этиленгликолем, эфирами этиленгликоля и тетрагидрофурфуриловым спиртом [29, 30, 31].

Нетрудно заметить, что в приведенной классификации суррогатов алкоголя отсутствуют алкогольные напитки домашнего изготовления (самогон, чача, арака, тутовка, брага, вино, пиво и др.). Между тем, в некоторых публикациях, преимущественно наркологического профиля, самогон и прочие «народные» алкогольные напитки именуют суррогатами алкоголя.

4.1 Диагностика смертельных отравлений алкоголем и его суррогатами

В основе диагностики отравлений суррогатами алкоголя лежат принципы, используемые при диагностике отравлений этиловым спиртом. В методических указаниях МЗ СССР (1974 г.) «О судебно-медицинской диагностике смертельных отравлений этиловым алкоголем и допускаемых при этом ошибках» [32] подчеркивается, что «Присутствие примесей высших спиртов, наряду с этиловым, следует рассматривать как комбинированное отравление, при этом учитывать концентрацию высших спиртов и медленное всасывание их в желудочно-кишечном тракте. Доказательное значение могут иметь лишь дифференцированные данные о количественном содержании

этих спиртов в стенке желудка и его содержимом. При обнаружении этилового спирта в количестве меньшем 4-5‰ и одновременном установлении даже небольших концентраций высших спиртов не исключается возможность наступления смерти в результате отравления суррогатами алкоголя».

Как видно, диагностический критерий, используемый для выявления случаев отравлений суррогатами алкоголя, весьма расплывчат. Дело в том, что обнаружение в биологических жидкостях трупа помимо этанола, высших спиртов или метанола не может однозначно свидетельствовать о наличии большого количества этих веществ в алкогольном напитке, вызвавшем отравление. Поступление этилового спирта в организм активизирует процесс эндогенного образования высших спиртов. Так, при алкогольном опьянении слабой степени выраженности, развивающемся после употребления виски или рома, содержание н-пропанола и изопропанола в крови достигает 2,0 мг/л и более. Иными словами, уровень содержания эндогенно образующихся компонентов сивушного масла достигает уровня тех же компонентов в водке. Аналогичным образом, после употребления алкоголя усиливается синтез эндогенного метанола. Особенно интенсивно его образование идет при одновременном употреблении пектиносодержащих продуктов. Прием этилового спирта в дозе 0,5 г/л (опьянение легкой степени выраженности, внешние признаки которого обычно отсутствуют) сопровождается увеличением содержания метанола в крови до 28 мг/л [33]. При алкогольных отравлениях уровень эндогенно образующегося метанола в крови может достигать 320 мг/л. Помимо метанола в крови обнаруживаются в значительных количествах ацетальдегид, ацетон, изопропанол и н-пропанол [34].

Главным в аспекте рассматриваемой проблемы является то, что метод газовой хроматографии, применяемый для исследования биологических жидкостей трупа при проведении посмертной диагностики состояния острой алкогольной интоксикации, лишь в редких случаях позволяет идентифицировать алкогольный продукт (раствор этилового спирта, содержащий значительное количество высших спиртов или метанола), вызвавший отравление. Исключение составляют отравления, вызванные употреблением ложных суррогатов алкоголя. Наиболее типичные отравления такого рода возникают при употреблении растворителей и жидкостей для мытья стекол, которые содержат от 15% до 92,5% н-пропилового, изопропилового или изобутилового спиртов (часто в смеси с этиловым спиртом). Последние легко идентифицируются в биологических жидкостях трупа [35].

Очевидно также и то, что посмертная диагностика причин смертельных отравлений алкоголем в принципе не может быть использована для выявления случаев отравления некачественными, незаконно изготовленными или фальсифицированными алкогольными напитками. Алкогольные

подделки такого рода по химическому составу, а часто и по органолептическим свойствам, не отличаются или мало отличаются от качественной и легально произведенной алкогольной продукции.

Причины экспертных ошибок при диагностике отравлений суррогатами алкоголя. Так, по сложившейся к настоящему времени практике оценки результатов исследования крови, мочи и других биологических объектов на наличие суррогатов алкоголя, их присутствие в биологических объектах часто идентифицируют по наличию высших спиртов их эфиров и других компонентов неочищенных спиртов (сырцов, самогонов), политуры, содержащей компоненты головной фракции дистилляции спиртов. Следует отметить ошибочность подобного подхода по двум причинам.

Причина первая. Химический состав летучих веществ, таких суррогатов, как спиртов-сырцов и продуктов домашней выгонки, таких как самогон, чача, арака, тутовка и др. крайне близок составу элитных коньяков, виски, текилы и других дистиллированных спиртных напитков, получаемых без ректификации.

Причина вторая. Профили летучих веществ, образующиеся при микробной деградации крови, органов и тканей совпадают с профилем высших спиртов, эфиров, кетонов, содержащихся в не ректифицированных спиртных напитках, как легальных, так и суррогатных.

4.2 Диагностика не смертельных отравлений алкоголем и его суррогатами

Несколько иным образом обстоят дела с диагностикой эпизодов не смертельного отравления алкоголем и его суррогатами. В этой ситуации часто имеется возможность установить разновидность алкогольного напитка или суррогата, который послужил причиной отравления. Разработана система химико-токсикологического анализа в диагностике острых отравлений, позволяющая уверенно дифференцировать случаи отравлений алкоголем и техническими жидкостями [36, 37].

Согласно результатам работы [38], проведенной в НИИ скорой помощи им. Н.В.Склифосовского, в которой методом газовой хроматографии исследовали вызвавшие отравление жидкости, большая часть образцов этих жидкостей представляла качественные алкогольные напитки, а меньшая часть – являлась водками низкого качества (превышение требований ГОСТ по содержанию альдегидов и высших спиртов). И, наконец, незначительная часть образцов, представленных на исследование в стандартной упаковке из-под вино-водочной продукции, содержала помимо этанола значительные количества метанола, ацетона, этиленгликоля, высших спиртов или других растворителей. Иными словами, большая часть отравлений была обусловлена передозировкой алкоголя.

В качестве иллюстрации можно привести описание клинических проявлений острой интоксикации некоторыми, наиболее типичными суррогатами алкоголя [39].

При отравлении одеколоном, лосьонами, зубным эликсиром отмечается «обычное» опьянение у большей части больных. Характерна очень кратковременная эйфория и быстрое нарастание сомноленции. У некоторых одеколоны и лосьоны не вызывают ничего, кроме быстро наступающего сна.

Дезодоранты вызывают опьянение, незначительно отличающееся от алкогольного, у некоторых – «дурь» (трудно дифференцируемое расстройство сознания, близкое к оглушению). Быстро развивается сонливость. Абстиненция тяжела и длительна, с обилием вегетативных и соматических расстройств. В настоящее время наблюдаются случаи смертельных отравлений, особенно среди подростков, при вдыхании содержимого баллончиков с дезодорантами или газа для зажигалок. В обоих случаях основными компонентами вдыхаемого газа являются пропан, бутан и изобутан.

При употреблении стеклоочистителей быстро возникают «дурман» в голове, нарушение ориентировки, быстрое засыпание. Абстиненция тяжела физически, настроение резко подавлено. Отвращение к опохмелению, даже любыми алкогольными напитками.

Клиническая картина отравлений другими суррогатами алкоголя (антистатики, клей БФ, спиртосодержащие лекарственные средства) в большей мере определяется действующими началами неалкогольной природы.

5. Метод Парофазного Анализа без Термостатирования

5.1 Сущность метода

Пробу биологической жидкости с введенным внутренним стандартом помещают в стеклянную виалу (флакон), плотно укупоривают крышкой с полимерной мембраной. Анализу подвергают воздушно-паровую фазу из газового пространства ампулы над поверхностью пробы. Отбор равновесной паровой фазы производят путем прокалывания шприцем полимерной мембраны (используют газоплотный хроматографический шприц с тефлоновым уплотнением поршня). Отбор пробы проводят при комнатной температуре (в диапазоне температур от +20°C до +25°C) в автоматическом режиме. Парогазовую пробу анализируют методом хроматографии с пламенно-ионизационным (ГХ-ДИП) или масс-селективным (ГХ-МС) детектированием.

При выбранных условиях анализа можно также проводить анализ мочи прямым вводом жидкой фракции (после центрифугирования) в испаритель хроматографа. При этом определяют гликоли и другие малолетучие

компоненты технических жидкостей.

В методе ГХ-ДИП обнаружение компонентов технических жидкостей выполняют по временам удерживания стандартных соединений перечисленных. Для количественного анализа в методе ГХ-ДИП применяют градуировочные смеси целевых веществ.

Обнаружение компонентов технических жидкостей в методе ГХ-МСД выполняют по масс-спектрам и временам удерживания компонентов градуировочных смесей целевых соединений. Также для идентификации используют стандартные библиотеки масс-спектров MPW, NIST, Wiley.

При ГХ-ДИП и ГХ-МС анализе для идентификации компонентов используют программу Фиксации Времен Удерживания (ФВУ).

Многокомпонентный газохроматографический и хромато-масс-спектрометрический анализ биожидкостей методами парофазного анализа и прямого ввода пробы проводят на колонке HP-FFAP или аналогичной. Экспрессное газохроматографическое определение (время анализа 2,2-5,5 мин) спиртов и некоторых сопутствующих соединений, а также низкомолекулярных алканов (пропан, изобутан, бутан) выполняют на колонке HP-V ALC.

Разработан набор методик хроматографического анализа с пламенно-ионизационным и масс-спектрометрическим детектированием для обнаружения и количественного определения алкоголя и компонентов технических жидкостей в биологических объектах: крови, моче, слюне, внутриглазной жидкости. При использовании метода хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МСД) диапазон измеряемых концентраций составляет в режиме полного сканирования (SCAN) 0.05 – 10000 мкг/мл, в режиме селективного мониторинга выбранных ионов (SIM) 0.005 – 10000 мкг/мл. При пламенно-ионизационном детектировании (ГХ-ДИП) диапазон измеряемых концентраций составляет 1,0 – 10000 мкг/мл. Предел определения для этанола и метанола - 0,007% об. для ацетона, ацетонитрила, пиридина и хлорорганических соединений 1-3 мкг/мл, для ароматических углеводов: бензола, толуола, изомеров ксилола, стирола 0,5 мкг/мл. Погрешность ($SKO_{отн.}$) определения методики Анализа Равновесной Паровой Фазы Без Термостатирования не превышает 4%.

5.2 Требования к рабочему месту

Исследование биологических объектов на наличие алкоголя, летучих веществ и компонентов технических жидкостей проводят в условиях специально оборудованной химической лаборатории, обязательно оснащенной принудительной вытяжной вентиляцией. Температура в помещениях лаборатории должна находиться в пределах от +20°C до +25°C.

Помещение, в котором проводят хроматографический анализ, должно быть отделено от помещений, в которых проводят подготовку пробы к

анализу - во избежание перекрестных загрязнений пробы целевыми компонентами. Площади помещений должны быть достаточными для размещения хроматографического оборудования, не менее 6 кв.м на каждую единицу.

Для каждой единицы хроматографического оборудования необходимо предусмотреть наличие не менее 2 лабораторных столов – для самого прибора и для периферических устройств, таких как управляющий персональный компьютер, монитор, принтер и др. Баллоны с газом-носителем (гелий, азот) должны быть размещены и закреплены в специально предназначенных металлических шкафах.

В помещениях не допускается применение обезжиривающих, чистящих, моющих и дезинфицирующих средств, в составе которых есть целевые компоненты (например, этиловый и изопропиловый спирт, ацетон, ацетонитрил и т.д.).

5.3 Аппаратура, материалы и реактивы

Газовый хроматограф (Agilent Technologies 6890, 7890A, 7820, Маэстро, Shimadzu GC-2010, Кристалл-5000 или аналогичный по характеристикам) с пламенно-ионизационным детектором, обеспечивающий погрешность измерения целевых компонентов в среднем диапазоне градуировочной кривой не выше 5% (СКО) при парофазном вводе пробы без термостатирования.

Газовый хроматограф (Agilent Technologies 7890/5775, Маэстро/5775 или аналогичный по характеристикам) с моноквадрупольным масс-селективным детектором, обеспечивающий погрешность измерения целевых компонентов в среднем диапазоне градуировочной кривой не выше 5% (СКО) при парофазном вводе пробы без термостатирования.

Автоинжекторы, позволяющие регулировать погружение иглы хроматографического шприца в вialsу.

Микрошприцы хроматографические на 10 мкл и газоплотные на 100 мкл.

Хроматографические капиллярные колонки: HP-FFAP 50м;0.32мм;0.50мкм (19091F-115) или HP-B ALC 7,5м;0,32мм;20мкм (19091S-510).

ВАЖНО! Для экспрессного определения алкоголя в биологических жидкостях (крови, моче, слюне, внутриглазной жидкости), а также для обнаружения компонентов «газов для зажигалок» и газов-пропеллентов бытовых дезодорантов применяют капиллярную колонку HP-B ALC 7,5м;0,32мм;20мкм (19091S-510).

Критерии выбора хроматографических капиллярных колонок и детектирующих систем для определения этанола и летучих ядов:

- масс-спектрометрический детектор может быть использован с HP-

FFAP 50м;0.32мм;0.50мкм (19091F-115);

- пламенно-ионизационный детектор может быть использован с HP-FFAP (19091F-115) 50м;0.32мм;0.50мкм или с HP-B ALC (19091S-510) 7,5м;0,32мм;20мкм. Предпочтительно использовать HP-B ALC, так как данная колонка применима и для обнаружения компонентов «газа для зажигалок».

Общелабораторное оборудование и химическая посуда (автоматические механические дозаторы, пробирки и виалы с герметично укупоривающими крышками, весы аналитические, аквадистиллятор и т.д.).

Газ-носитель – гелий сжатый марки "А" в баллоне.

Газ-носитель – азот сжатый в баллоне.

Реактивы квалификации не ниже «химически чистый, х.ч.»: ацетон, метанол, изопропанол, этанол, пропанол-1, бутанол-1, хлороформ, четыреххлористый углерод, хлористый бутил, 1,2-дихлорэтан, ацетонитрил, бензол, толуол, о-ксилол, р-ксилол, анилин, диметиланилин, моноэтиловый эфир этиленгликоля, диметиловый эфир этиленгликоля, бутилцеллозольв, 1,4-диоксан, диэтиловый эфир, диизопропиловый эфир, гексан, гептан, этилацетат, бутилацетат.

Допускается использовать оборудование, материалы и реактивы с техническими характеристиками не ниже указанных.

5.4 ГХ-МС метод Парофазного Анализа без Термостатирования для идентификации и количественного определения этанола и летучих токсичных соединений с хроматографической колонкой HP-FFAP

До начала исследований следует убедиться в химической чистоте используемых для анализа реактивов; при этом на чистоту реактивы проверяют в тех максимальных количествах, в которых они будут употреблены для анализа, и теми же методами и реакциями, которые будут применены в ходе судебно-химического исследования. Для повышения точности определения обнаруживаемого вещества проводят не менее двух определений для каждого объекта [13].

5.4.1 Приготовление градуировочных растворов

Для градуировки приборов растворы готовят на биологической матрице, которая будет использоваться для анализа (кровь, моча, слюна, ткани органов), не содержащей целевые аналиты. На практике применяют одну из двух единиц измерения – промилле (‰) и г/л.

5.4.1.1 Приготовление градуировочных растворов (‰) содержащих этанол, метанол, ацетон, изопропанол). Калибровочные точки 0.3, 1.0, 3.0, 6.0 ‰

$$1‰ = 0,1\% \text{ об.}$$

Для приготовления градуировочных растворов использовали этиловый спирт с содержанием этанола 95% об.

Учет составляющей погрешности, связанной с содержанием этанола для концентрации 6‰ «А»:

60 мкл этанола -100%;

X мкл этанола - 95%.

$$X = 60 \times 95 / 100 = 57,0 \text{ мкл этанола введено.}$$

1) Точка 6‰ «А». От 10 мл биожидкости отобрать и отбросить 240 мкл и дозировать по 60 мкл этанола, метанола, ацетона, изопропанола (концентрация этанола в растворе составит 5,70 ‰).

2) Точка 3‰ «В». Разбавить соответствующей биожидкостью (BLANK) смесь «А» в 2 раза (концентрация этанола в растворе составит 2,85‰).

3) Точка 1‰ «С». Разбавить биожидкостью (BLANK) смесь «В» в 3 раза (концентрация этанола в растворе составит 0,95‰).

4) Точка 0,3‰ «D». Разбавить биожидкостью (BLANK) смесь «В» в 10 раз. (концентрация этанола в растворе составит 0,29‰).

Если растворы готовят в пробирках меньшей вместимости (например, Токси-Лаб вместимостью 9 мл), то смесь «А» готовят следующим образом: в 5 мл биожидкости (BLANK) внести по 30 мкл этанола, метанола, ацетона, изопропанола предварительно отобрав и отбросив 120 мкл биологической матрицы.

Внутренний стандарт (ВС) пропанола-1 концентрацией 10 ‰

В 10 мл дистиллированной воды вводят 100 мкл пропанола-1. Концентрация пропанола-1 в этом растворе 10‰.

5.4.1.2. Приготовление градуировочных растворов (г/л), содержащих этанол, метанол, изопропанол, изобутанол, бутанол, ацетон. Калибровочные точки 0.3, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 г/л

Градуировочный раствор «А», концентрированный.

В колбу вместимостью 100 мл дозировать химически чистые вещества с учетом данных об удельном весе, согласно таблице 2. Для градуировки этанола допускается использовать 95% этиловый спирт с соответствующим

перерасчетом (см. раздел 5.4.1.1). Довести дистиллированной водой до метки. Содержание каждого из соединений в растворе составит 8 г/л.

Таблица 2

Дозирование целевых веществ для приготовления раствора «А»

Наименование вещества, х.ч.	Удельный вес	Объём 1 грамма, мл	Количество для приготовления 100 мл раствора с содержанием 8 г/л, мл
метанол	0,797	1,255	1,0
этанол	0,789	1,267	1,0
изопропанол	0,785	1,274	1,0
изобутанол	0,803	1,245	1,0
н-бутанол	0,810	1,246	1,0
ацетон	0,790	1,266	1,0

Градуировочные растворы 0.3, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 г/л.

Из концентрированного раствора «А» приготовить градуировочные растворы содержащие 1.0, 3.0, 5.0 г/л каждого вещества (таблица 3).

Таблица 3

Приготовление градуировочных растворов 1.0, 3.0, 5.0 г/л из раствора «А»

Концентрация каждого вещества, г/л	Объем раствора «А», мл	Объем соответствующей биологической матрицы, мл
1,0	0,5	3,5
3,0	1,5	2,5
5,0	2,5	1,5

Приготовление градуировочного раствора 0,3 г/л: развести в 10 раз градуировочный раствор концентрацией 3,0 г/л.

Приготовление градуировочного раствора 0,5 г/л: развести в 10 раз градуировочной раствор концентрацией 5,0 г/л.

Внутренний стандарт (ВС) н-пропанола концентрацией 8.0 г/л.

В 10,0 мл дистиллированной воды дозировать 100 мкл пропанола-1. Концентрация пропанола-1 в этом растворе составляет 8,0 г/л.

5.4.2 Пробоподготовка

Перед началом исследования замороженный образец необходимо полностью разморозить при комнатной температуре и равномерно перемешать.

Для предварительного качественного исследования: 1,5 мл исследуемого образца дозировать в подходящую для автоинжектора виалу и герметично укупорить крышкой с центрально расположенной тефлоновой вставкой. Поместить виалу в автосамплер прибора.

Для количественного исследования: в две подходящие для автоинжектора виалы в каждую дозировать по 1,5 мл исследуемого образца, добавить по 100 мкл водного раствора ВС «В», укупорить герметичной крышкой с центрально расположенной тефлоновой вставкой. Поместить виалы в автосамплер прибора. Проводится по одному исследованию парогазовой фазы из каждой виалы (повтор 1 и повтор 2).

В случае отсутствия автосамплера допускается ввод 50 мкл парогазовой фазы вручную.

5.4.3 Аппаратура и условия хроматографирования

Хроматограф с масс-селективным детектором «Маэстро» Agilent Technologies 7820/5975N (или аналогичный) с автосамплером и с колонкой HP-FFAP длиной 50 м, внутренним диаметром 0.32 мм, толщиной пленки неподвижной фазы 0.50 мкм.

Газ-носитель – гелий марки А, постоянный поток через колонку - 1.3 мл/мин, ввод 50 мкл парогазовой пробы газоплотным шприцем, с делением потока 1/10. Уровень опускания иглы шприца позиционируют на 23 мм от минимального нижнего значения для того, чтобы отбор пробы происходил из парогазового пространства над объектом. Температура инжектора 180°C, температура интерфейса 190°C. Программа термостата колонок: 60°C (4 мин), 10°C/мин, 190°C (30 мин).

Условия масс-спектрометрического детектирования: режим сканирования по полному ионному току (SCAN), температура источника ионов 230°C, температура анализатора 150°C. Диапазон масс m/z 29-350 а.е.м. Напряжение на умножителе: результат, полученный при автоматической настройке по перфторбутиламину в режиме lowmass tune.

После каждых 50 анализов желательно кондиционировать прибор в течение часа при температуре термостата колонок 210°C.

5.4.4 Результаты исследования

Идентификацию соединений в методе ГХ-МС выполняют по масс-спектрам (используют стандартные библиотеки масс-спектров MPW, NIST, Wiley) и временам удерживания соединений. Времена удерживаний целевых аналитов приведены в таблице 4. Перед каждым исследованием анализируют фон воздуха помещения (бланковый образец) из пустой виалы. В фоне не должны детектироваться пики целевых соединений.

Таблица 4

Компоненты технических жидкостей, определяемые
на хроматографических колонках HP-FFAP 50м;0.32мм;0.50мм
и HP-Blood-Alc 7,5м;0,32мм;20мм

	Определяемое вещество	Время удерживания, мин HP-FFAP	Время удерживания, мин HP-Blood-Alc	Предел определения, ПРО ГХ-ДИП, мкг/мл	Предел определения, ПРО ГХ-МС-SCAN, мкг/мл
1	Ацетальдегид	2.87	1.96	3.0	0.2
2	Диэтиловый эфир	2.87	3.031	2.0	0.3
3	Диметилсульфид	3.39		4.0	0.3
4	Хлористый бутил	3.82	3.184	1.5	0.2
5	Ацетон	3.86	1.373	1.5	0.2
6	Четыреххлористый углерод	4.18	2.965	5	0.3
7	Этилацетат	4.25	2.714		0.3
8	Метанол	4.34	0.459	4.0	0.3
9	Метилэтилкетон	4.45		3.0	0.3
10	Изопропанол	4.62	1.711	4.0	0.3
11	Диметилловый эфир этиленгликоля	4.69		3.0	0.2
12	Этанол	4.73	0.961	3.5	0.2
13	Метиленхлорид	4.73	1.315	1,5	0.2
14	Бензол	5.01	3.087	1	0.2
15	Дибутиловый эфир	5.08		1	0.3
16	Метилизобутилкетон	5.92		3	0.3
17	Ацетонитрил	6.03		3	0.3
18	Хлороформ	6.12	2.497	1.5	0.2
19	Пропанол (BC1)	6.32	2.137	3.2	0.3
20	Толуол	6.58	5.517	1	0.2
21	1,4-Диоксан	6.97		2	0.3
22	1,2-Дихлорэтан	7.00	2.513	1.5	0.2
23	Метилбутилкетон	7.20	2.580	3	0.2
24	p-Ксилол	8.27		0.25	0.2
25	Бутанол-1	8.75	3.250	3.5	0.3
26	Пиридин	9.17		2	0.2
27	Моноэтиловый эфир этиленгликоля	9.63		3	0.2
28	Стирол	10.37		0.25	0.2
29	Диметилформаид	11.70		2.0	0.3
30	Циклогексанол (BC 2)	12.3		2.5	0.3
31	3,5-Диметилпиридин	12.84		2.5	0.3
32	Уксусная кислота	13.32		3.0	0.3
33	Диметилсульфоксид	15.16		2.0	0.2
34	Анилин	17.04		2.0	0.3

Количественный расчет проводят по методу внутреннего стандарта с помощью программного обеспечения согласно инструкции к прибору.

Расчет концентраций (С) целевых соединений производится по общеизвестной формуле:

$$C = \frac{h_x \cdot C_{ст}}{h_{ст} \cdot f_{x|ст}}$$

где: h_x – высота пика целевого соединения, в мВ;

$h_{ст}$ – высота пика ВС, в мВ;

$C_{ст}$ – концентрация ВС, в г/л;

$f_{x|ст}$ – поправочный коэффициент.

Поправочные коэффициенты рассчитываются прибором автоматически по результатам измерений градуировочных растворов.

Учитывая, что концентрация в трупной крови новообразованного в результате микробиальной активности этанола может достигнуть 0,8‰ и более, он не может быть надежно отдифференцирован от прижизненно употребленного алкоголя. Поэтому концентрацию этанола в трупной крови ниже 0,5‰ в заключение не выдают. Концентрацию этанола в диапазоне 0,5 – 0,8‰ относят к так называемой «серой зоне», в этом случае проводят дополнительные уточняющие исследования, в том числе на наличие других прямых и непрямых маркеров употребления алкоголя во всех доступных объектах.

На рис. 2 представлена хроматограмма парогазовой фазы крови, в которую добавили по 3,2 г/л каждого соединения: ацетон, метанол, изопропанол, этанол, ацетонитрил, н-пропанол, н-бутанол. На рис. 3 приведены примеры хроматограмм различных объектов, содержащих дихлорэтан. Кроме 1,2-дихлорэтана в исследуемой крови определен ацетон, в моче – ацетон, метилэтилкетон, метилбутилкетон – вещества, накапливающиеся в моче вследствие нарушения гомеостаза при отравлении хлорированными углеводородами.

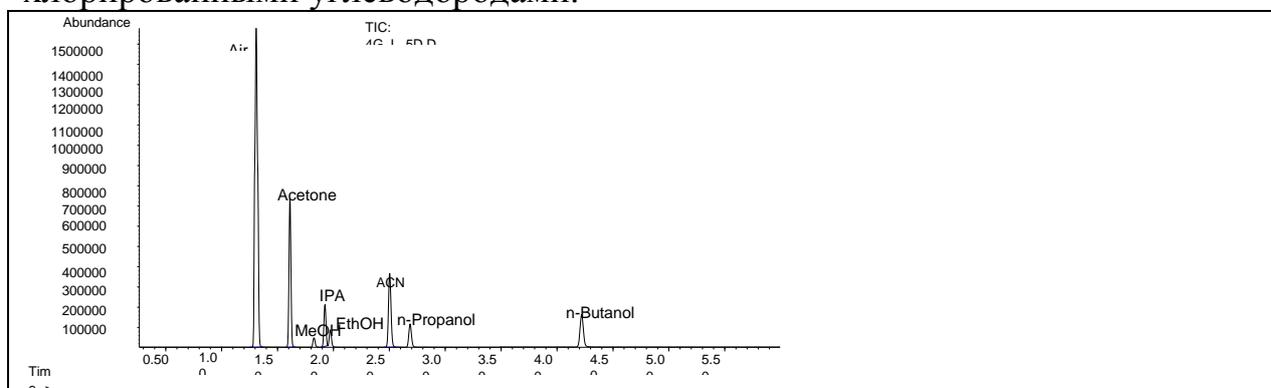


Рисунок 2. Хроматограмма градуировочной смеси летучих органических соединений, добавленных в кровь в концентрации 3,2 г/л. Времена удерживаний (RT): воздух – 1,31мин, ацетон - 1,61мин, метанол – 1,81 мин, изопропанол – 1,88 мин, этанол – 1,96 мин, ацетонитрил – 2,50 мин, н-пропанол – 2,68 мин, н-бутанол – 4,21 мин. Метод – парофазный анализ без термостатирования, колонка HP-FFAP.

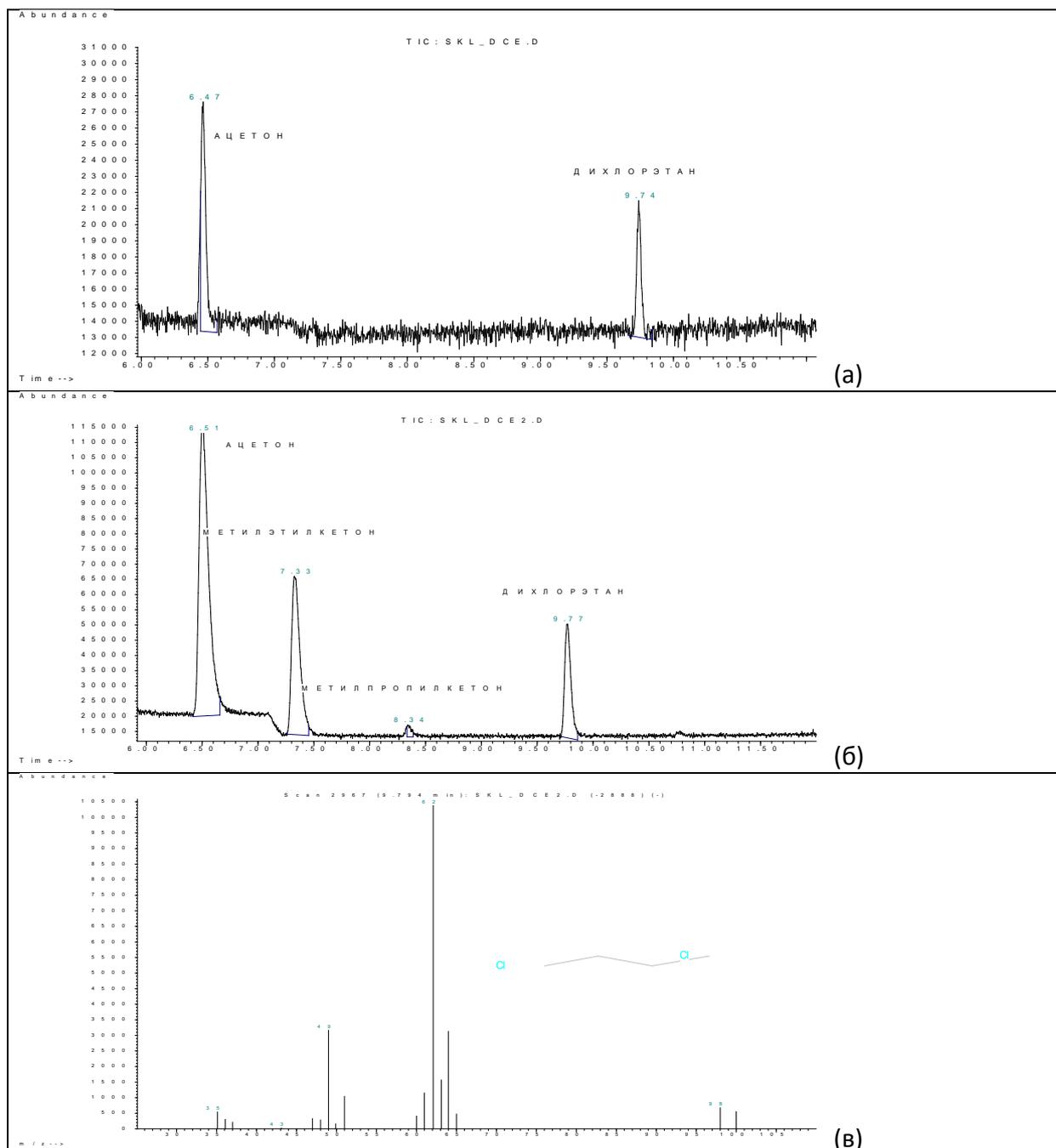


Рисунок 3. Хроматограммы (SCAN) по полному ионному току (а) – крови, (б) - мочи (отобранной от живого лица) при отравлении 1,2-дихлорэтаном. (в) - Масс-спектр 1,2-дихлорэтана, соответствующий пику 9.77 мин. Содержание дихлорэтана в крови 8.2 мг/л, в моче 41.3 мг/л. Метод – парофазный анализ без термостатирования, колонка HP-FFAP 50 м, 0.32 мм, 0.50 мкм.

На рис. 4 представлен хроматографический профиль парогазовой фазы крови от трупа, подвергшейся микробиальному брожению, на рис. 5 - фрагмент хроматограммы. Номера соединений на рис. 4 соответствуют разметке хроматографических пиков. Обнаруженные в пробе ацетон, метилэтилкетон, метилпропилкетон и метилизобутилкетон, являются, по нашему мнению, возможными маркерами «химического» стресса.

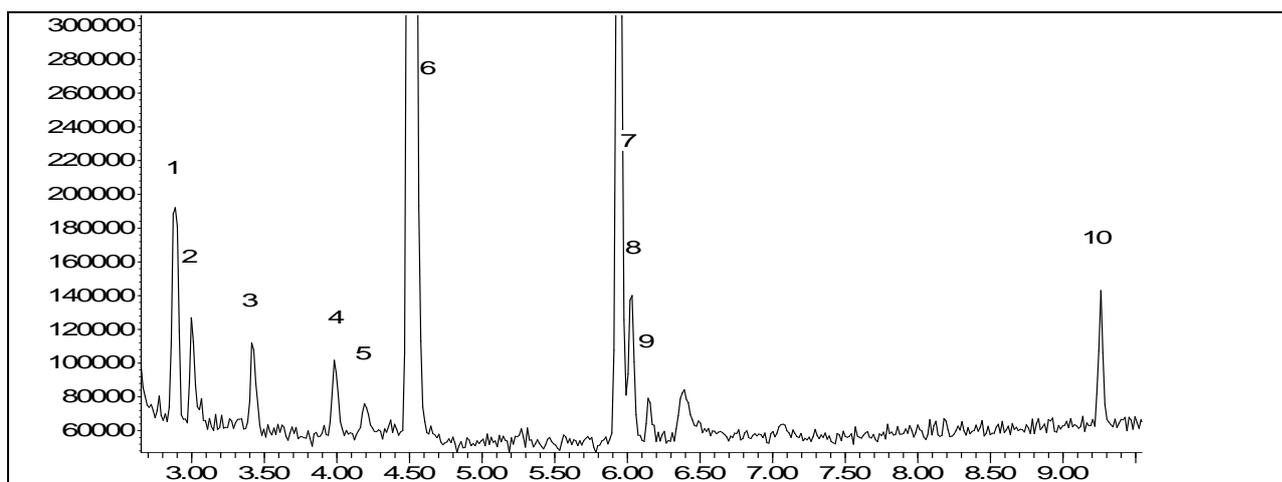


Рисунок 4. Хроматографический профиль в режиме полного сканирования парогазовой фазы крови от трупа ребенка 6 лет (ДТП), подвергшейся микробильному брожению. ГХ-МС «Маэстро» 7820/5975N с колонкой HP-FFAP 50 м, 0.32 мм, 0.50 мкм. Времена удерживаний: 1. Ацетальдегид (RT=2.87 min). 2. Дисульфид углерода (RT=3.01 min). 3. Ацетон (RT=3.43 min). 4. Этилацетат (RT=3.98 min). 5. Метилэтилкетон (RT=4.19 min). 6. Этанол (RT=4.51 min). 7. Хлороформ (RT=5.95 min). 8. Тетрахлорэтилен (RT=6.02 min). 9. Пропанол-1 (RT=6.143 min). 10. Изоамиловый спирт (RT=9.26 min).

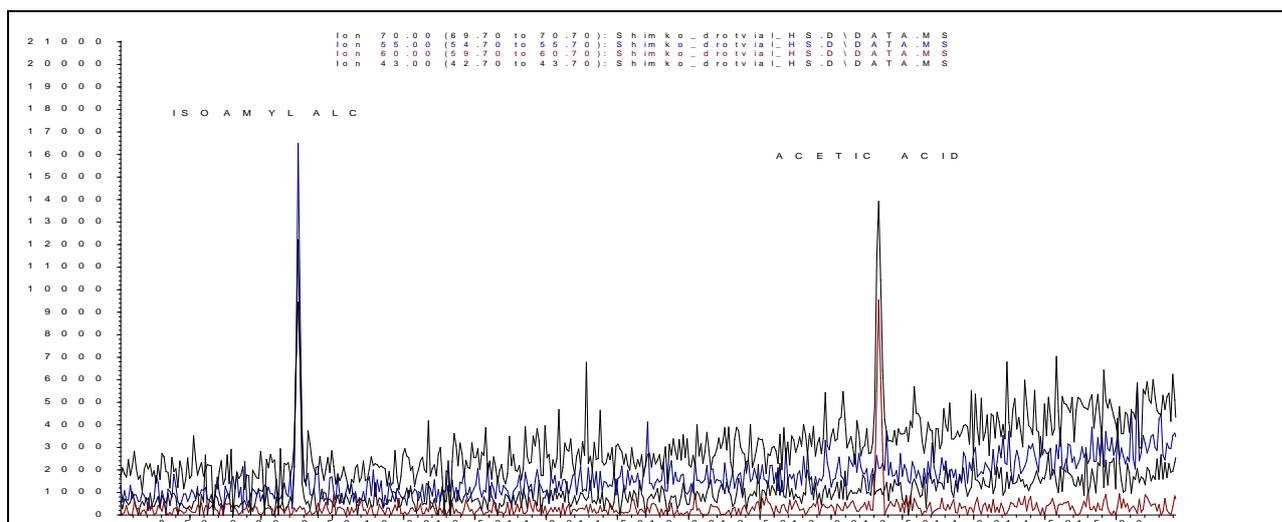


Рисунок 5. Фрагмент хроматограммы парогазовой фазы крови от трупа ребенка 6 лет (ДТП), подвергшейся микробильному брожению. ГХ-МС «Маэстро» 7820/5975N с колонкой HP-FFAP 50 м, 0.32 мм, 0.50 мкм. Вещество со временем удерживания 13.320 мин соответствует уксусной кислоте по времени удерживания и масс-спектру.

В данном примере: ацетальдегид может являться как продуктом спиртового брожения - маркером микробильного загрязнения образца крови, так и продуктом преобразования этанола в организме человека при жизни. Для проверки достоверности первой и второй гипотез в дальнейшем провели судебно-химическое исследование образца крови на наличие этилглюкуронида. Ацетон и метилэтилкетон – могут иметь эндогенное происхождение, этилацетат - возможный продукт взаимодействия

новообразованных этанола и уксусной кислоты. По результатам идентификации летучих продуктов жизнедеятельности микроорганизмов, выделенных из данного образца крови, можно сделать вывод о том, что исследованный образец имеет признаки значительного микробного загрязнения продуцирующей этанол микрофлорой и признаки спиртового брожения.

На рис. 6 представлен фрагмент хроматограммы парогазовой фазы крови от трупа, также подвергшейся микробиальному воздействию, и масс-спектры выявленных маркеров брожения. В данном образце были выявлены этанол, н-бутанол и диметилсульфид, который может быть как продуктом спиртового брожения, так и продуктом деградации серосодержащих белков крови.

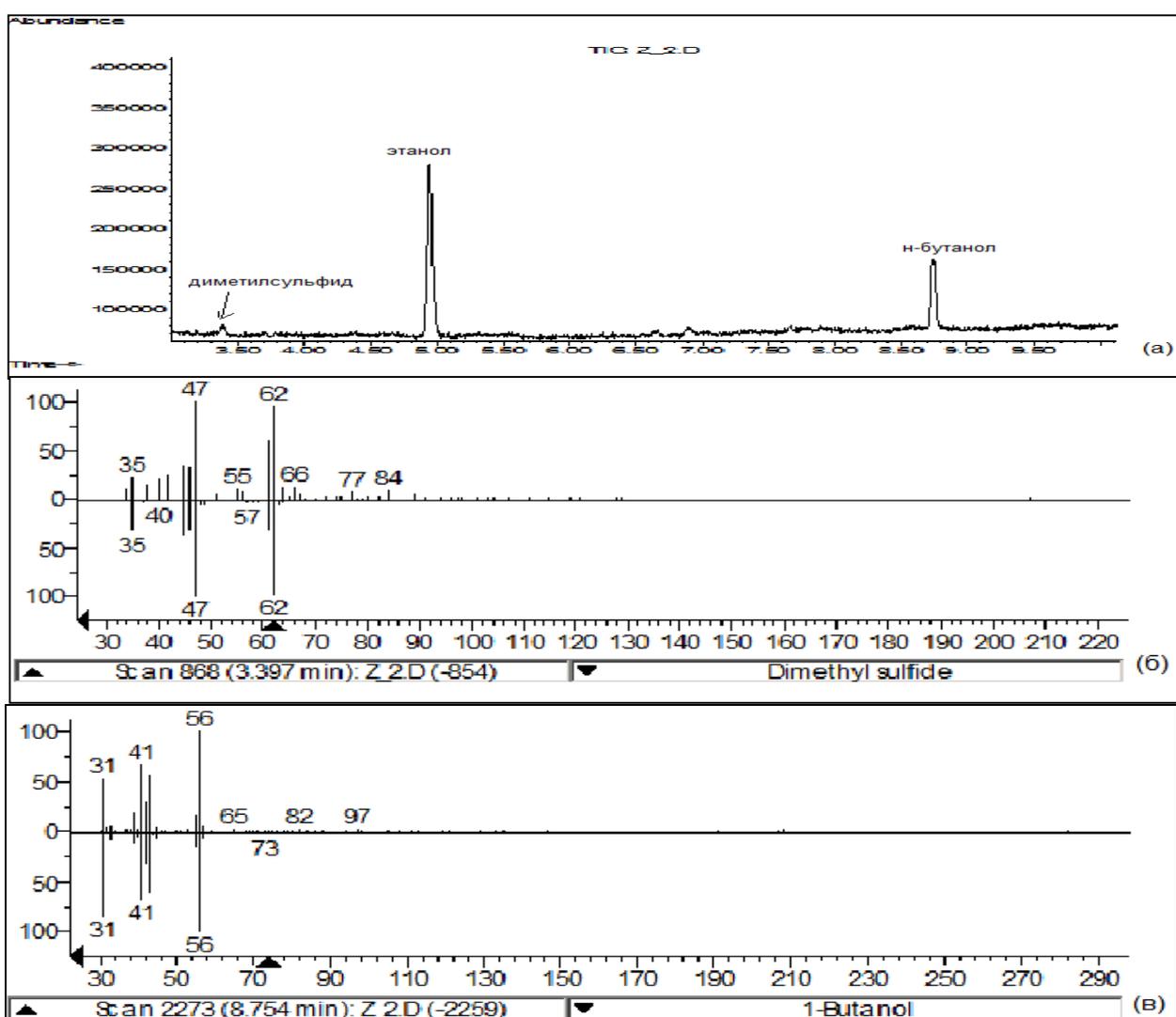


Рисунок 6. Фрагмент хроматограммы парогазовой фазы крови от трупа ребенка 11 лет (утопление), подвергшейся микробиальному брожению (а). (б) - Масс-спектр диметилсульфида, соответствующий пику 3.397 мин. (в) - Масс-спектр н-бутанола, соответствующий пику 8.754 мин. Метод – парофазный анализ без термостатирования, с колонкой HP-FFAP 50 м, 0.2 мм, 0.3 мкм.

Трудности в интерпретации полученных данных могут быть связаны с тем, что полученные ферментативным брожением спирты содержат в своем составе такие же химические соединения, как и кровь, подвергшаяся микробиальному воздействию. Например, при производстве коньячного спирта из некачественного виноматериала, в продукте накапливаются эфиры (в первую очередь этилацетат), летучие кислоты (уксусная кислота), дикетонные соединения и их предшественники (диацетил и ацетоин). На рис. 7 представлены хроматограммы коньяка, текилы, виски.

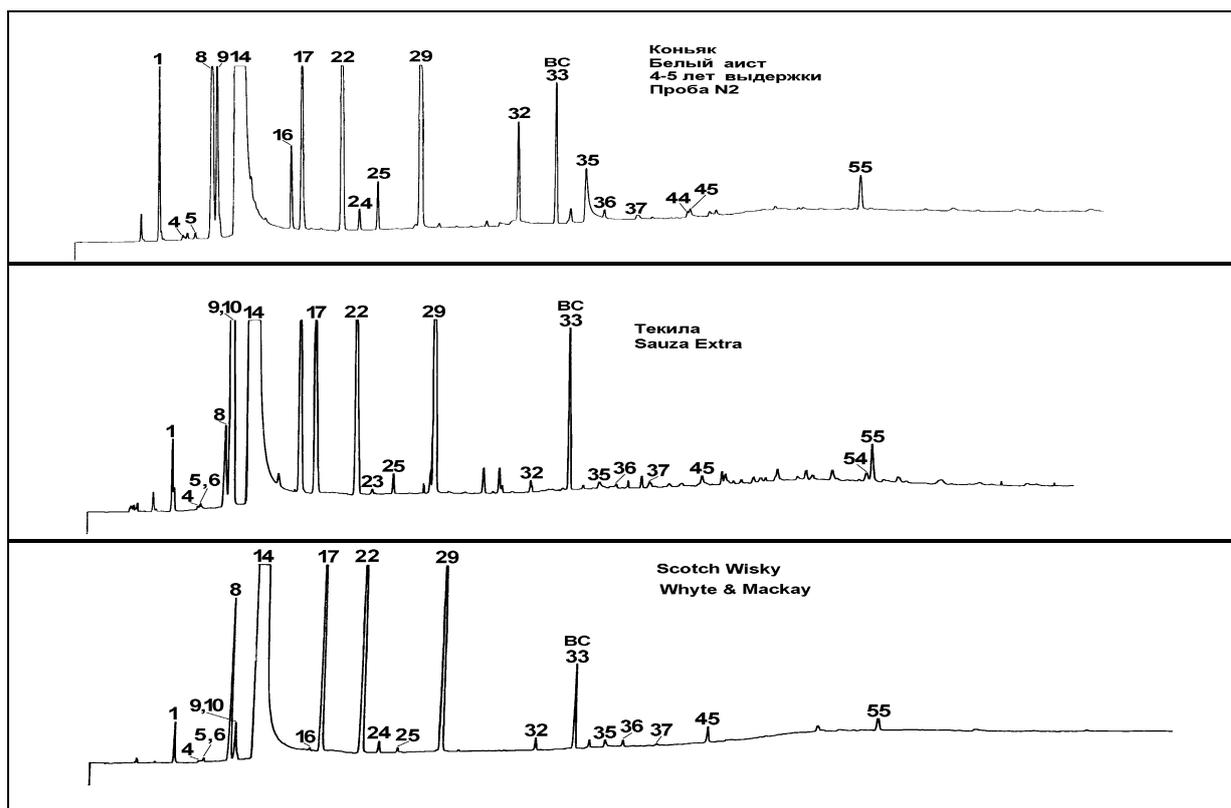


Рисунок 7. Хроматограммы аутентичного коньяка Белый аист (верхняя), текилы (средняя) и шотландского виски (нижняя). Соединения, определяемые методом ГХ-МС (номера соединений соответствуют номерам на хроматограммах): 1 - ацетальдегид, 4 – ацетон, 5 - этилформиат, 6 - метилацетат, 7- н-масляный альдегид, 8 – этилацетат, 9 – метанол, 10 - метилэтилкетон, 14 - этанол, 16 - втор-бутанол, 17 - пропанол-1, 22 - изобутанол, 23 - пинаколиловый спирт, 24 - изоамилацетат, 25 - бутанол-1, 29 - изоамиловый спирт, 33 – циклогексанол (BC), 35 – уксусная кислота.

Идентификация легких углеводов, растворителей и моторных топлив в биологических объектах

На рис.8 представлена хроматограмма образца крови, в которую был добавлен бензин 1 мкл/мл, на рис. 9 - фрагмент хроматограммы с пара-, мета- и орто-ксилолами. На рис. 10 - хроматограмма по полному ионному току парогазовой фазы образца крови пациентки (59 лет), госпитализированной после пожара, содержание этанола в крови 2,51 г/л. На рис. 11 - та же хроматограмма по экстрагированным ионам, характерным для п-ксилола, м-

ксилола, о-ксилола.

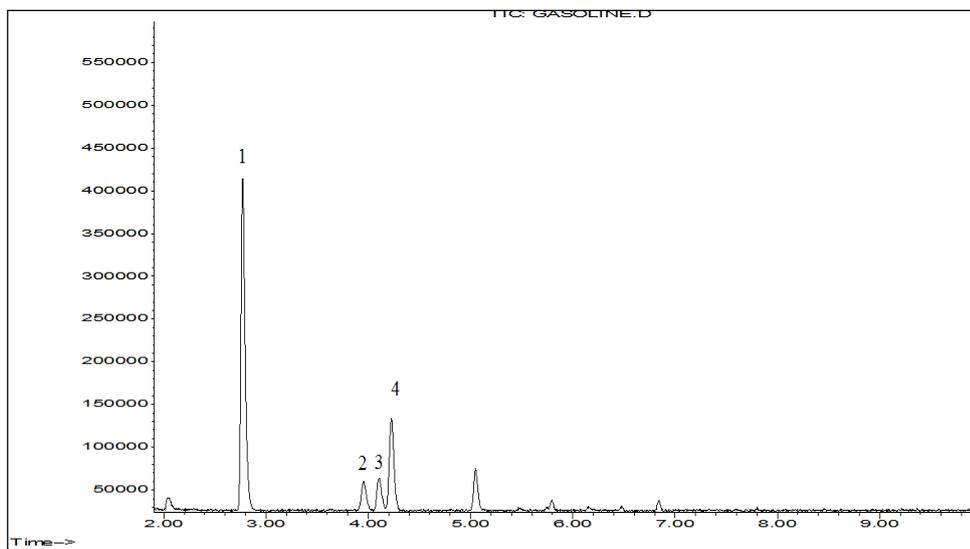


Рисунок 8. Хроматограмма по полному ионному току крови, в которую добавлен 1 мкл/мл бензина: 1 - воздух, 2 – п-ксилол, 3 – м-ксилол, 4 – о-ксилол. Метод – парофазный анализ без термостатирования, колонка HP-FFAP 50 м, 0.32 мм, 0.50 мкм.

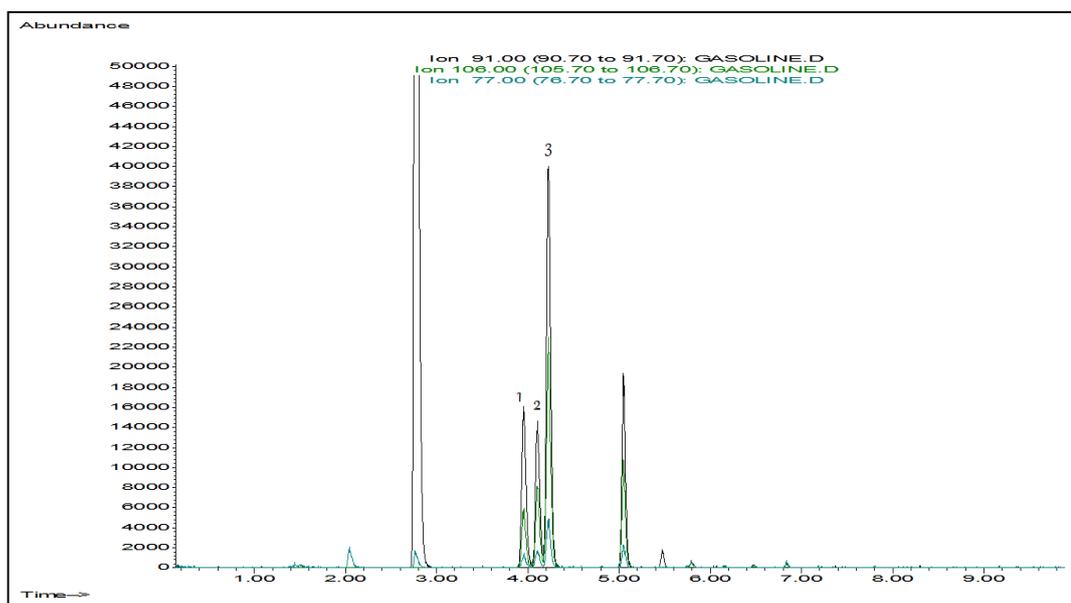


Рисунок 9. Хроматограмма по экстрагированным ионам компонентов бензина: 1 – п-ксилол, 2 – м-ксилол, 3 – о-ксилол. Метод – парофазный анализ без термостатирования, колонка HP-FFAP 50 м, 0.32 мм, 0.50 мкм.

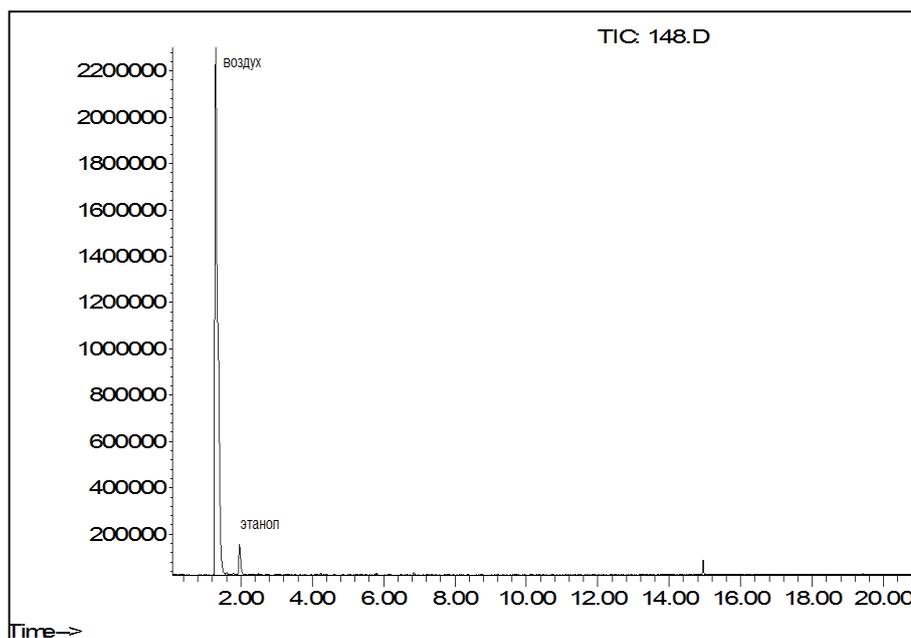


Рисунок 10. Хроматограмма по полному ионному току парогазовой фазы крови женщины 59 лет, госпитализированной после пожара. Метод – парофазный анализ без термостатирования, колонка HP-FFAP 50 м, 0.32 мм, 0.50 мкм.

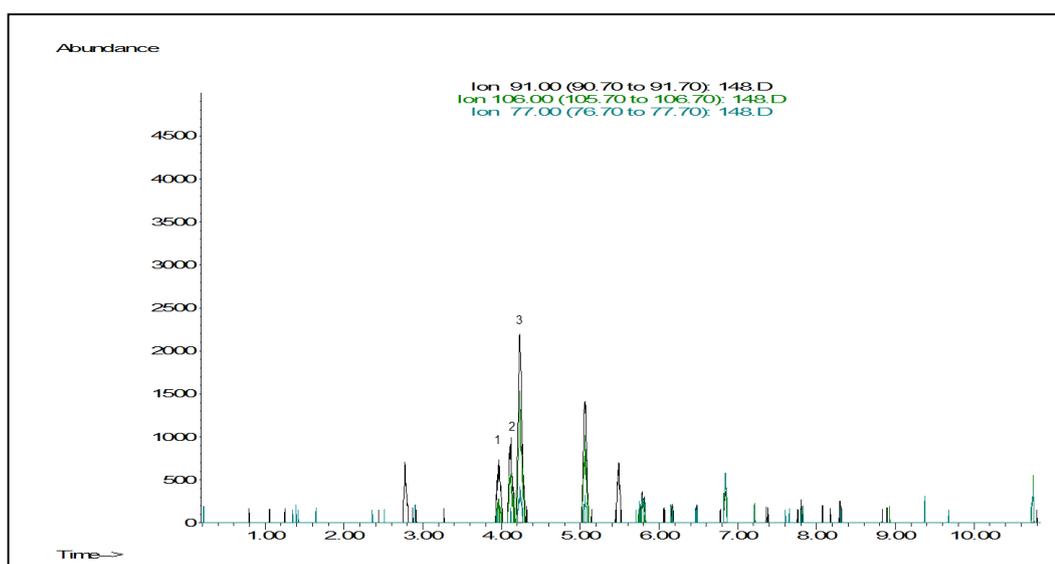


Рисунок 11. Хроматограмма по экстрагированным ионам парогазовой фазы крови женщины 59 лет, госпитализированной после пожара: 1 – п-ксилол, 2 – м-ксилол, 3 – о-ксилол. Метод – парофазный анализ без термостатирования, колонка HP-FFAP 50 м, 0.32 мм, 0.50 мкм.

5.5 ГХ-МС определение компонентов технических жидкостей в биологических объектах методом прямого ввода с хроматографической колонкой HP-FFAP

5.5.1 Приготовление раствора внутреннего стандарта циклогексанола для количественного определения компонентов технических жидкостей, определяемых прямым вводом мочи (этиленгликоль, диэтиленгликоль и вещества близкие им по летучести)

В качестве внутреннего стандарта при определении нелетучих этиленгликоля, диэтиленгликоля и близких им по летучести компонентов, используют циклогексанол. Циклогексанол может быть использован как внутренний стандарт в методе Фиксации Времени Удерживания (ФВУ) для соединений близких по летучести этиленгликолю и диэтиленгликолю.

В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 30 мл этанола, 10 мкл циклогексанола и добавляют дистиллированную воду до метки 100 мл. Концентрация циклогексанола в водном растворе составляет 0,1% по объему.

5.5.2 Приготовление градуировочных растворов (хлорорганических соединений, ароматических летучих веществ, этиленгликоля, диэтиленгликоля, а также других веществ, близких им по летучести)

5.5.2.1 Приготовление градуировочных растворов концентрациями 500 мкг/мл

На чашку аналитических весов, позволяющих взвешивать от 0,1 мг до 150 мг помещают мерный цилиндр вместимостью 20 мл, в цилиндр добавляют 10 мл мочи, записывают массу или тарируют весы.

К 10 мл мочи добавляют 10 мкл вещества, фиксируют массу введенного вещества и добавляют мочу до метки 20 мл. Конечная концентрация раствора составляет 0,05 % об, массовую концентрацию вычисляют по формуле:

$$X_{ст} = \frac{m_{ст}}{20} \text{ (мг/мл)}$$

В случае приготовления смесей из веществ, растворимость которых в воде составляет менее 0,1 %, 10 мкл пробы предварительно вносят в 1 мл этанола и добавляют мочу до 20 мл.

5.5.2.2 Приготовление градуировочных растворов концентрациями 50 мкг/мл

В мерную колбу вместимостью 100 мл вводят 10 мл раствора, приготовленного по п. 5.5.2.1 и добавляют мочу (не содержащую определяемых веществ) до объема 100 мл.

5.5.2.3 Приготовление градуировочных растворов концентрациями 5 мкг/мл

В мерную колбу вместимостью 100 мл вводят 10 мл раствора, приготовленного по п. 5.5.2.2 и добавляют мочу до объема 100 мл.

Для градуировочных измерений отбирают по 1,5 мл растворов, приготовленных согласно п.5.5.2.1-5.5.2.3, вводят 1,5 мкл раствора внутреннего стандарта циклогексанола приготовленного согласно п.5.6.1 при определении этиленгликоля, диэтиленгликоля и веществ близких им по летучести. Концентрация ВС циклогексанола в градуировочной смеси составляет 2,8 мкг/мл. Для каждой градуировочной точки проводят не менее трех определений. Количественный расчет результатов проводят по методу внутреннего стандарта согласно инструкции к прибору.

5.5.3 Подготовка проб мочи для определения малолетучих соединений (гликолей) и ввод внутреннего стандарта

Перед началом исследования замороженный образец необходимо полностью разморозить при комнатной температуре и равномерно перемешать.

Малолетучие соединения: этиленгликоль, диэтиленгликоль и близкие им по летучести, перечисленные в таблице 5, анализируют прямым вводом 1 мкл биожидкости в хроматограф. Мочу предварительно центрифугируют, для анализа отбирают супернатант. Для проведения обзорного анализа отбирают аликвотный объем мочи 800 мкл, добавляют 30 мкл водно-этанольного раствора внутреннего стандарта - циклогексанола и 200 мкл этанола для улучшения хроматографических свойств анализируемой пробы. Концентрация ВС циклогексанола в пробе составляет 2,8 мкг/мл. При проведении этого исследования этанол количественно не определяют.

5.5.4 Аппаратура и условия хроматографирования

Хроматограф с масс-селективным детектором «Маэстро» Agilent Technologies 7820/5975N (или аналогичный) с автосамплером и с колонкой HP-FFAP длиной 50 м, внутренним диаметром 0.32 мм, толщиной пленки неподвижной фазы 0.50 мкм (19091F-115).

Газ-носитель – гелий марки А, постоянный поток через колонку - 1.0 мл/мин, анализ в режиме постоянного потока газа-носителя, скорость потока 1.3 мл/мин. Ввод 1 мкл пробы, с делением потока 1/15. Температура инжектора 180°C, температура интерфейса 190°C. Программа термостата колонок: 60°C (4 мин), 10°C/мин, 190°C (30 мин).

Условия масс-спектрометрического детектирования: режим сканирования по полному ионному току (SCAN), температура источника ионов 230°C, температура анализатора 150°C. Диапазон масс m/z 29-

350 а.е.м. Напряжение на умножителе: результат, полученный при автоматической настройке по перфторбутиламину в режиме lowmass tune.

5.5.5 Результаты исследования

Идентификацию соединений в методе ГХ-МС выполняют по масс-спектрам (используют стандартные библиотеки масс-спектров MPW, NIST, Wiley) и временам удерживания целевых соединений. Количественный расчет проводят по методу внутреннего стандарта с помощью программного обеспечения согласно инструкции к прибору. Времена удерживаний целевых анализов приведены в таблице 5.

Таблица 5

Компоненты технических жидкостей, определяемые в моче
методом прямого ввода на колонке HP-FFAP

	Вещество	мол. масса а.е.м.	Время удержи- вания RT, мин	Масс-спектр (в скобках интенсивность в % от базового пика)	КОЧ (ГХ- ДИП)
1	Ацетальдегид	44,0	1.96	44(81),29(100)	2,7
2	Диметилацеталь формальдегида	76	2.09	75(44),45(100)	2,8
3	Метилформиат	60	2.23	61(100),60(75),45(47)	
4	Ацетон	58	2.60	58(7,7),43(100)	2,6
5	Этилформиат	74,8	2.67	74(1,1),56(0,5),45(33), 31(100)	1,8
6	Метилацетат	74,8	2.67	75(8),74(8),47(3),44 (13), 43(100)	1,7
7	Акролеин		2.94		
8	н-Масляный альдегид	72,11	3.13	73(20),72(25,7),57(31), 43(100)	2,8
9	Этилацетат	88,1	3.25	89(4,7),88(1,2),73(1,2), 70(4,2),61(9,5),45(12), 43(100)	2,0
10	Метанол / изопропилацетат		3.35		2,3
11	Метилэтилкетон	72,1	3.41	73(17),72(14),57(7,6), 43(100)	1,5
12	Изо-валериановый альдегид	86,1	3.61	87(5,2),69(19,3),58 (36,1),41(100)	1,6

13	Пропилацетат	102,1	3.68	89(7,3),59(3,7),57(5,6), 55(2,3),47(16),44(13), 43(40),42(100)	1,8
14	Диметиловый эфир этиленгликоля	90	3.70	91(5,4),69(5,0),58(22) 45(100)	3,4
15	Этанол		3.87		
16	4-метил-пентанон-2 (Метилизобутилкетон)	100,16	4.92	101(12),85(12),58(18), 43(100)	1,2
17	Втор-бутанол	74,1	5.18	75(1,3),73(1,8),63(1,6), 59(12,9),57(26,4), 47(35)	1,4
18	Пропанол-1	60	5.44	61(8,5),59(28,8),57 (4,1),49(4,9),47(54,8), 45(97),43(100),42(60)	1,4
19	Голуол	92,14	5.51	93(7,6),92(82),91(100)	1,2
20	Кротоновый альдегид	70,1	5.58	71(6,7),70(11,6),69 (9,5),48(100)	1,1
21	Бутилацетат	116,2	5.97	116(0,2),73(11),61(10), 56(39),43(100)	1,1
22	Метилбутилкетон	100	6.18	101(35),85(9,3),58(25), 43(100)	1,5
23	Изобутанол	74,1	6.31	73(4,9),59(3,8),57(90), 47(17),45(25),43(59), 41(100)	1,4
24	Пинаколиловый спирт	102,18	6.77	101(2),87(13),85(100), 69(29),57(58),43(31), 41(98)	1,2
25	Изоамилацетат	130,2	6.86	131(4,2),70(25,9),61 (5,7),55(23),43(100)	1,8
26	Бутанол-1	74,1	7.20	73(2,0),56(62),45 (18,5),43(36,2),41(100)	1,4
27	Амилацетат	130,19	7.73	131(7),70(15),61(34), 55(14),43(100)	1,9
28	Метилкапронат	130	7.98	131(81),99(19,8),87 (16,2),74(51),59(25),43 (100)	1,2
29	Лимонен	136	8.04	136(6,2),121(8),107 (11),93(37),79(32),67 (71),53(21)45(100)	

30	Пиридин	79,1	8.11	80(100),79(66),52(57)	1,7
31	Изоамиловый спирт	88	8.35	87(0,89),71(38,2),55(77),45(22,7),41(100)	1,2
32	Моноэтиловый эфир этиленгликоля	90	8.59	91(39),73(62),59(48),45(100),43(50)	2,7
33	н-Амиловый спирт	88,15	8.97	87(0,2),70(24,7),55(81,1),41(100)	1,4
34	Гексанол	102,2	10.61	85(20,9),69(34,5),56(100)	1,6
35	Циклогексанол	100,1	11.52	99(2,6),82(42,7),73(16,2),67(48,8),57(100),41(46,3)	1,0
36	Этилоктаноат	172	11.89		
37	Гептанол-1	116,2	12.15	115(0,8),99(9),97(11),83(7),57(97),43(40),41(100)	1,7
38	Уксусная к-та	60,05	12.25	60(19,6),45(71),43(100)	4,6
39	Фурфурол	96,09	12.69	96(100),95(98),67(12,8),51(9,7),41(11,7)	1,5
40	3,7-Диметил-1,3,7,-октатриен	136	13.41	136(2,3),121(8,6),107(4),105(5),93(37,5),81(19,3),71(49,9),55(51,3),43(100)	
41	Пропионовая к-та	74,8	13.45	74(59),57(52),45(100)	2,6
42	2,3-Бутиленгликоль	90	13.47	91(7,5),73(70),55(12,3),45(100),43(26)	2,7
43	Октанол-1	130,	13.65	83(21),69(40),56(65),41(100)	1,0
44	Бензальдегид	106,1	13.64	105(100),77(90),51(63)	1,0
45	Изо-масляная к-та	88,1	13.82	89(62),73(29),71(43),45(31),43(96),41(100)	2,9
46	1,2-Бутиленгликоль	90	13.97	91(9,3),73(100),55(13),45(69)	
47	1,2-Пропиленгликоль	76	14.21	77(5,5),59(42),45(100),43(28)	3,6
48	Этилдеcanoат	200	14.73		
49	2-Метил-2,4-пентандиол	118	14.64	119(2,3),101(21,8),83(16,5),59(69,5),43(100)	2,0

50	Масляная кислота	88,1	14.66	89(17,8),73(35,6),60(100),55(21),45(47)	2,8
51	Этиленгликоль	62	14.74	63(58),45(100)	4,0
52	Нонанол-1	144,3	14.99	127(1),97(18),83(31),69(58),56(69),55(69),41(100)	1,9
53	Изо-валериановая кислота	102,14	15.19	103(56),85(71),74(18),69(12),60(72),57(30),41(100)	3,2
54	Валериановая кислота	102,1	16.07	103(7,6),85(11,7),73(36,4),60(100),55(25),45(42)	4,1
55	1,3-бутиленгликоль	90	16.18	91(18),72(10),55(37),43(100)	4,5
56	Деканол-1	158,3	16.29	97(14,2),83(29),69(38,4),55(63),41(100)	1,2
57	Анилин	93,1	16.61	93(100),66(58)	7,8
58	Этилдодеcanoат	228	17.27		
59	1,3-пропиленгликоль	76	16.76	77(44),57(100),43(44)	5,1
60	2-Фенилацетат	164	17.39		
61	Ундеканол-1	172,3	17.62	126(2),111(7),97(33),83(37),69(57),55(67),41(100)	1,0
62	1,4-Бутиленгликоль	90	18.67	91(37),73(87),71(38),57(23),55(73),92(100)	4,6
63	2-Фенилэтиловый спирт	122,2	18.82	122(20),105(10),91(100),77(6),65(29)	1,2
64	Энантовая к-та C7OON	130,2	19.03	131(40),113(25),101(10),87(21),73(46),60(100)	3,0
65	Додeciловый спирт	186,3	19.17	111(15),97(26,7),83(38,6),69(53),55(64,3),41(100)	3,2
66	beta-Ионон	192,3	19.28	193(10),177(81),105(11),91(17),43(100)	2,6
67	Фенол, 2-MeO, 4-Me	138	19.60		
68	Диэтиленгликоль	106	19.72	107(3),89(5),75(6),45(100)	9,7

69	Фенол, 2-МеО, 4-Et-	152	20.96		
70	Фенол	94,1	20.37	94(100),66(47)	1,3
71	Коричный альдегид	132,2	21.62	131(100),103(48),78 (37),63(13),51(43)	2,2
72	Фенол, 2-МеО, 4-Pr-	166	22.71		
73	Тимол	150	24.39		0,8
74	о-Ванилин	152,5	24.82	153(11),152(100),151 (96)	
75	Этилгексадеканат	284	26.09		

5.6 ГХ-МС метод для идентификации и количественного определения летучих токсичных соединений с колонкой HP-5MS

Метод ГХ-МС с колонкой HP-5ms длиной 30 м, внутренним диаметром 0.25 мм, толщиной пленки неподвижной фазы 0.25 мкм обычно используют для определения психоактивных веществ. Возможности этой колонки не позволяют хроматографировать на ней легкие полярные соединения, такие как метанол и этанол. Однако, возможности этой колонки позволяют получить корректные хроматографические пики большинства растворителей «тяжелее» этилацетата.

5.6.1 Приготовление градуировочных растворов

См. раздел 5.4.1

5.6.2 Пробоподготовка

См. раздел 5.4.2.

5.6.3 Аппаратура и условия хроматографирования

Хроматограф с масс-селективным детектором Agilent Technologies 6890/5973N, 5975, 5977 с колонкой HP-5ms длиной 30 м, внутренним диаметром 0.25 мм, толщиной пленки неподвижной фазы 0.25 мкм

Газ-носитель – гелий марки А, постоянный поток через колонку - 0.6 мл/мин, ввод парогазовой пробы объемом 50 мкл с делением потока 1/10. Уровень опускания иглы шприца позиционируют на 23 мм от минимального нижнего значения для того, чтобы отбор пробы происходил из парогазового пространства над объектом. Температура инжектора 270°C, температура

интерфейса 280°C. Программа термостата колонок: 60°C (4 мин), 10°C/мин, 190°C (30 мин).

Масс-спектрометрическое детектирование в режиме сканирования по полному ионному току (SCAN), температура источника ионов 230°C, температура анализатора 150°C. Диапазон масс m/z 29-350 а.е.м. Напряжение на умножителе: результат, полученный при автоматической настройке по перфторбутиламину в режиме lowmass tune. Градуировку прибора для проведения количественного анализа выполняют по методу внутреннего стандарта согласно инструкции к прибору.

5.6.4 Результаты исследования

Идентификацию соединений в методе ГХ-МС выполняют по масс-спектрам и временам удерживания целевых соединений, также для идентификации используют стандартные библиотеки масс-спектров MPW, NIST, Wiley. Перед каждым исследованием анализируют фон воздуха помещения (бланковый образец) из пустой виалы. В фоне не должны детектироваться пики целевых соединений.

На рис. 12 представлена хроматограмма смеси летучих органических соединений, добавленных в кровь по 3,2 г/л.

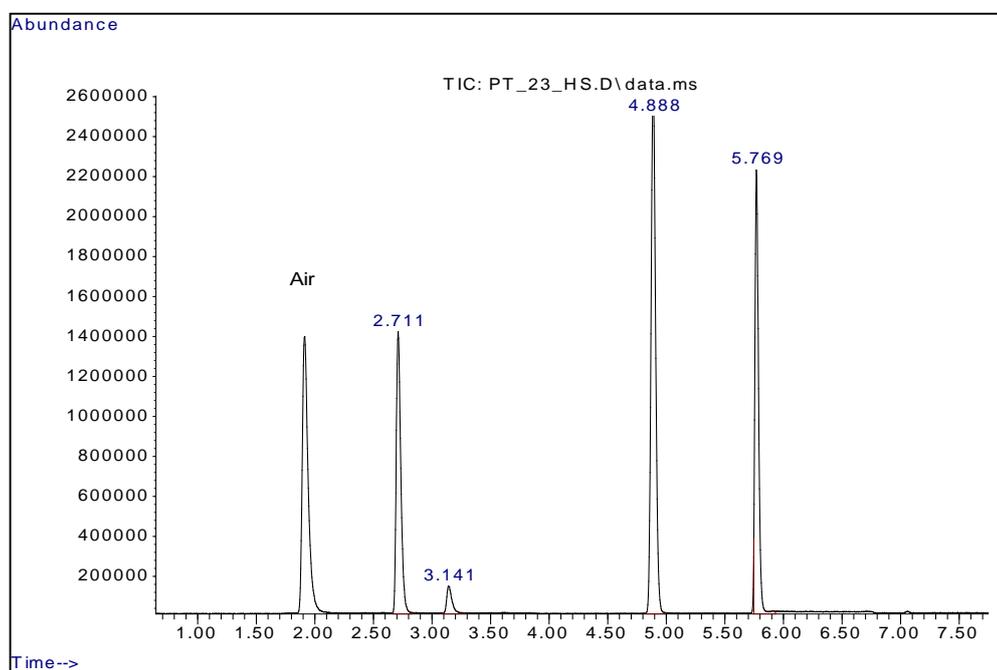


Рисунок 12. Хроматограмма смеси летучих органических соединений, добавленных в кровь по 3,2 г/л. ГХ-МС Agilent 7820/5975 с колонкой HP-5ms 30 м, 0.25 мм, 0.25 мкм. Времена удерживания: воздух – 2,00 мин, этилацетат – 2,71 мин, бутанол-1 – 3,14 мин, толуол – 4,88 мин, бутилацетат – 5,76 мин.

5.7 ГХ-ДИП метод обнаружения и количественного определения этанола и других летучих веществ с колонкой HP-FFAP

5.7.1 Приготовление градуировочных растворов

См. разделы 5.4.1, 5.5.1 - 5.5.2, в зависимости от цели исследования.

5.7.2 Пробоподготовка

См. разделы 5.5.1, 5.5.3, в зависимости от цели исследования.

5.7.3 Аппаратура и условия хроматографирования

Хроматограф с пламенно-ионизационным детектором Agilent Technologies 6890 (или аналогичный) с капиллярной колонкой HP-FFAP длиной 50 м, внутренним диаметром 0,32 мм, толщиной пленки неподвижной фазы 0,50 мкм (19091F-115).

Для ГХ-ДИП анализа используют газ-носитель азот, расход газа носителя при 60°C - 1 мл/мин, линейная скорость газа-носителя 19,8-22,2 см/с. Температура испарителя хроматографа составляет 180°C. Температура пламенно-ионизационного детектора 210°C.

Ввод пробы осуществляют в режиме с делением потока (split) 1/3 для парофазного анализа и при делении потока 1/15 при прямом вводе пробы. Объем вводимой пробы при парофазном анализе 50 мкл, при вводе в хроматограф жидкой пробы ее объем составляет 1 мкл.

При направленном определении этанола, метанола, изопропанола и ацетона в крови, моче или слюне время анализа составляет 6,5 мин. После каждых 50 анализов желательно кондиционировать прибор в течение часа при температуре термостата колонок 210°C.

Калибровку по давлению газа-носителя в методе ФВУ выполняют согласно инструкции, прилагаемой к приборам по внутренним стандартам: циклогексанолу (вещества см. табл.5) и по пропанолу-1 (вещества см. табл. 4), времена удерживания которых в выбранных условиях хроматографирования составляют 12.38 (циклогексанол) и 6.32 мин (пропанол-1).

Градуировку прибора для проведения количественного анализа выполняют по методу внутреннего стандарта согласно инструкции к прибору.

5.7.4 Результаты исследования

Времена удерживания определяемых соединений для колонки HP-FFAP представлены в таблицах 4 и 5.

5.8 ГХ-ДИП метод определения этанола и других летучих веществ, обнаружение компонентов «газа для зажигалок» и газов-пропеллентов дезодорантов: пропана, изобутана, бутана с колонкой HP-V ALC

5.8.1 Приготовление градуировочных растворов

См. раздел 5.4.1.

5.8.2 Пробоподготовка

См. разделы 5.4.2

5.8.3 Аппаратура и условия хроматографирования

Хроматограф с пламенно-ионизационным детектором Agilent Technologies 6890 (или аналогичный) с колонкой HP-V ALC длиной 7,5 м, внутренним диаметром 0,32 мм, толщиной пленки неподвижной фазы 0,20 мкм(19091S-510).

Температура термостата колонок 120°C (1мин.), 25°C/мин, 165°C (1мин.). Анализ в режиме постоянного давления газа-носителя. Газ-носитель – азот, давление которого составляет 7.62 p.s.i., скорость потока при 120°C составляет 3 мл/мин. Температура испарителя хроматографа 180°C, температура пламенно-ионизационного детектора 250 °C при расходе поддувочного газа (азот) 20 мл/мин. Расход воздуха и водорода для питания пламенно-ионизационного детектора 300 мл/мин и 30 мл/мин, соответственно. Ввод пробы осуществляют в режиме с делением потока (split) 1/10 для парофазного анализа. Объем вводимой пробы газоплотным шприцем при парофазном анализе 50 мкл. Уровень опускания иглы позиционируют на 23 мм от минимального нижнего значения.

При направленном определении этанола, метанола, изопропанола и ацетона в крови, моче или слюне время анализа составляет 3,8 мин. После каждых 50 анализов необходимо кондиционировать прибор в течение часа при температуре термостата колонок 270°C.

Градуировку прибора для проведения количественного анализа выполняют по методу внутреннего стандарта согласно инструкции к прибору.

5.8.4 Результаты исследований

Времена удерживания компонентов технических жидкостей даны в таблице 4. На рис. 13 представлена хроматограмма спиртов C1-C4 и ацетона для колонки HP-V ALC, на рис. 14-16 – так называемые «бланковые»

хроматограммы воздуха лаборатории, а также парогазовых фаз образцов крови и мочи взятых от живого обследуемого, не употреблявшего алкоголь.

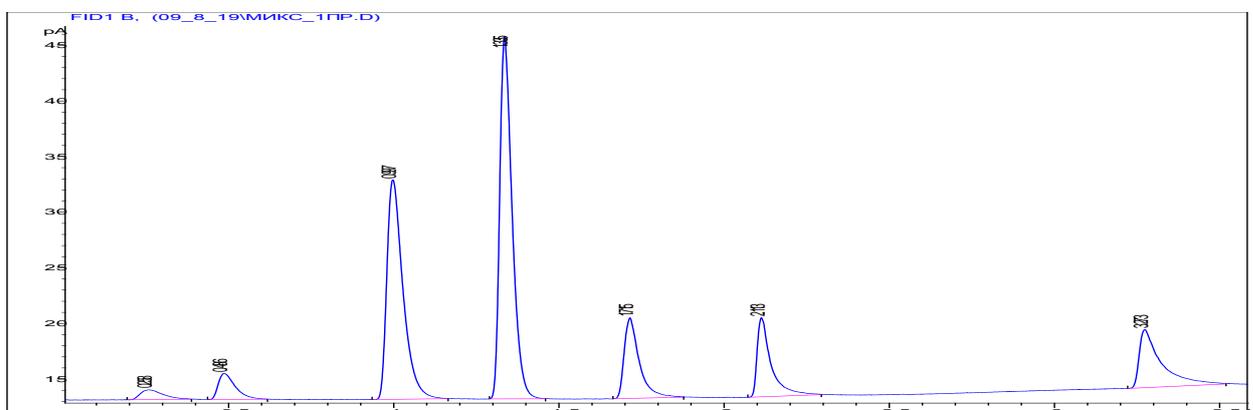


Рисунок 13. Хроматограмма градуировочной смеси летучих органических соединений, добавленных в кровь по 0,8 г/л. ГХ-ДИП Agilent 6890 с колонкой HP-V ALC 7.5 м, 0.32 мм, 0.20 мкм. Времена удерживаний (RT): отклик на ввод пробы – 0,26 мин, метанол – 0,49 мин, этанол – 0,99 мин, ацетон - 1,336 мин, изопропанол – 1,72 мин, н-пропанол – 2,11 мин, н-бутанол – 3,27 мин.

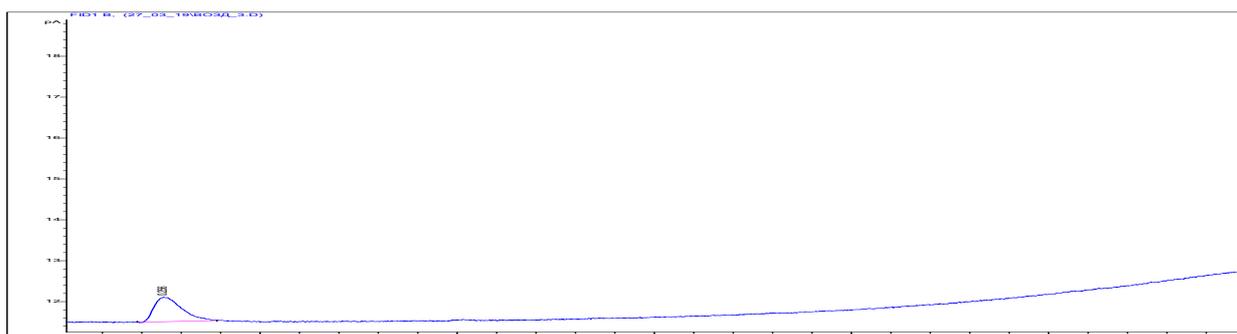


Рисунок 14. Хроматограмма 50 мкл воздуха лаборатории. ГХ-ДИП Agilent 6890 с колонкой HP-V ALC 7.5 м, 0.32 мм, 0.20 мкм. Время удерживания (RT): отклик на ввод пробы – 0,26 мин, целевые аналиты не выявлены.

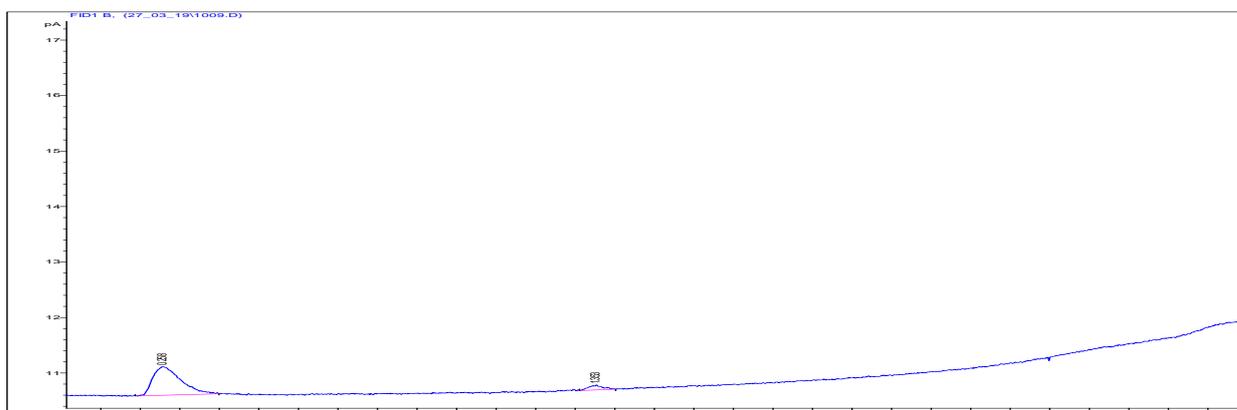


Рисунок 15. Хроматограмма крови, не содержащей целевых веществ. ГХ-ДИП Agilent 6890 с колонкой HP-V ALC 7.5 м, 0.32 мм, 0.20 мкм. Времена удерживаний (RT): отклик на ввод пробы – 0,26 мин, ацетон - 1,336 мин.

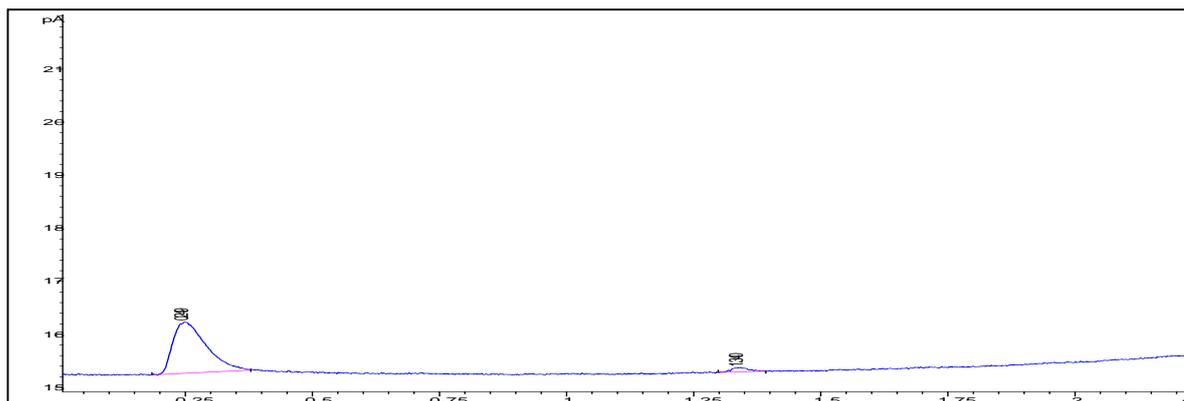


Рисунок 16. Хроматограмма мочи, не содержащей целевых веществ. . ГХ-ДИП Agilent 6890 с колонкой HP-B ALC 7.5 м, 0.32 мм, 0.20 мкм. Времена удерживаний (RT): отклик на ввод пробы – 0,26 мин, ацетон - 1,336 мин.

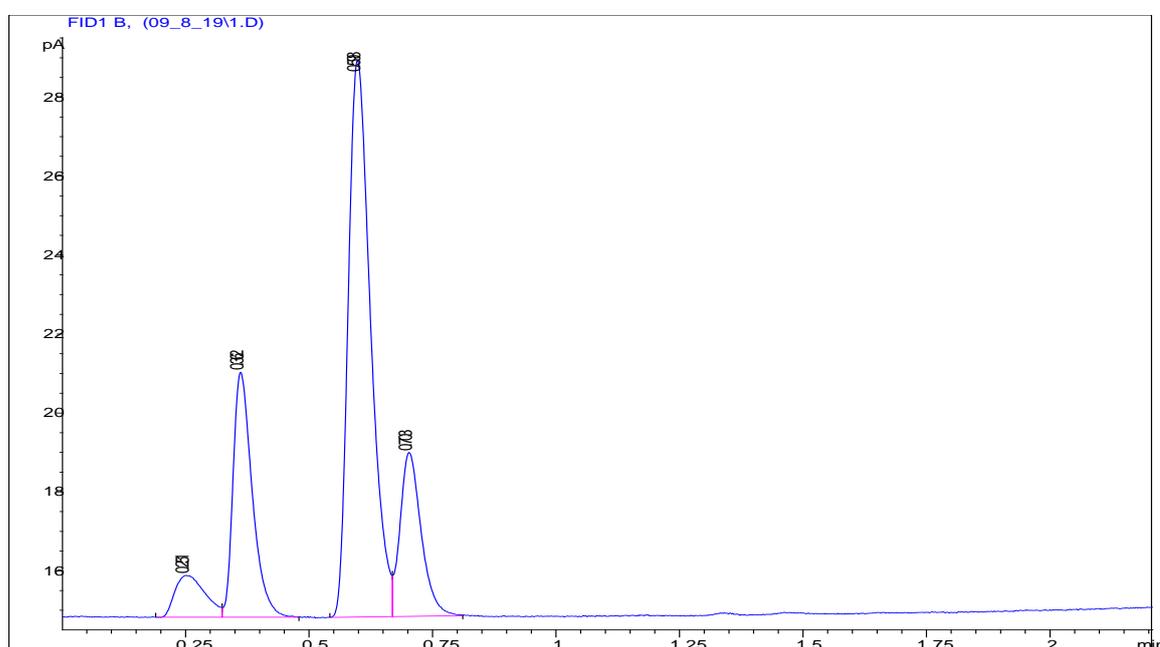


Рисунок 17. Хроматограмма смеси летучих органических соединений, добавленных в мочу из баллончика с освежителем воздуха «GOLD WIND Citrus» способом барботирования. ГХ-ДИП Agilent 6890 с колонкой HP-B ALC 7.5 м, 0.32 мм, 0.20 мкм. Времена удерживаний (RT): отклик на ввод пробы – 0,251 мин, пропан – 0,362 мин, изобутан – 0,598 мин, н-бутан - 0,703 мин.

На рис. 17 и 18 представлены хроматограммы и времена удерживаний пропана, изобутана и бутана для колонки HP-B ALC. Хроматографические данные о составе пропеллентов были получены методом барботирования в кровь и мочу содержимого зажигалок, дезодорантов, аэрозольного освежителя воздуха (рис. 19) и сжиженного хладагента (рис.20).

На рис. 21 и 22 представлены хроматограммы парогазовой фазы крови от живых лиц, госпитализированных в состоянии интоксикации в отделение реанимации и интенсивной терапии.

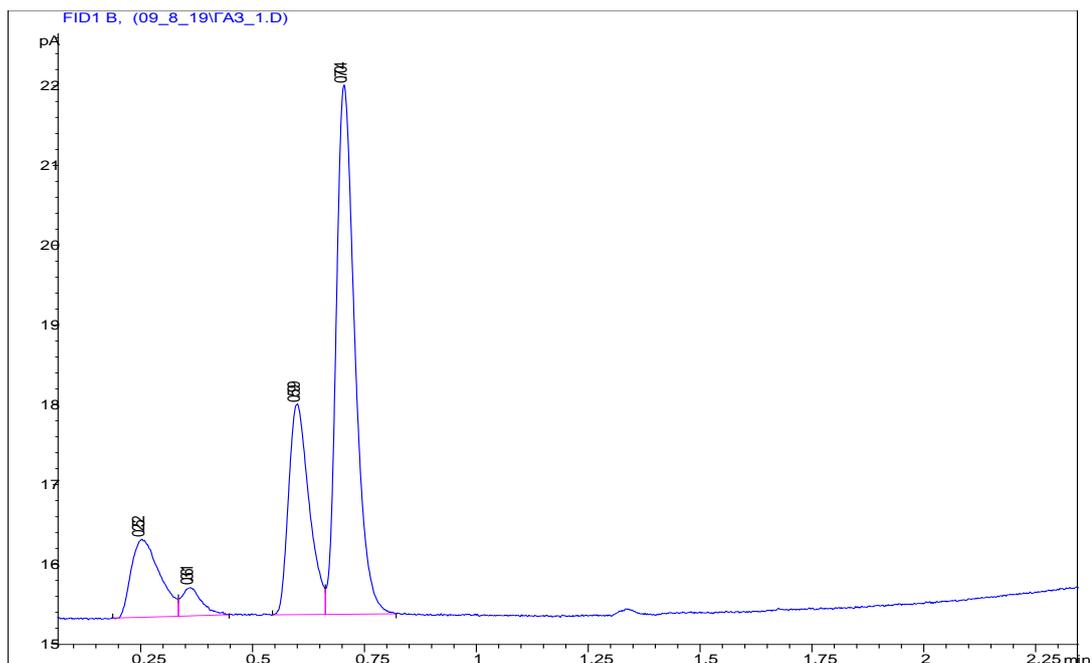


Рисунок 18. Хроматограмма смеси летучих органических соединений, добавленных в мочу из газовой зажигалки способом барботирования. ГХ-ДИП Agilent 6890 с колонкой HP-V ALC 7.5 м, 0.32 мм, 0.20 мкм. Времена удерживаний (RT): отклик на ввод пробы – 0,252 мин, пропан – 0,361 мин, изобутан – 0,599 мин, н-бутан - 0,704 мин.

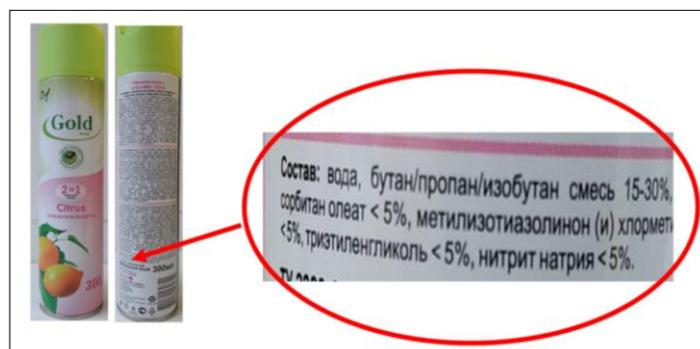


Рисунок 19. В состав содержимого баллончика с освежителем воздуха «GOLD WIND Citrus, заявленный производителем, входят пропан, бутан, изобутан.



Рисунок 20. Состав хладагента R 600 А, заявленный производителями – изобутан.

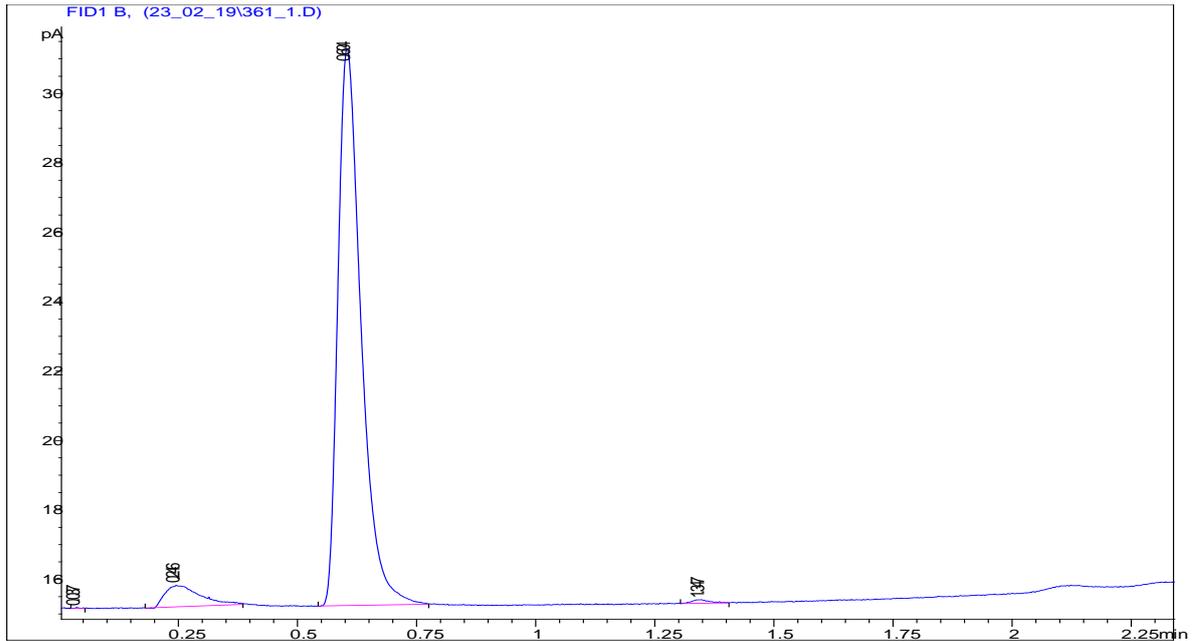


Рисунок 21. Хроматограмма парогазовой фазы крови ребенка 11 лет (муж), госпитализированного в отделение реанимации и интенсивной терапии в состоянии интоксикации. ГХ-ДИП Agilent 6890 с колонкой HP-V ALC 7.5 м, 0.32 мм, 0.20 мкм. Времена удерживаний (RT): 0,249 мин (фоновый пик), изобутан – 0,604 мин, ацетон – 1,347

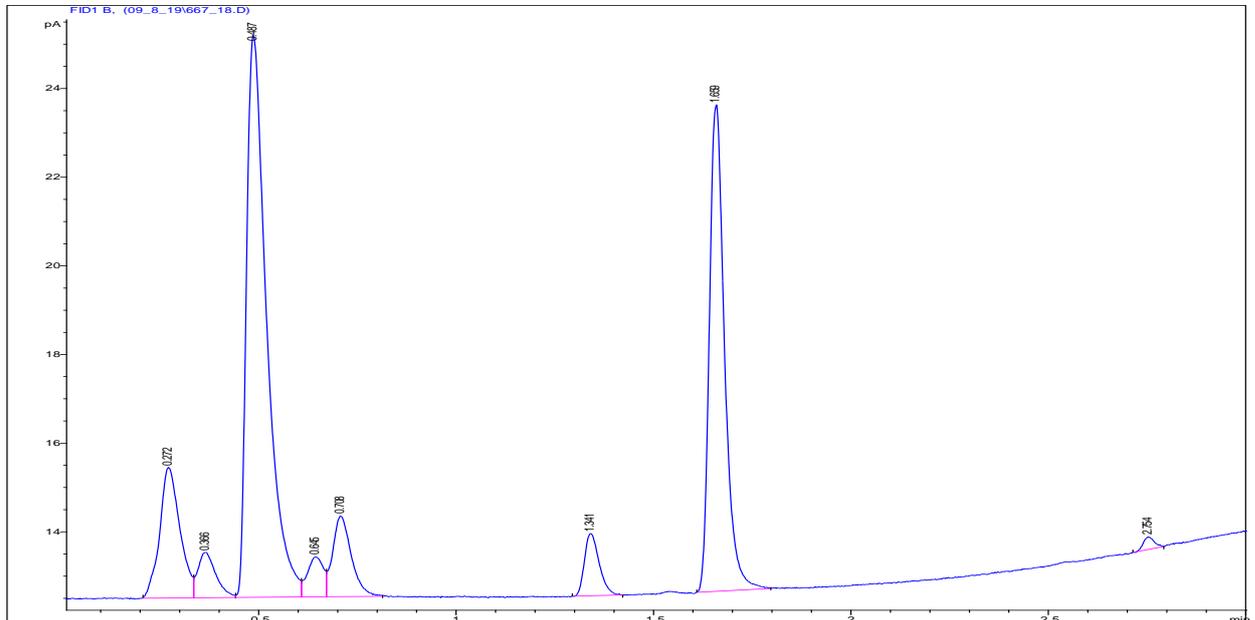


Рисунок 22. Хроматограмма парогазовой фазы крови мужчины 47 лет, госпитализированного в отделение реанимации и интенсивной терапии в состоянии комы. ГХ-ДИП Agilent 6890 с колонкой HP-V ALC 7.5 м, 0.32 мм, 0.20 мкм. Времена удерживаний (RT): 0,249 мин (фоновый пик), пропан – 0,361 мин, метанол (6,68 г/л) – 0,487 мин, изобутан – 0,599 мин, н-бутан - 0,704 мин, ацетон (0,41 г/л) – 1,347, изопропанол (2,33 г/л) – 1,66 мин. В данном случае практически невозможно дифференцировать происхождение ацетона - упортебленный, или эндогенный (маркер стресса), или новообразованный (результат окисления изопропанола).

5.9 Эффективность использования метода Парофазного Анализа без Термостаивания

5.9.1. Оперативный контроль качества измерений

Перед анализом исследуемых проб анализируют образец биожидкости с введенным известным содержанием целевых определяемых компонентов. Содержание компонентов выбирают как утроенную предельно определяемую концентрацию. ПРО (пределы определения) целевых компонентов приведены в табл. 4 и 5. После анализа образцов биожидкостей с введенным содержанием определяемых веществ анализируют биологическую жидкость заведомо не содержащую целевых компонентов. Анализ контрольных положительных и отрицательных проб позволяет оценить чувствительность и селективность аналитической системы и отсутствие ложноположительных результатов, связанных с перекрестными загрязнениями при подготовке пробы или химической "памятью" системы от предыдущих вводов. Результаты анализа контрольных положительных и отрицательных проб документируются и хранятся в архиве вместе с результатами анализа исследуемых проб. Даты анализа контрольных и исследуемых проб должны совпадать. Анализ контрольных проб проводится ежедневно перед началом анализа исследуемых образцов. При необходимости результаты контрольных анализов представляют вместе с результатами экспертизы в судебные или иные контролирующие органы для подтверждения надежности и правильности результатов экспертизы.

5.9.2. Достоверность метода

Показатели правильности методики выполнения измерений. Обнаружение определяемых соединений проводят по временам удерживания (полученным по методу ФВУ) и масс-спектрам (в методе полного сканирования SCAN) и соотношения интенсивностей детектируемых ионов (в методе мониторинга по выбранным ионам SIM). Выявление хроматографических и масс-спектрометрических наложений проводят по совпадению вершин пиков ионов (базового и подтверждающих).

Погрешность определения для метода ГХ-МСД не должна превышать 10% и 5% на уровне определяемых концентраций 0,005-0,5 и 0,5–1000 мг/мл, соответственно. Для метода ГХ-ДИП погрешность определения не должна превышать 10% и 5% на уровне определяемых концентраций 0,5-5 и 5 –1000 мг/мл, соответственно.

6. Методы определения этилглюкуронида – прямого метаболита этанола

Обнаружение и определение этилглюкуронида в различных биологических объектах используется для установления ретроспективы употребления этанола, что важно при судебно-медицинской экспертизе живых лиц и трупов. Этилглюкуронид определяется в моче в течение нескольких часов после того, как этанол уже не определяется в крови, и это является прямым доказательством употребления алкоголя. Иногда, для выявления употребления алкоголя в течение длительного промежутка времени, определяют EtG в волосах (длина пряди волос 1 см соответствует примерно 1-месячному промежутку времени) или в ногтевых пластинах.

После приема различных доз этанола этилглюкуронид появляется в сыворотке примерно через 45 мин после появления алкоголя в крови. Максимальная концентрация этилглюкуронида в крови достигается в промежутке от 2,0 до 3,5 часов, при этом, имеются значительные индивидуальные отклонения. Если этанол в крови обнаруживают до 5,0-7,0 часов после употребления алкоголя, этилглюкуронид в крови обнаруживали до 10-14 часов после употребления [27]. Максимальный уровень этилглюкуронида в сыворотке показывает широкие индивидуальные вариации и не коррелирует с уровнем этанола в сыворотке. Концентрация этилглюкуронида в моче обычно намного выше концентрации в сыворотке. Среднее время обнаружения этилглюкуронида в моче составляет 30 часов [27].

По мнению ряда авторов, этилглюкуронид в моче может быть обнаружен в интервале до 80 часов после употребления алкоголя [40]. Часто это наблюдается у зависимых от алкоголя пациентов, госпитализированных в клиники в состоянии абстиненции. В результате 3 и более дней воздержания от алкоголя, этанол в крови и в моче не детектируется, в то время как в моче выявляется этилглюкуронид в значительной концентрации (выше 1500 нг/мл).

Заслуживают особого внимания случаи, когда этанол в крови обнаружен, но этилглюкуронид не выявляется. Следует учитывать, что этанол элиминируется в кровь с определенной скоростью, а этилглюкуронид начинает накапливаться только через некоторое время после появления этанола в крови. Также такое соотношение может быть результатом микробиальной активности (например, при неправильном хранении проб или при гниении) в биологических образцах от лиц, не употреблявших алкоголь, либо контаминации образца этанолом.

6.1 Предварительное выявление этилглюкуронида иммунохроматографическим методом

Иммунохроматографический метод исследования с помощью тест-полосок применим как предварительный для определения этилглюкуронида в биологических жидкостях. Каждая тест-полоска предназначена для исследования 1 образца биологической жидкости.

Исследование основано на принципе иммунохроматографического анализа, при котором анализируемый образец абсорбируется поглощающим участком полоски и, при наличии в образце этилглюкуронида, последний вступает в реакцию со специфическими мечеными антителами, образуя комплекс «антиген-антитело». Этот комплекс не вступает в реакцию конкурентного связывания с антигеном, иммобилизованным в тестовой зоне, и полоса розового цвета на уровне тестовой зоны не выявляется, что говорит о наличии этилглюкуронида в образце.

При отсутствии в образце этилглюкуронида, или, когда его концентрация ниже порового уровня, антиген, иммобилизованный в тестовой зоне, вступает в реакцию с мечеными антителами, в результате чего на уровне тестовой зоны выявляется полоса розового цвета, что говорит об отсутствии этилглюкуронида в анализируемом образце.

Не прореагировавшие компоненты теста связываются на уровне контрольной полосы, образуя полосу розового цвета в этой области. Это свидетельствует о правильности проведения анализа и правильности работы компонентов полосок.

Техника выполнения иммунохроматографического анализа с применением тест-полосок состоит в следующем: биосенсор опускают в анализируемый образец не выше контрольной линии. После того, как образец поднимется на всю тестовую зону, кладут биосенсор на ровную поверхность. Результаты реакции оценивают визуально в течение 10 - 20 минут (рис. 23, 24), или измеряют при помощи приборов (анализаторы, основанные на принципе отражательной фотометрии - Рефлеком, ИК200609 или аналогичные), когда тест-полоски предназначены конкретно для данного вида оборудования (рис.25).

Необходимо исследовать на этилглюкуронид все доступные среды, представленные для анализа (кровь, мочу, межклеточную жидкость и т.д.). Если хотя бы в одном из объектов на предварительном этапе выявлен EtG, проводят исследование подтверждающими методами.



Рисунок 23. Результаты предварительного иммунохроматографического исследования образцов мочи, взятых у водителей транспортных средств при проведении медицинского освидетельствования на состояние опьянения. В образце 1 этанол не обнаружен – EtG не обнаружен. В образце 2 с содержанием этанола 0,97 г/л – EtG обнаружен. В образце 3 с содержанием этанола 0,33 г/л – EtG обнаружен.

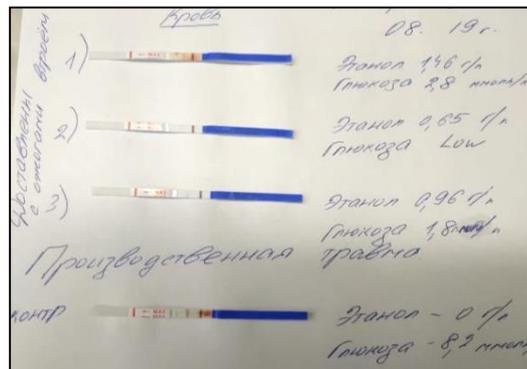


Рисунок 24. Результаты предварительного иммунохроматографического исследования на этилглюкуронид образцов крови пациентов, пострадавших в результате пожара и госпитализированных с ожогами в отделение реанимации и интенсивной терапии: в образцах 1, 2 и 3 выявлены как этанол, так и EtG. Концентрация глюкозы в образцах 1 и 3 снижена, в образце 2 – ниже порога обнаружения. В контрольном образце крови от живого лица, не употреблявшего алкоголь в течение 5 дней (нижняя тест-полоска) EtG не обнаружен.

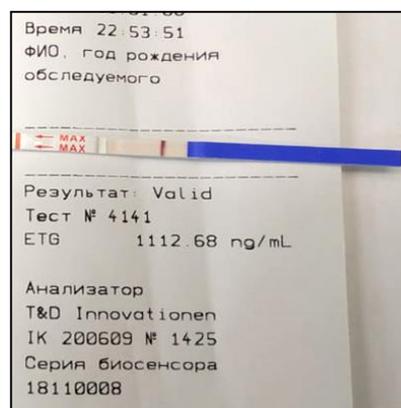


Рисунок 25. Пример результатов полуколичественного измерения содержания EtG в образце крови 3 (см. рис.24) на анализаторе ИК200609 на предварительном этапе исследования.

6.2 Определение этилглюкуронида методом ВЭЖХ-МС/МС

6.2.1 Пробоподготовка

6.2.1.1 Подготовка проб крови для определения этилглюкуронида

К 200 мкл образца крови добавляют 1000 мкл метанола, встряхивают на вибротриксере 1 мин, центрифугируют при 14 000 об/мин в течение 2 мин, органический слой отделяют и упаривают досуха в токе воздуха при 40 °С. К сухому остатку добавляют 100 мкл деионизованной воды, 5 мкл экстракта вводят в хроматограф.

Калибровку приборов выполняют с использованием образцов крови с известным введенным содержанием этилглюкуронида (0.2, 0.4, 0.8, 1.5 мкг/мл).

6.2.1.2 Подготовка проб мочи для определения этилглюкуронида

К 200 мкл мочи добавляют 1000 мкл метанола, встряхивают на вибротриксере 1 мин, центрифугируют при 14 000 об/мин в течение 2 мин, 5 мкл смеси вводят в хроматограф.

Калибровку приборов выполняют с использованием образцов мочи с известным введенным содержанием этилглюкуронида (1.5, 2.0, 4.0, 8.0 мкг/мл).

6.2.1.3 Подготовка проб волос и ногтевых пластин

100 мг образца волос или ногтевых пластин отмывают с применением моющих средств (мыло, шампунь), высушивают и измельчают ножницами. Настаивают в 1 мл метанола в течение 4 ч при температуре 40 °С в ультразвуковой бане. Центрифугируют при 14 000 об/мин в течение 2 мин, органический слой отделяют и упаривают досуха в токе воздуха при 40 °С. К сухому остатку добавляют 100 мкл деионизованной воды, 5 мкл экстракта вводят в хроматограф.

Калибровку приборов выполняют с использованием водных растворов с известным введенным содержанием этилглюкуронида (0.2, 0.4, 0.8, 1.5 мкг/мл).

6.2.2 Аппаратура ВЭЖХ-МС/МС и условия хроматографирования и масс-спектрометрического детектирования

6.2.2.1 Метод ВЭЖХ-МС/МС с масс-селективными детекторами ионная ловушка и тройной квадруполь в изократическом режиме элюирования

Предварительный анализ выполняли на приборе Toxtyper фирмы Bruker с масс-спектрометрическим детектором ионная ловушка, жидкостным

хроматографом Dionex Ultimate 3000 и колонкой Acclaim® RSLC 120 C18 2.2 μm , 120A 2.1 \times 100 mm (Dionex).

Подтверждающий анализ выполняли на ВЭЖХ-МС/МС Shimadzu 8050 с тандемным трехквадрупольным детектором и колонкой Agilent Eclipse C 1.8, μm , 2.1 \times 100 mm (Agilent).

Условия хроматографирования были одинаковыми для двух приборов.

Элюент А: Деионизованная вода (HPLC grade), 0.1% муравьиной кислоты, 2 mM формиата аммония, 1% ацетонитрил.

Элюент В: Ацетонитрил (HPLC grade), 0.1% муравьиной кислоты, 2 mM формиата аммония, 1% деионизованной воды.

Режим хроматографирования – изократический, 10% элюента В.

Поток через колонку - 0.3 мл/мин, температура термостата колонок – 40 °С.

Объем вводимой пробы - 5 мкл.

Условия масс-спектрометрического детектирования.

Для прибора Toxtyper Bruker:

Детектирование спектров MS2 в режиме отрицательной ионизации. Прекурсор-ионы - m/z 221.

Параметры источника ионизации (Source Parameters): температура осушающего газа (Dry Temp) – 320°C, поток осушающего газа Gas Flow - 8.0 л/мин, давление на распылителе (Nebulizer) - 2.0 bar, напряжение на капилляре (Capillary) – 4500 V, End Plate Offset – 500 V, MS/MS (Frag Amp) - 0.8 V.

Для прибора Shimadzu 8050:

Детектирование в режиме MRM с одновременной регистрацией полных спектров целевых веществ при отрицательной ионизации. Прекурсор-ионы - m/z 221, 443. MRM переходы: m/z 221 – 113, 221 – 129, 221 – 85, 221 – 75 при энергии коллизии 22, поток столкновительного (CID) газа (аргон) - 270 Кпа.

Параметры источника ионизации (Source Parameters): температура осушающего газа (DL Temp) – 250°C, температура нагреваемого газа (Heating Gas Flow) – 300°C, поток осушающего газа (Drying Gas Flow) - 10.0 л/мин, поток нагреваемого газа (Heating Gas Flow) - 10.0 л/мин, поток через распылитель (Nebulizing gas flow) - 3.0 л/мин, напряжение на капилляре (Capillary) – 3000 V.

6.2.2.2 Метод ВЭЖХ-МС/МС с масс-селективным детектором тройной квадруполь в градиентном режиме элюирования

ВЭЖХ-МС анализ проводили с использованием системы: хроматограф – трехквадрупольный масс-спектрометр ACQUITY Xevo TQ-S micro IVD (Waters Corporation, США). В качестве элюентов использовали 0,1% раствор муравьиной кислоты с добавлением 2 мМ/л формиата аммония и 1% ацетонитрила (А) и раствор ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислотой, 2 мМ/л формиата аммония и 1% деионизированной воды (В).

Градиентное элюирование на аналитической нанокolonке проводили по программе: 0 – 2 мин – 5% В; 2,1 мин – 99% В; 4 мин – 99% В; 8 мин – 99% В; 8,1 мин – 7.5–5% В; 11 мин – 5% В. Скорость потока – 0,3 мл/мин. Температура термостата – 40°C. Время анализа – 11 минут.

Масс-спектрометрическое детектирование проводилось в условиях электроспрей ионизации в режиме регистрации отрицательных ионов методом мониторинга выбранных реакций (МВР). Параметры масс-спектрометрического детектора были следующие: Напряжение на капилляре – 2 кВ, напряжение на конусе – 25В, температура десольватации – 600°C, энергия коллизии – 23 эВ. Скорость потока газа десольватации – 1000 л/ч. Были выбраны следующие МВР переходы для этилглюкуронида:

m/z иона-предшественника	m/z иона-продукта
221	75
221	85
221	113

6.2.2.3 Метод ВЭЖХ-МС/МС с масс-селективным детектором высокого разрешения в градиентном режиме элюирования

Анализ выполняли на приборе, включающем масс-спектрометрический детектор высокого разрешения maXis impact и жидкостный хроматограф Elute UHPLC фирмы Bruker Daltonik GmbH (Германия). Хроматографическая колонка: Intensity Trio C18 3.0 μm , 2.1 x 150 mm (Bruker).

Условия градиентного элюирования.

Элюент А: Деионизованная вода (HPLC grade), 5 mM формиата аммония, 1 % метанол.

Элюент В: Метанол (HPLC grade), 0, 5 mM формиата аммония, 1 % деионизованной воды.

Поток через колонку - 0.25 мл/мин, температура термостата колонок - 35°C. Объем вводимой пробы - 2 мкл.

Программа градиента:

Time(min)	Flow (ml/min)	%A	%B
0.00	0.25	100.0	0
2.00	0.25	97.0	3.0
3.00	0.25	50.0	50.0
3.50	0.25	50.0	50.0
3.60	0.25	100.0	0.0
6.00	0.25	100.0	0.0

Условия масс-спектрометрического детектирования.

Регистрировали спектр продукт-ионов (режим MRM) при энергии соударений -15 V, прекурсор-ион: m/z 221,0661. Детектирование в режиме отрицательной ионизации. Диапазон масс: m/z 30-500. Источник: ionBooster. Напряжение на капилляре 1000 V. Температура десольватации – 400°C. Скорость потока газа десольватации – 4,0 л/мин. Небулайзер: 4 Bar. Температура осушающего газа 250°C.

6.2.3 Результаты исследований

На рис. 26-35 представлены хроматографические профили, полученные при определении этилглюкуронида в различных биологических объектах методом ВЭЖХ-МС/МС.

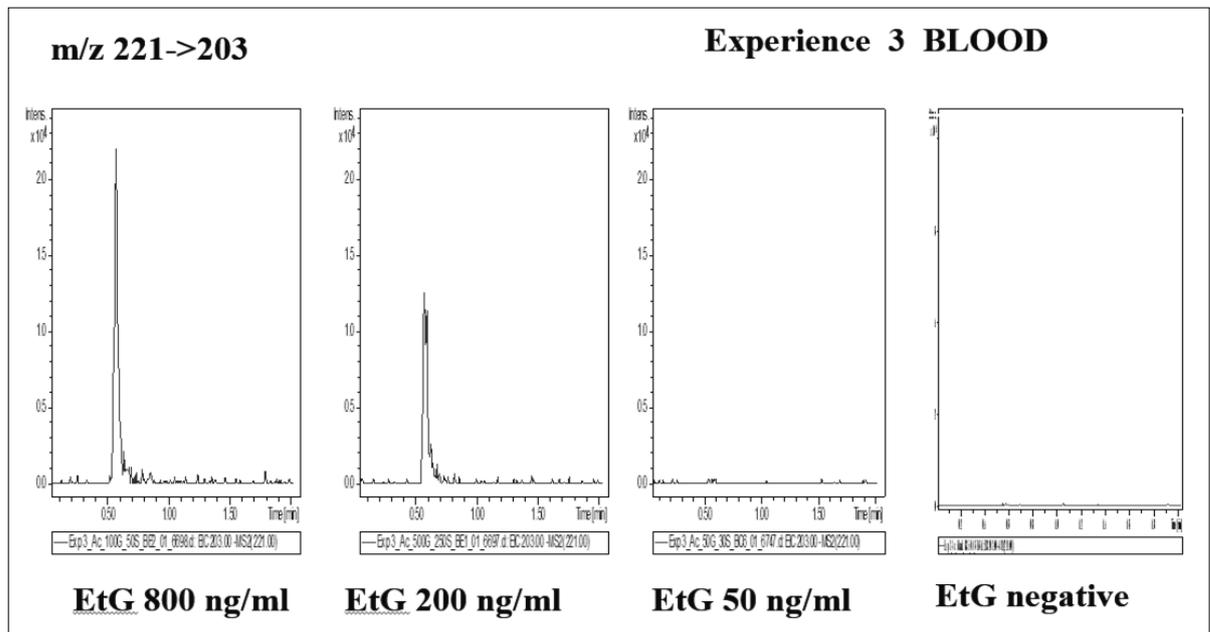


Рисунок 26. Хроматограммы серии градуировочных измерений на приборе Toxтurer Bruker растворов этилглюкуронида, приготовленных на основе цельной крови. Условия хроматографирования и масс-спектрометрического детектирования см.п.6.2.2.1

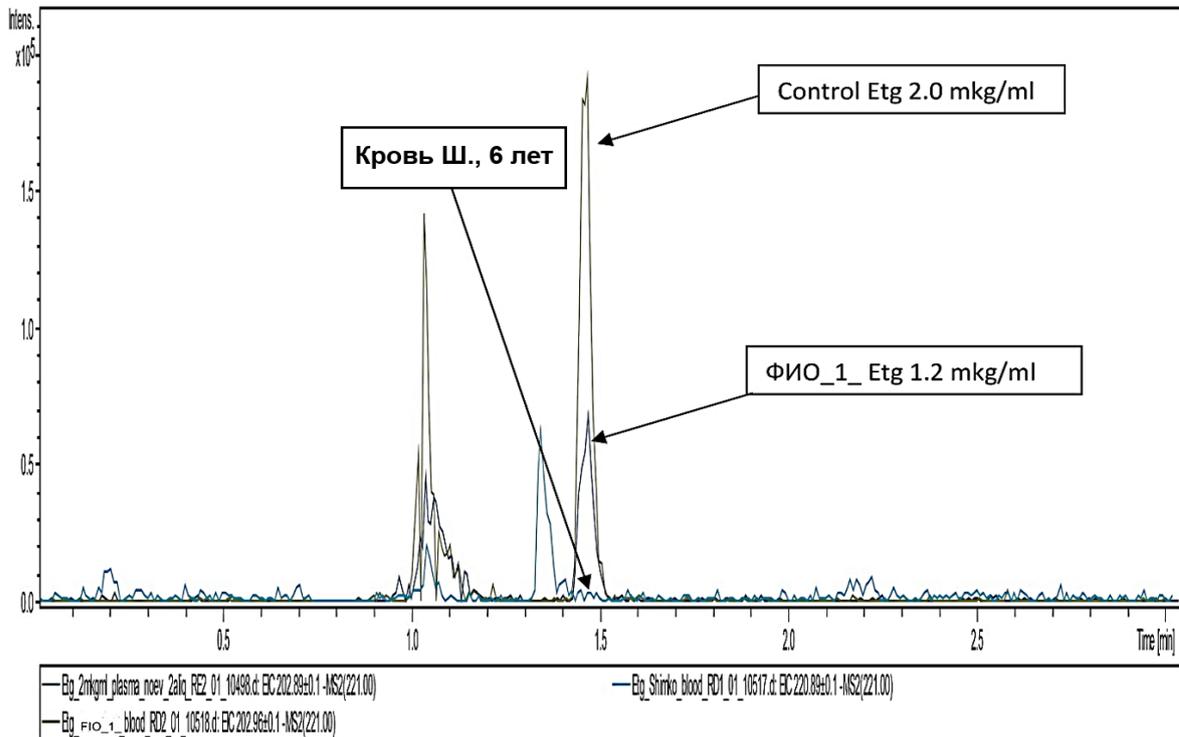


Рисунок 27. Хроматографические профили (Тохтыгер Bruker) по иону-прекурсору этилглюкуронида m/z 221 (М-Н) - экстракта образца крови от трупа Ш., муж. 6 лет, калибровочного образца и крови, положительной по этилглюкурониду (кровь от трупа ФИО_1_). Обзорный анализ, проведенный на приборе Тохтыгер Bruker, показал отсутствие этилглюкуронида в крови Ш., 6 лет.

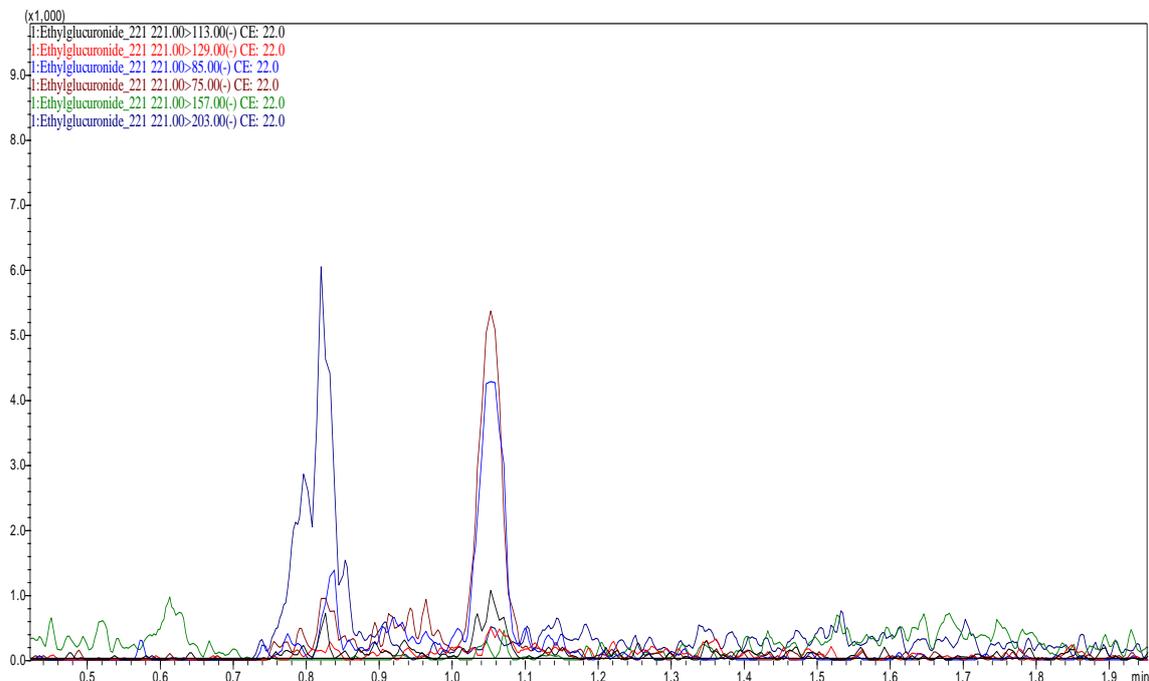


Рисунок 28. Хроматографический профиль калибровочного образца плазмы с введенным известным количеством этилглюкуронида - 0.4 мкг/мл на приборе Shimadzu 8050. Профиль по MRM: m/z 221 – 113, 221 – 129, 221 – 85, 221 – 75.

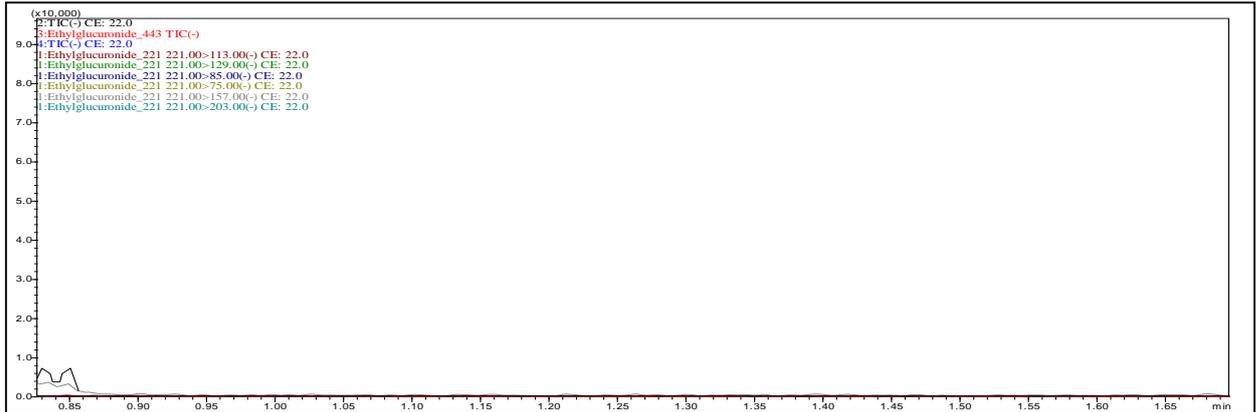


Рисунок 29. Хроматографический профиль фона прибора Shimadzu 8050 по этилглюкурониду. Профиль по MRM: m/z 221 – 113, 221 – 129, 221 – 85, 221 – 75. Этилглюкуронид отсутствует.

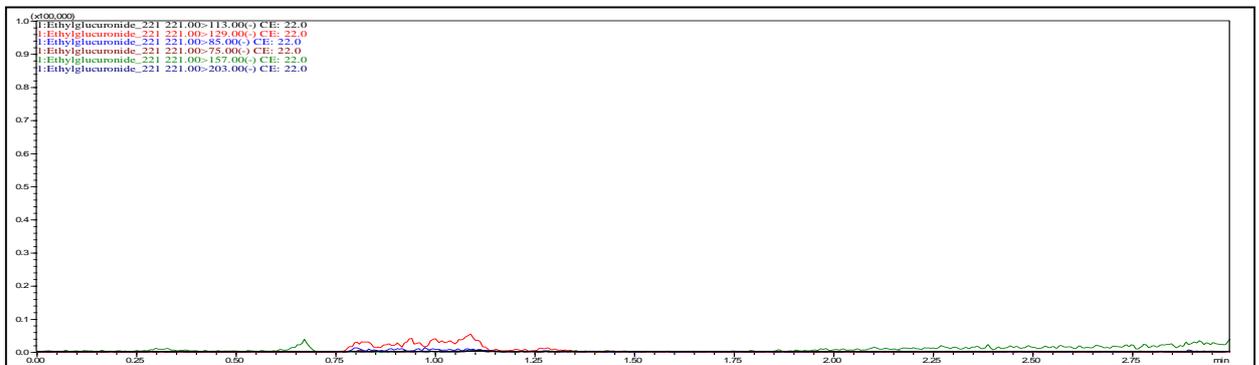


Рисунок 30. Хроматографический профиль экстракта крови от трупа Ш., муж. 6 лет, на приборе Shimadzu 8050. Профиль по MRM: m/z 221 – 113, 221 – 129, 221 – 85, 221 – 75. Пик со временем удерживания этилглюкуронида 1.0-1.1 мин отсутствует.

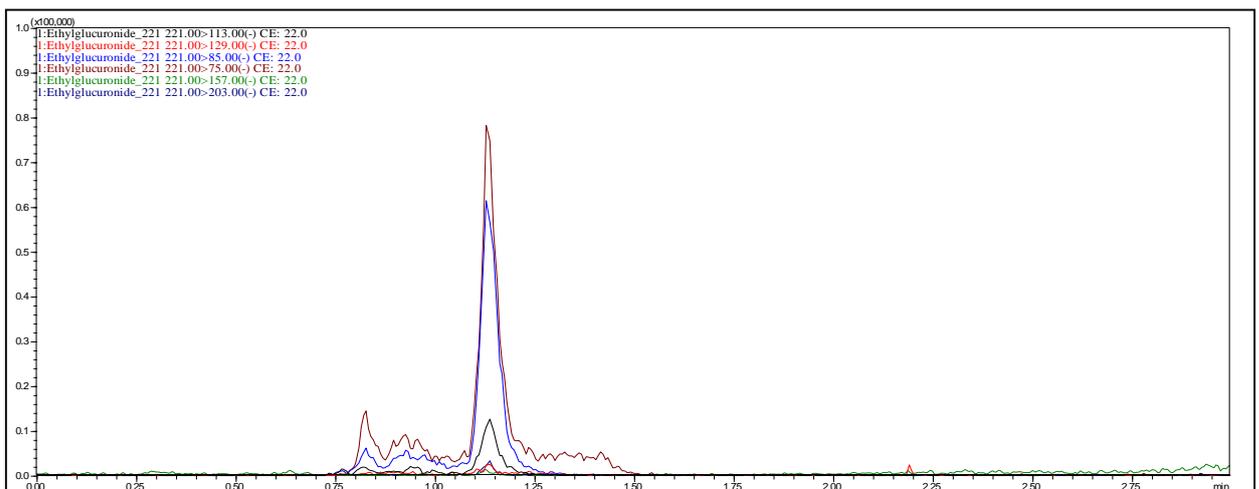


Рисунок 31. Хроматографический профиль экстракта крови от трупа ФИО_1_ на приборе Shimadzu 8050, профиль по MRM: m/z 221 – 113, 221 – 129, 221 – 85, 221 – 75. Этилглюкуронид - 0.8 мкг/мл.

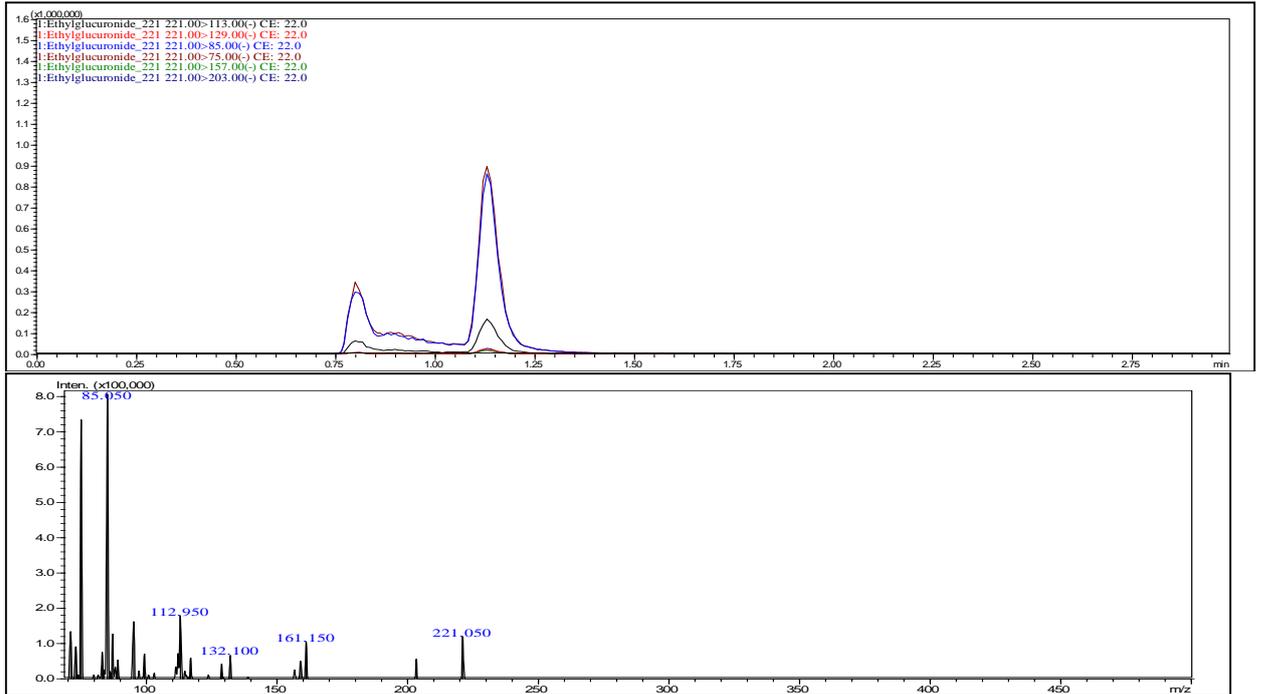


Рисунок 32. Хроматографический профиль мочи от трупа ФИО_1_ на приборе Shimadzu 8050, разбавление в 50 раз. Профиль по MRM: m/z 221 – 113, 221 – 129, 221 – 85, 221 – 75 и спектр, соответствующий этилглюкурониду. Этилглюкуронид - «high» (очень высокое содержание, вне калиброванного диапазона).

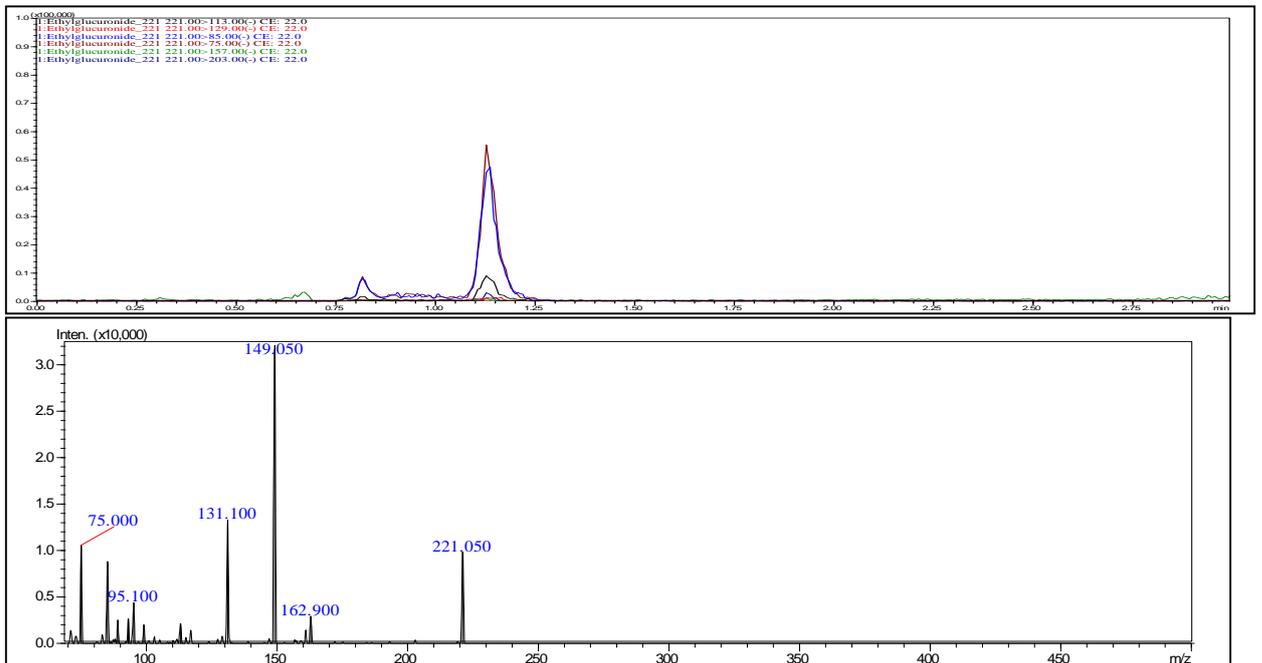


Рисунок 33. Хроматографический профиль экстракта крови от живого лица ФИО_2_, употреблявшего этиловый алкоголь на приборе Shimadzu 8050. Содержание этилглюкуронида - 0.7 мкг/мл. Профиль по MRM: m/z 221 – 113, 221 – 129, 221 – 85, 221 – 75 и спектр, соответствующий этилглюкурониду. Ион m/z 149 - фоновый, характерен для эфиров фталевой кислоты.

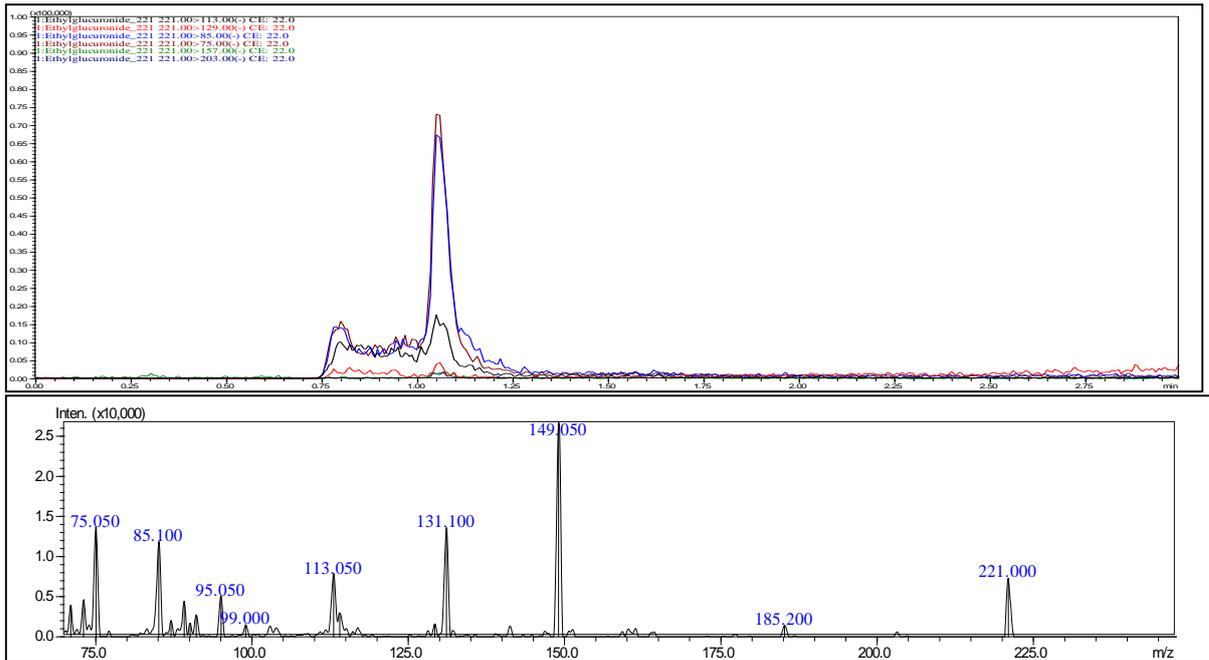


Рисунок 34. Хроматографический профиль экстракта межклеточной жидкости печени от трупа ФИО_4_ на приборе Shimadzu 8050. Содержание этилглюкуронида - 6.0 мкг/мл. Профиль по MRM: m/z 221 – 113, 221 – 129, 221 – 85, 221 – 75 и спектр, соответствующий этилглюкурониду. Ион m/z 149 - фоновый, характерен для эфиров фталевой кислоты.

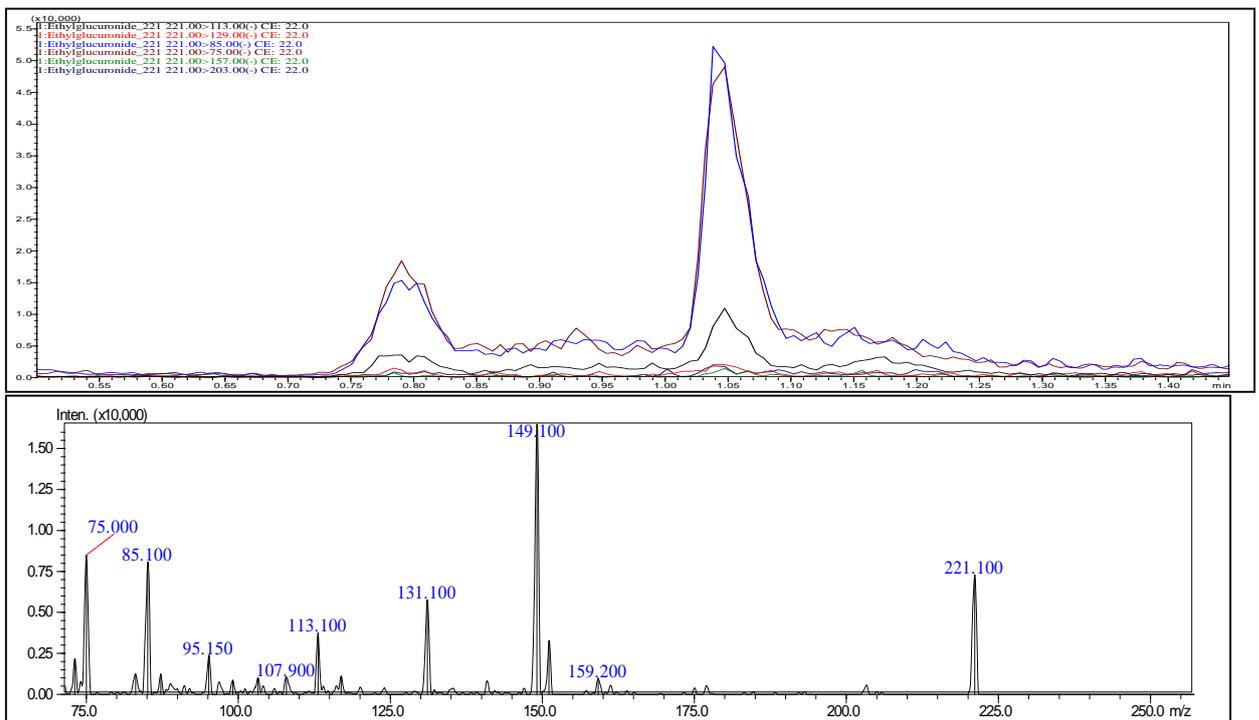


Рисунок 35. Хроматографический профиль экстракта межклеточной жидкости почки от трупа ФИО_4_ на приборе Shimadzu 8050. Содержание этилглюкуронида - 3.5 мкг/мл. Профиль по MRM: m/z 221 – 113, 221 – 129, 221 – 85, 221 – 75 и спектр, соответствующий этилглюкурониду. Ион m/z 149 - фоновый, характерен для эфиров фталевой кислоты.

На рис. 36-41 представлены хроматографические профили и спектры, полученные при исследовании биологических образцов, изъятых при эксгумации трупа М. (авиационное происшествие).

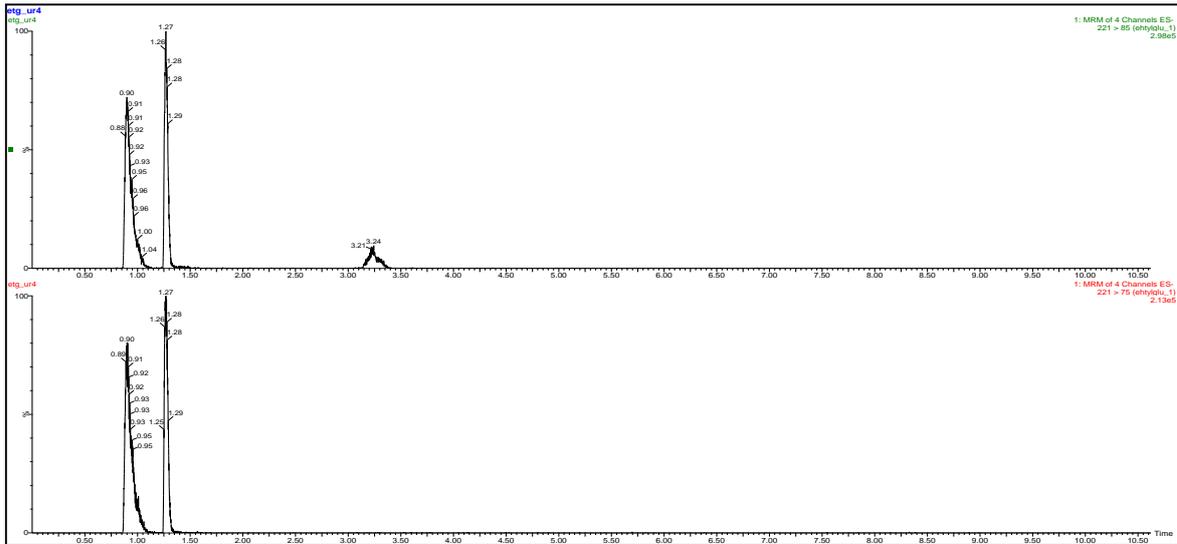


Рисунок 37. Хроматограмма (ВЭЖХ-МС/МС LC-qqq Waters) извлечения из образца сравнения - мочи №4 содержащей 2400 ppb этилглюкуронида.

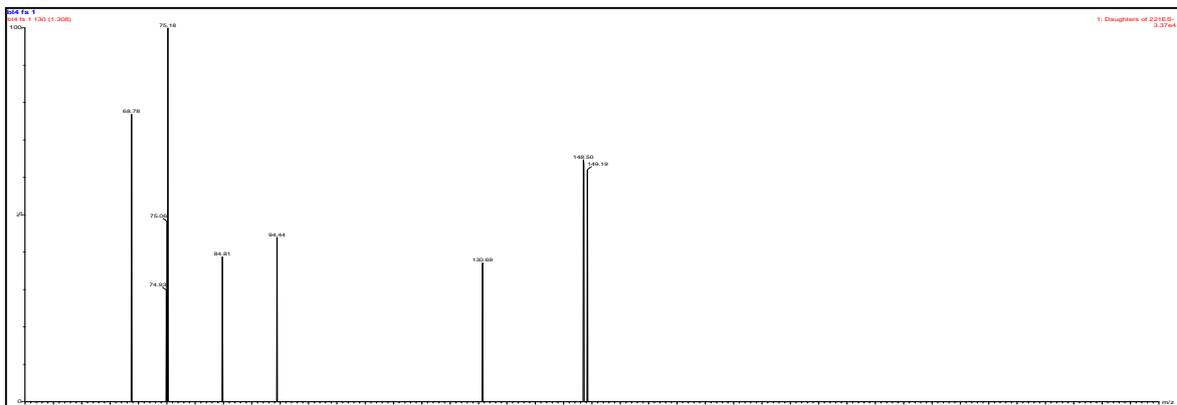
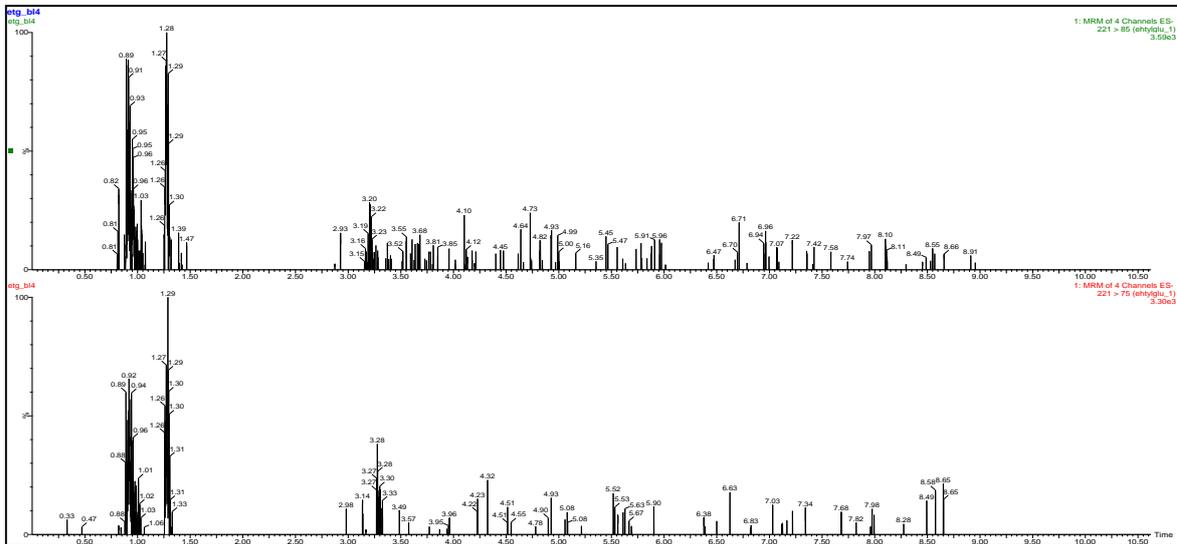


Рисунок 38. Хроматограмма (ВЭЖХ-МС/МС LC-qqq Waters) извлечения из образца сравнения - крови №4 содержащей 150 ppb этилглюкуронида и масс-спектр этилглюкуронида (RT 1.27, m/z 221>75, 85).

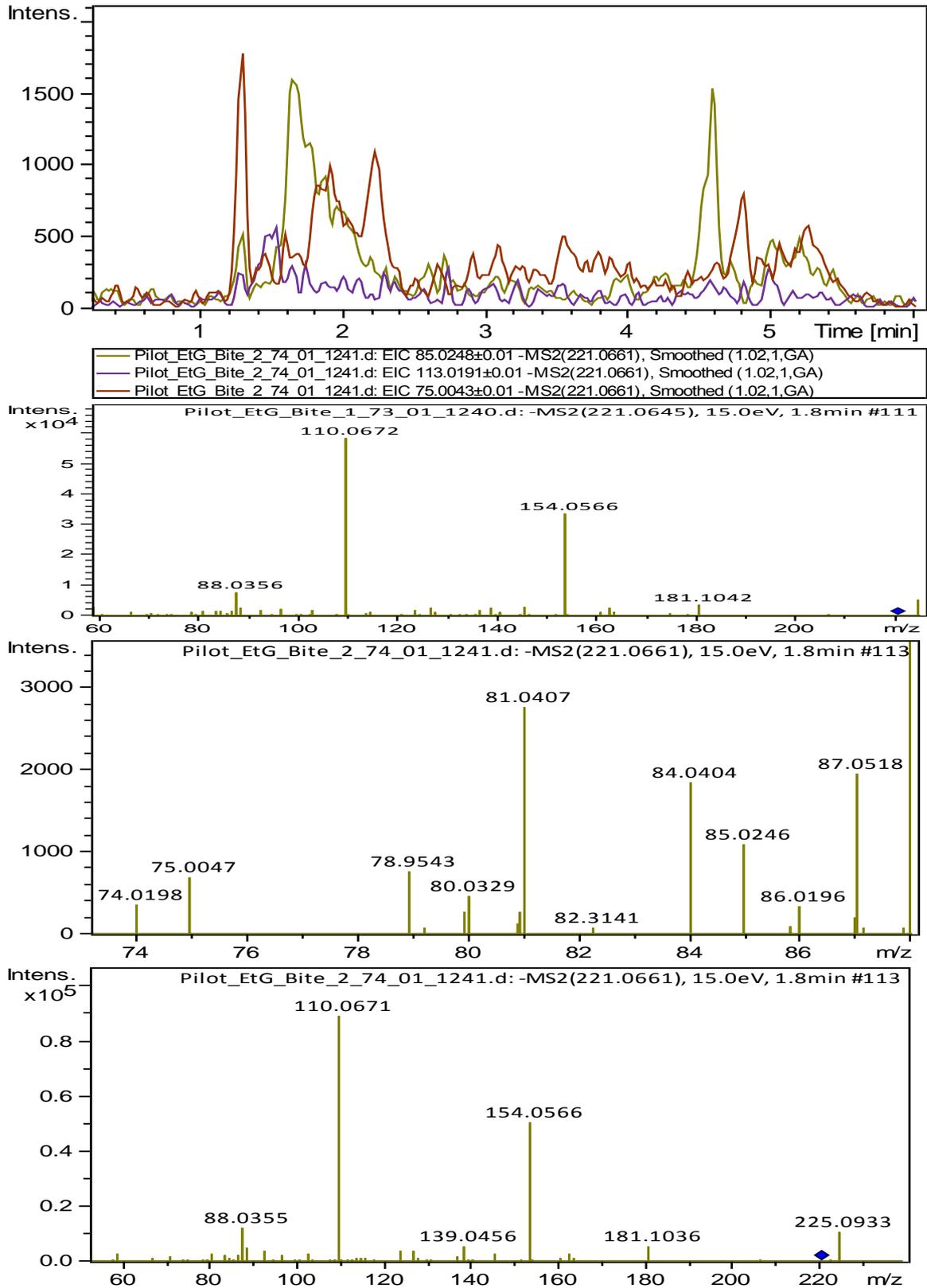


Рисунок 39. Хроматограмма (ВЭЖХ-МС/МС LC-qtof Bruker Impact) извлечения из мышцы от эксгумированного трупа М. (авиационное происшествие), и фоновый масс-спектр на месте выхода этилглюкуронида (EtG RT 1.8 min). Этилглюкуронид не обнаружен.

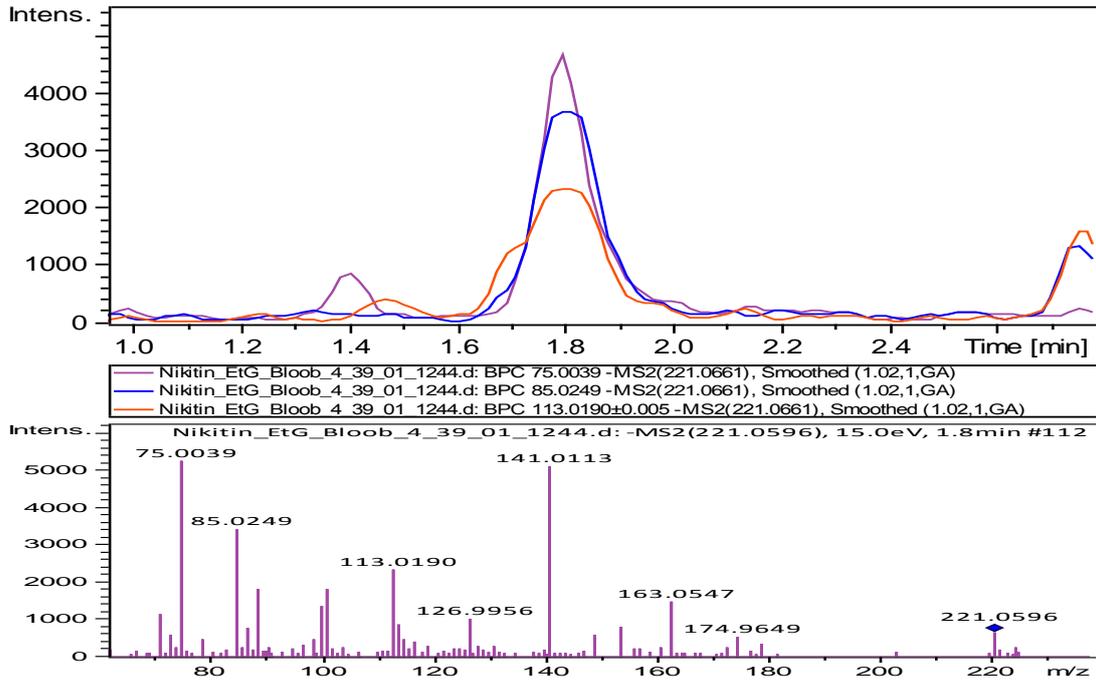


Рисунок 40. Хроматограмма (ВЭЖХ-МС/МС LC-qtof Bruker Impact) извлечения из образца сравнения - крови №4 содержащей 150 ppb этилглюкуронида и масс-спектр этилглюкуронида, идентифицированного в пробе.

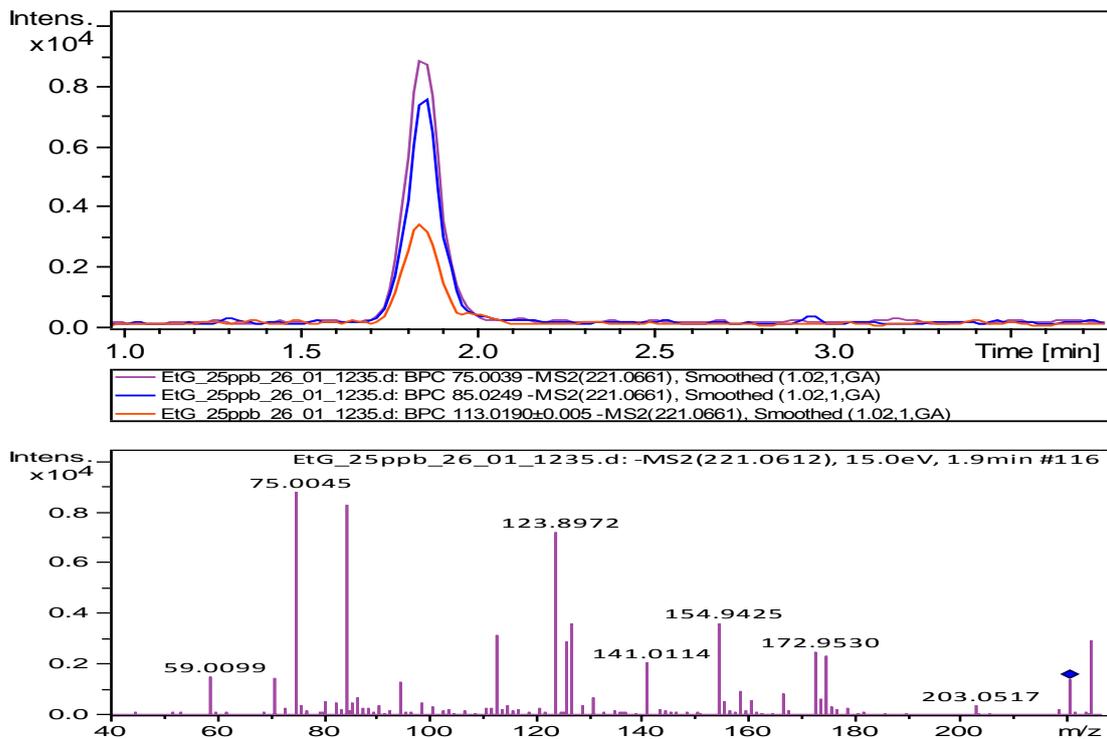


Рисунок 41. Хроматограмма (ВЭЖХ-МС/МС LC-qtof Bruker Impact) стандартного образца, содержащего 25 ppb этилглюкуронида и масс-спектр этилглюкуронида.

7. Карбогидрат-дефицитный трансферрин

Маркеры потребления этанола подразделяются на прямые и непрямые.

Прямые маркеры употребления алкоголя это этанол и его метаболиты (этилглюкуронид, этилсульфат), образующиеся, в среднем, через 40-45 мин после употребления алкоголя и определяемые в крови и других биологических жидкостях. На основании результатов анализа биожидкостей:

- невозможно дифференцировать разовый прием алкоголя от систематического;
- невозможно дифференцировать умеренное употребление от злоупотребления;
- невозможно оценить является ли процесс злоупотребления хроническим;
- невозможно контролировать ремиссию и рецидив (слишком короткое время присутствия маркера в организме);
- существуют проблемы специфичности.

Повышение концентрации прямых маркеров неразрывно связано с метаболизмом алкоголя в организме человека. Около 20% поступившего этанола всасывается в желудке, оставшиеся 80% абсорбируются кишечником. Лишь 5% этанола выводится в неизменном виде с мочой, потом и выдыхаемым воздухом, где он может быть детектирован в течение нескольких часов (менее 12) после употребления. 90-95% всосавшегося алкоголя окисляется в печени при помощи алкогольдегидрогеназы, альдегиддегидрогеназы и микросомальных этанол-окисляющих ферментов с образованием ацетальдегида, который является ключевым фактором в развитии многих патологических состояний, ассоциированных с употреблением алкоголя. В ходе неокислительного катаболизма этанола образуются такие продукты распада, как этиловые эфиры жирных кислот (FAEE), фосфатидилэтанол (PEth), этилглюкоронид (EtG) и этилсульфат (EtS). Эти и другие промежуточные продукты распада этанола могут служить маркерами употребления. Период их детекции в различных биологических жидкостях может варьировать от 8-12 часов до 5-7 дней [41]. По нашему мнению этилсульфат имеет весьма низкую специфичность, по сравнению с этилглюкуронидом.

В отличие от биологических жидкостей, по результатам анализа которых невозможно дифференцировать разовое и хроническое потребление этанола, волосы и ногтевые срезы являются такими биологическими объектами, в которых этилглюкуронид накапливается и может быть использован, как маркер хронического употребления алкоголя, совместно с непрямymi маркерами, наиболее специфичным из которых считают CDT.

Группа непрямых маркеров хронического употребления этанола включает широкий спектр показателей, аналитические характеристики и диагностическая значимость которых может варьировать в широких пределах.

1. Средний объем эритроцита (MCV). Основным недостатком маркера MCV является его низкая чувствительность (40-50 %) и недостаточная специфичность как у стационарных, так и у амбулаторных больных [42].

2. Аспартатаминотрансфераза (АСТ) и аланинаминотрансфераза (АЛТ). Уровень АСТ и АЛТ (период полураспада составляет 17 и 47 часов, соответственно) повышается в случае злоупотребления алкоголем, но из-за крайне низкой чувствительности и специфичности эти маркеры не могут рассматриваться в качестве самостоятельных индикаторов хронического злоупотребления [42].

3. Гаммаглутамилтрансфераза (ГГТ). Основным недостатком данного биомаркера является его низкая специфичность. Целый ряд лекарственных препаратов и патологических состояний могут способствовать повышению ГГТ, приводя к ложноположительным результатам диагностики. Несмотря на недостатки, измерение уровня ГГТ при сочетанном использовании с другими, более специфичными маркерами, такими, например, как карбогидрат-дефицитный трансферрин, может дать неплохие, диагностически значимые результаты [42].

4. Карбогидрат-дефицитный трансферрин (CDT). В последние годы в мировой практике все шире применяется новый маркер — карбогидрат-дефицитный трансферрин (CDT). Согласно данным литературных источников, включающих опубликованные результаты крупных мультицентровых, клинических и валидационных испытаний, CDT обладает наилучшими аналитическими показателями среди существующих маркеров лабораторной оценки хронического злоупотребления. Специфичное повышение CDT наблюдается у лиц, потребляющих не менее 50-80 г алкоголя в течение не менее 7-10 дней, что позволяет устанавливать факт хронического злоупотребления лабораторным путем [42].

Для определения CDT используют методы капиллярного электрофореза или высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ-УФ) с ультрафиолетовым детектированием при длинах волн 200 и 460 нм, соответственно. Эти методы характеризуются низкой чувствительностью, которая лимитируется тем, что для получения аналитического сигнала используют комплекс с железом, который имеет низкий уровень УФ адсорбции, особенно в присутствии гемоглобина и таких сывороточных протеинов, как моноклональные антитела. Из-за этого определение CDT невозможно методами с УФ детектированием в гемолизованных пробах из-за наличия большого количества продуктов гемолиза. В наибольшей степени это относится к судебно-химическому анализу, где продукты гемолиза всегда содержатся в крови, отобранной от трупа.

Невозможность определения CDT гемолизованной (трупной) крови связана с тем, что для получения аналитического сигнала используют комплекс трансферрина с железом, который имеет низкий уровень УФ

адсорбции [43], особенно в присутствии гемоглобина и сывороточных протеинов. Однако, когда железо заменено трехвалентным ионом, таким как тербий (Tb), аддукт трансферрина с Tb показывал интенсивную и специфическую флуоресценцию [44]. Формирование флуоресцентного аддукта с тербием - новая стратегия для идентификации гликоформ CDT в биологических жидкостях трупа методом ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием. Также метод может быть использован для определения CDT в гемолизованной пробе о живых лиц, а также в сухих пятнах крови, спинномозговой жидкости, внутриглазной жидкости и других объектах.

7.1 Реагенты

Использовали следующие реагенты квалификации ч.д.а.:

- деионизованную воду Milli-Q с остаточным сопротивлением 18 Мом/см при 25°C;
- буфер TRIS (trishydroxy-methyl-amino methane), Sigma-Aldrich;
- хлорид тербия, гексагидрат (TbCl₃·6H₂O), Sigma-Aldrich;
- хлорид натрия (NaCl), Sigma-Aldrich;
- глюконовая кислота (gluconic acid), Sigma-Aldrich;
- Desferoxamine (Desferal®; Novartis AG, Basel, Switzerland);

Для исследования сухих пятен крови использовали пористый носитель #903 Whatman Filter paper, (13 mm диск с емкостью до 60 µl пробы).

7.2 Аппаратура и условия хроматографирования

Высокоэффективный жидкостный хроматограф Shimadzu с флуоресцентным детектором Shimadzu RF-10AXL и ионообменной колонкой Waters Protein-Pak (5 мкм, 4.6x100 мм).

Условия градиентного элюирования.

Элюент А: деионизованная вода HPLC grade с 20mmol/l Tris буфера (pH 8).

Элюент В: Деионизованная вода HPLC grade с 20 mmol/l Tris буфера (pH 8), NaCl 0.5 mol/l.

Поток через колонку 0.3 мл/мин, температура термостата колонок 50°C.

Объем вводимой пробы - 5 мкл.

Программа градиентного элюирования:

Time(min)	Flow (ml/min)	%A	%B
0.00	0.3	100.0	0
25	0.3	70	30

После анализа колонку регенерируют водным раствором NaCl 1.0 mol/l (0.3 мл/мин 10 мин) и уравнивают с использованием элюента А (0.3 мл/мин 10 мин).

Условия флуоресцентного детектирования.

Длины волн возбуждения и поглощения составляли 298 nm и 550 nm, соответственно.

Карбогидрат-дефицитный трансферрин определяют как процентное соотношение суммы фракций 0-сиало и 2-сиало к общему содержанию трансферрина.

7.3 Пробоподготовка

Пробы крови отбирали согласно приказу 346 н МЗ и хранили при -20°C до анализа. Для исследования сухих пятен крови 60 мкл крови помещали на пористый диск бумаги Whatman, высушивали и хранили до анализа при комнатной температуре (рис 42).

Кровь гемолизованная (трупная).

К 50 мкл гемолизованной или трупной крови добавляют 5 мкл водного раствора TbCl_3 концентрацией 0.5 mmol/l и 5 мкл водного раствора препарата Desferal концентрацией 50 $\mu\text{mol/l}$, перемешивают на вибромиксере, выдерживают 1 ч. при комнатной температуре, фильтруют через фильтр (0.22 μm Amicon, Millipore) центрифугированием при 10,000g в течение 10 мин. Фильтрованные центрифугированные образцы хранят до анализа при 4°C .

Сухие пятна крови.

Сухие пятна крови на сорбенте – носителе помещают во флаконы для фильтрации/центрифугирования. Диаметр пор фильтра 0.22 μm . К образцами добавляют 60 мкл водного раствора глюконовой кислоты концентрацией 200 mmol/l. После 1 ч инкубирования при комнатной температуре в течение 10 мин при 1500g отбирают 20 мкл фильтрованного образца и добавляют к нему 5 мкл водного раствора TbCl_3 , центрифугируют при 10 мин при 10000g, 5 мкл надосадочной жидкости вводят в хроматограф.



Рисунок 42. Сухие пятна крови для исследования на CDT.

7.4 Результаты исследований

На рис.43 представлены хроматографические профили изоформ трансферрина, полученные при анализе сыворотки крови, взятой у живых лиц, на рис.44 – при анализе трупной крови.

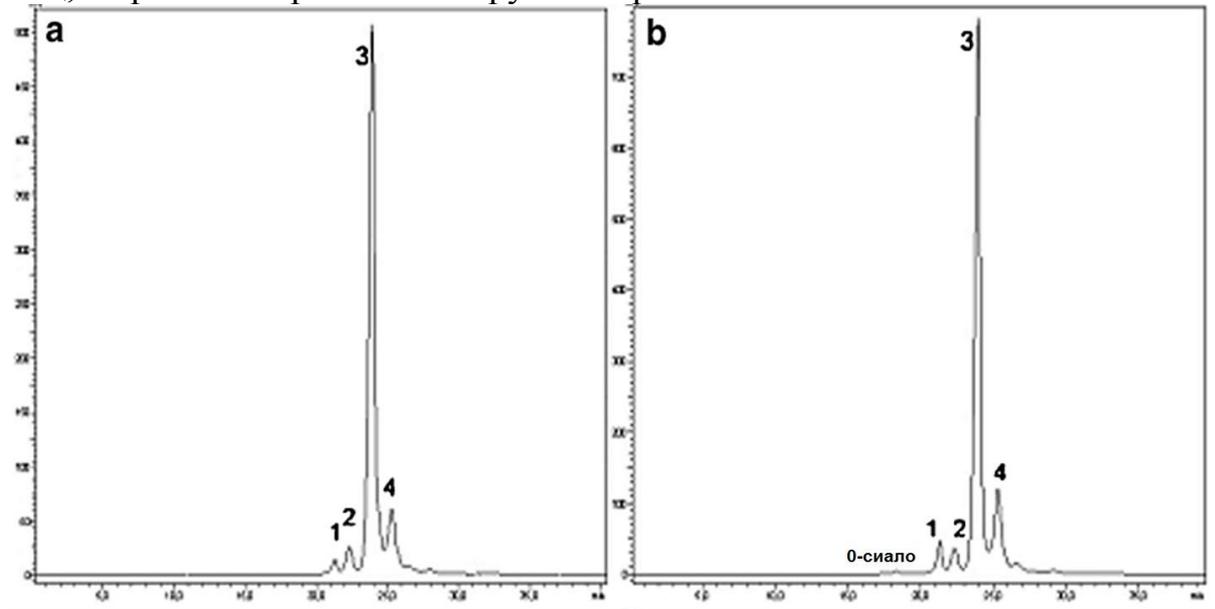


Рисунок 43. ВЭЖХ-ФЛ профили сыворотки крови от лица, не злоупотребляющего алкоголем - CDT 1% (a) и от лица, злоупотребляющего алкоголем - CDT 2,8% (b). Изоформы трансферрина: 1) 2-сиало, 2) 3-сиало, 3) 4-сиало, 4) 5-сиало. На хроматограмме (b) виден небольшой отклик слева от пика 2-сиало, соответствующий 0-сиало изоформе.

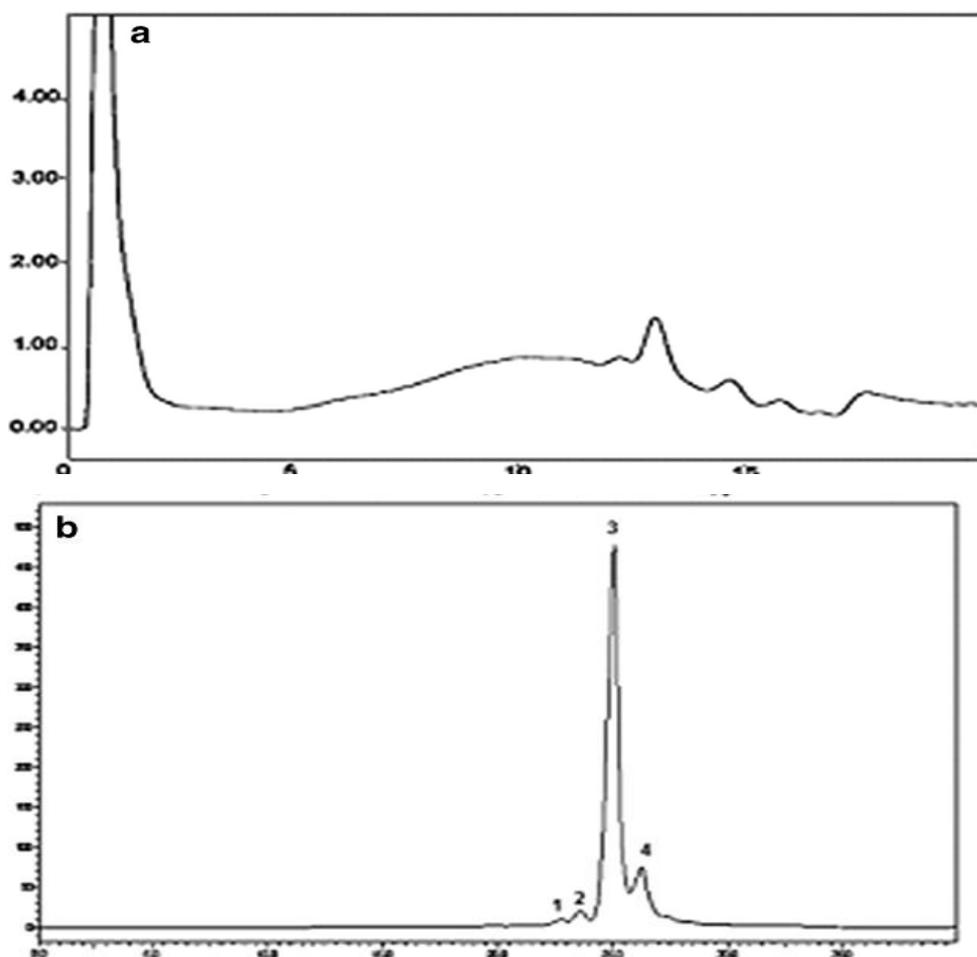


Рисунок 44. ВЭЖХ-УФ (а) и ВЭЖХ-ФЛ (б) профили трупной крови. Изоформы трансферрина: 1) 2-сиало, 2) 3-сиало, 3) 4-сиало, 4) 5-сиало.

8. ГХ-МС метод определения гамма-гидроксибутирата (ГНВ) в биологических образцах

Гамма-гидроксибутиратная кислота - естественно содержащееся, эндогенное соединение, обнаруженное в тканях большинства млекопитающих, является продуктом метаболизма нейромедиатора гамма-аминобутирической кислоты. В связи с эндогенной природой ГОМК/ГГБ необходимо соблюдать осторожность при интерпретации положительных данных. Установлено, что концентрация ГОМК/ГГБ повышается *in vitro* в процессе хранения образцов мочи. Поэтому фактическая рекомендованная предельная концентрация для эндогенного ГОМК/ГГБ в моче составляет 10 мг/л – это помогает провести разграничение между эндогенным и экзогенным ГОМК/ГГБ [45].

По сравнению с анализом мочи, положительный результат анализа крови может служить доказательством употребления препарата в течение более короткого отрезка времени (обычно менее 48 часов). Обнаружение

ГОМК/ГГБ в крови может помочь интерпретировать результаты, полученные при анализе образцов мочи. Было показано: как и при анализе мочи, концентрация ГОМК/ГГБ повышается *in vitro* в образцах крови в процессе хранения. Поэтому исследователи предлагают считать, что адекватная граничная концентрация ГОМК/ГГБ должна составлять 2 мг/л, если кровь собрана в асептических условиях и хранилась при +4 °С. ГОМК/ГГБ [45].

Таким образом, необходимо дифференцировать эндогенное образование и экзогенное введение ГОМК/ГГБ, поэтому при интерпретации результатов чрезвычайно важна количественная информация.

Исследованию волос на содержание ГОМК/ГГБ следует уделять особое внимание. Поскольку ГОМК/ГГБ является эндогенным соединением, нормальные уровни эндогенного ГОМК/ГГБ у каждого индивидуума варьируются. Прядь волос следует разрезать на 5–10 коротких сегментов (длиной от 0,3 до 0,5 см), и в каждом сегменте определяется содержание ГОМК/ГГБ для того, чтобы установить, не превышает ли концентрация ГОМК/ГГБ в одном сегменте концентрацию в других в 10 раз, что позволит предположить возможное присутствие экзогенного ГОМК/ГГБ [45].

8.1 Пробоподготовка

В пробирку с внесенным NaCl (около 1 г) в качестве высаливающего агента дозируют 0,5 мл объекта (кровь, моча) и 270 мкл 0.1N HCl, перемешивают.

Добавляют 1,0 мл ацетонитрила и экстрагируют в течение 3 минут на вибровстряхивателе типа Вортекс.

Центрифугируют 10 минут при 14 000 об/мин.

Верхний органический слой отбирают в виалу и упаривают досуха.

Дериватизация: к сухому остатку вносят 150 мкл BSTFA, инкубируют 60 минут при 100°C.

2 мкл полученной пробы вводят в хроматограф.

Аналогичным образом проводят пробоподготовку градуировочных растворов, приготовленных на основе крови или мочи с содержанием 2000 нг/мл, 10000 нг/мл, 15000 нг/мл, 20000 нг/мл ГГБ.

8.2 Аппаратура и условия хроматографирования

Газовый хроматограф Agilent 7890A с масс-селективным детектором Agilent 5975C (или с аналогичными характеристиками), с кварцевой капиллярной колонкой Rxi-5ms длиной 30 м, диаметром 0.25 мм, толщиной пленки нанесенной неподвижной фазы (5%-фенил)-полиметилсилоксана 0,25 микрон (или с аналогичными характеристиками). Газ-носитель - гелий марки «А».

Условия хроматографирования.

Метод «DOAS» [46, 47, 48]:

Анализ в режиме постоянного давления газа – носителя. Объем вводимого образца 2 мкл, с делением потока (split) 1/10. Температура инжектора 280°C, интерфейса 280°C.

Программа термостатирования колонки: начальная температура 50°C с изотермической выдержкой в течение 0,5 мин, с последующим температурным градиентом 99°C/мин до 100°C с изотермической выдержкой 1 мин, с последующим температурным градиентом 15°C/мин до 280°C с изотермической выдержкой 30 мин. Время удерживания (RT) дифениламина 9,29 мин.

Условия масс-спектрометрического детектирования.

Для идентификации применяют режим сканирования по полному ионному току (SCAN). Задержка на пик растворителя (время включения катодов и анализатора после прохождения по колонке фронта растворителя) - через 3 мин после ввода пробы. Температура источника ионов 230°C. Температура анализатора 150°C. Диапазон масс m/z 41-650 а.е.м. Напряжение на умножителе - результат, полученный при автоматической настройке по перфторбутиламину в режиме ATUNE + 100V. Идентификацию целевых соединений выполняют с помощью программ AMDIS и MSD ChemStation с использованием библиотек масс-спектров MWP2011, NIST11, Wiley 9.

Калибровку проводят согласно инструкции к прибору, на основе хроматограмм экстрактов градуировочных смесей.

8.3. Результаты исследований

Время удерживания ди-ТМС производного гамма-гидроксibuтирата (GHB 2TMS) при условиях хроматографирования в методе DOAS составляет $RT=5.59$ мин.

Особенности, которые следует учитывать при идентификации:

- Хроматографический пик GHB 2TMS по времени удерживания близко расположен к хроматографическому пику ТМС-производного мочевины (Urea 2TMS) (рис. 45, 46, 47), соэкстрагирующейся при пробоподготовке, и в случае низкого содержания в пробе может быть «закрыт» им. Оба соединения имеют общие фрагменты, например, m/z 147, m/z 73 и m/z 204 (в случае Urea 2TMS - m/z 204 молекулярный ион) (рис. 49, 50). Поэтому уточняющую идентификацию проводят по характеристическим ионам m/z 117, 233, 143 (рис. 51, 52).

- При автоматической AMDIS идентификации в ряде случаев можно столкнуться с ложноположительным результатом: на хроматограммах выявляется компонент с временем удерживания (RT) 4.89 мин, идентифицированный как GHB 2TMS (рис. 45, 46, 48). Как и у ди-ТМС производного гамма-гидроксibuтирата, в спектре этого соединения

присутствуют m/z 147 и m/z 233, в то время как, например, минорного фрагмента m/z 204 нет, а есть m/z 203 (рис.53). При уточняющей идентификации хорошо видно несовпадение хроматографических профилей по экстрагированным хроматограммам фрагментов с m/z 117, m/z 233, m/z 143 (рис. 51, 54).

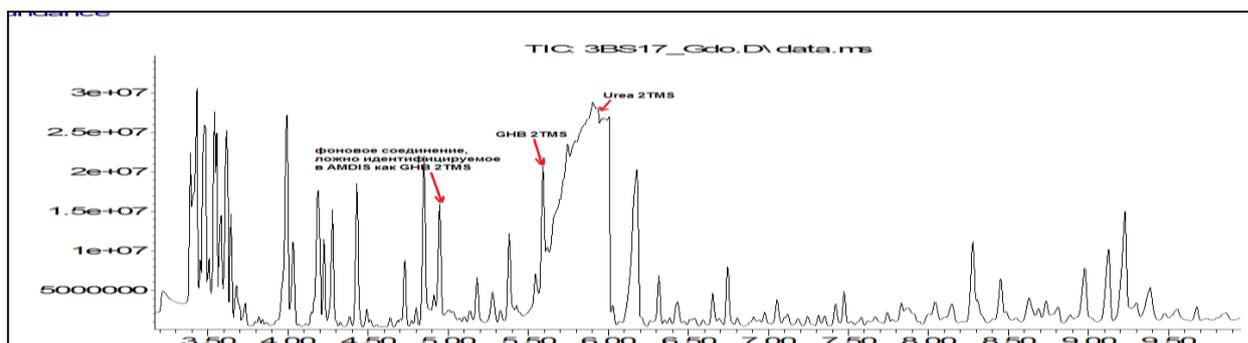


Рисунок 45. Хроматограмма по полному ионному току (SCAN) экстракта мочи, содержащей 16650 нг/мл GHB (RT 5.59 мин). Фоновое соединение (RT 4.89 мин) было идентифицировано программой AMDIS как GHB 2TMS.

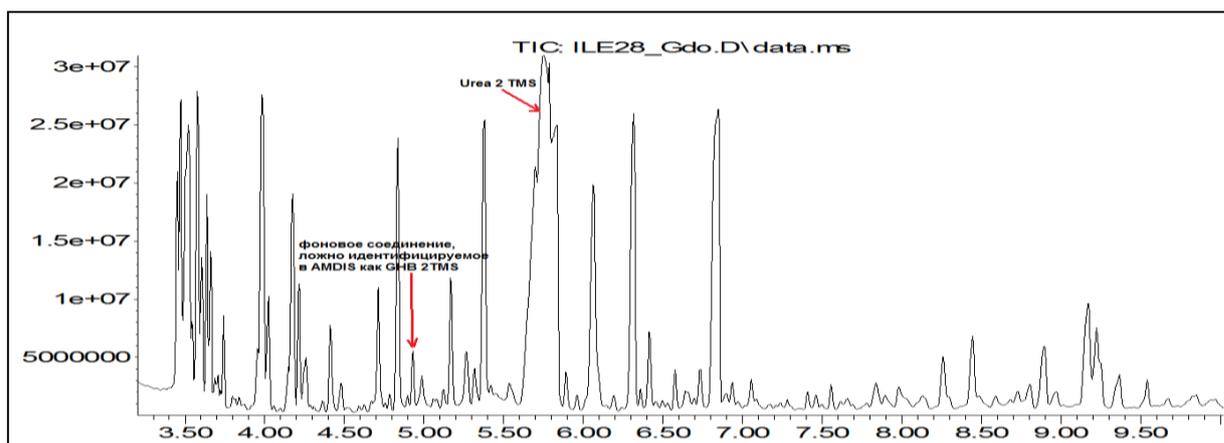


Рисунок 46. Хроматограмма по полному ионному току (SCAN) экстракта мочи, не содержащей GHB. Фоновое соединение (RT 4.89 мин) было идентифицировано программой AMDIS как GHB 2TMS.

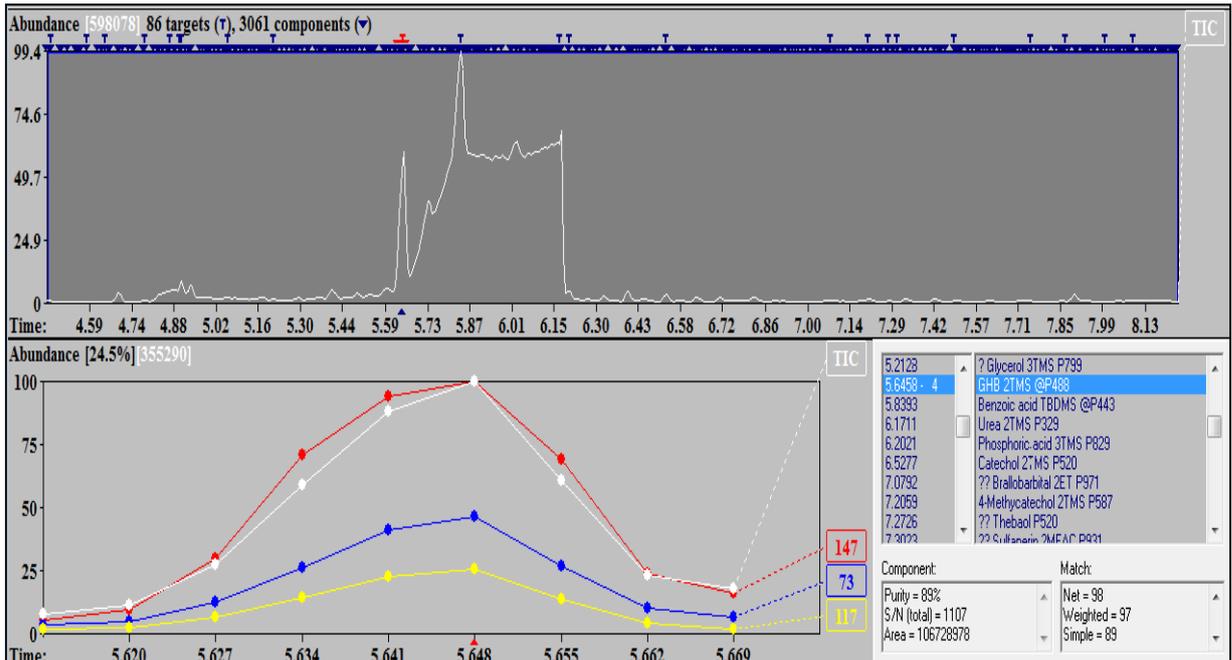


Рисунок 47. AMDIS идентификация хроматограммы экстракта мочи, содержащей 18 700 нг/мл GHB. Времена удерживаний (RT) GHB 2 TMS - 5.64 мин, Urea 2 TMS - 6.17 мин. Экстрагированные хроматографические профили по m/z 117, m/z 233, m/z 143 совпадают.

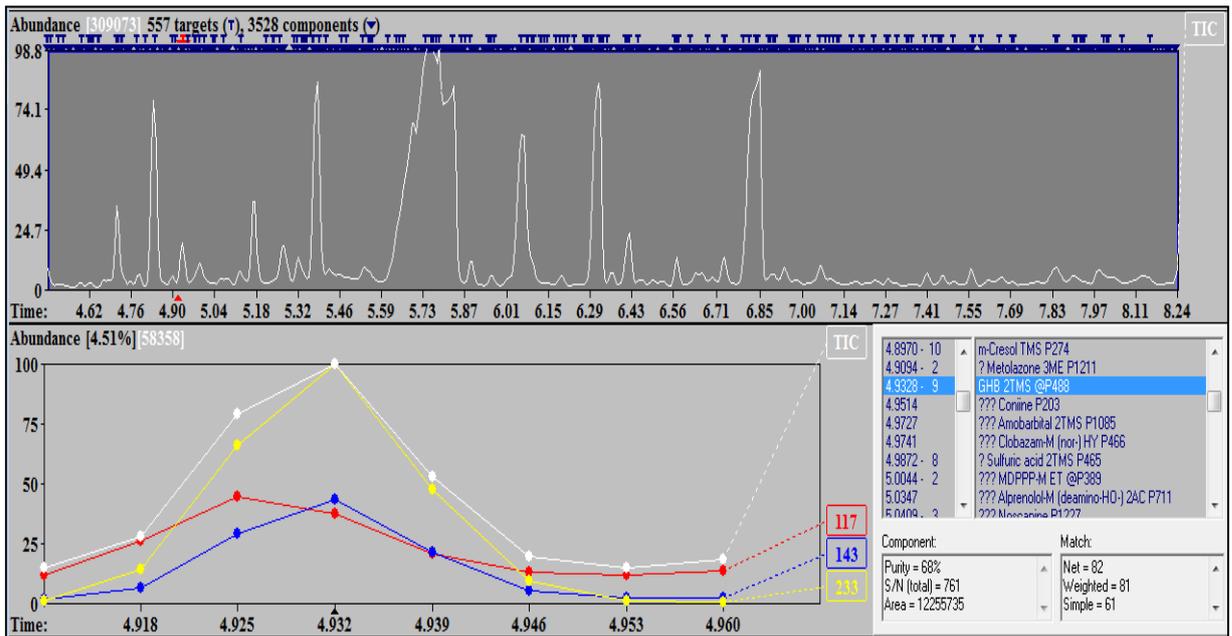


Рисунок 48. AMDIS идентификация хроматограммы экстракта мочи, не содержащей GHB. Время удерживания фонового вещества, ошибочно идентифицируемого в AMDIS как GHB 2 TMS - 4.93 мин. Экстрагированные хроматографические профили по m/z 117, m/z 233, m/z 143 не совпадают.

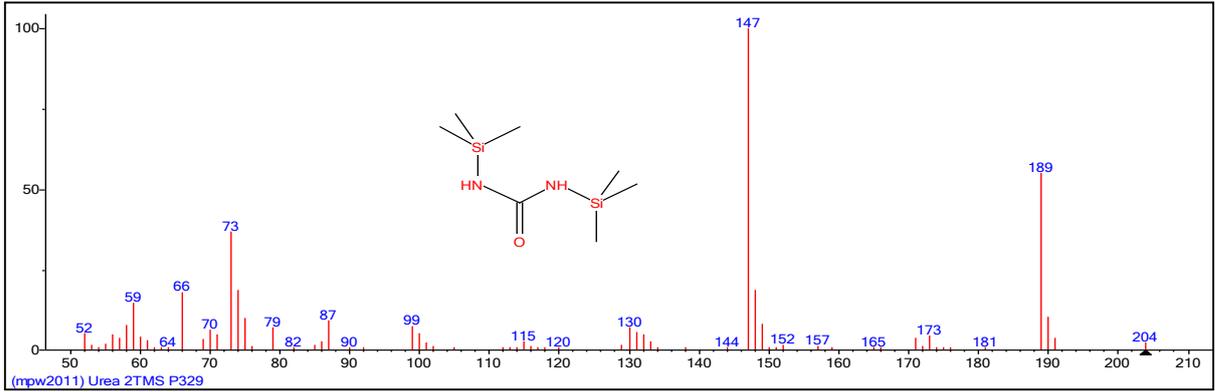


Рисунок 49. Масс-спектр Urea 2 TMS.

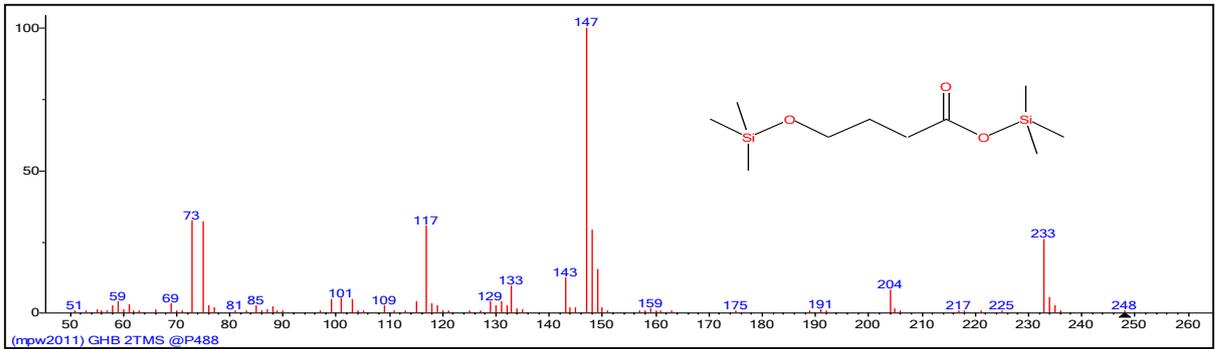


Рисунок 50. Масс-спектр GHB 2 TMS.

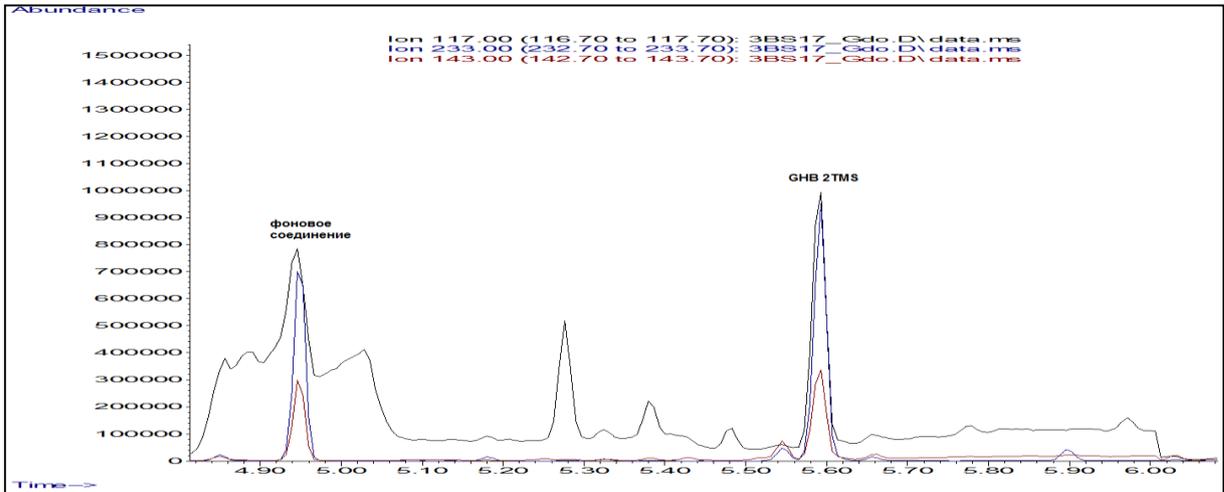


Рисунок 51. Фрагмент хроматограммы с экстрагированными хроматографическими профилями по m/z 117, m/z 233, m/z 143 экстракта мочи, содержащей 16650 нг/мл ГНВ. Времена удерживания ГНВ 2TMS - 5.59 мин, фонового соединения 4.89 мин.

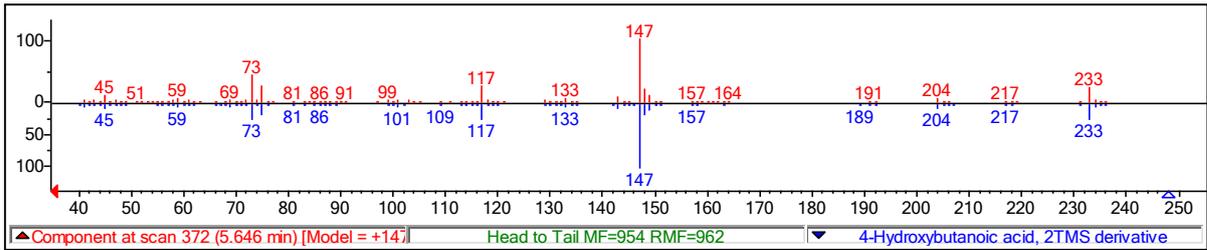


Рисунок 52. Результаты библиотечной идентификации масс-спектра соединения RT= 5.646 мин (верхний спектр, выделенный красным цветом в пробе мочи, содержащей 18 700 нг/мл ГНВ. Библиотечный масс-спектр ГНВ 2 TMS выделен синим цветом. Масс-спектры совпадают по основным и минорным фрагментам.

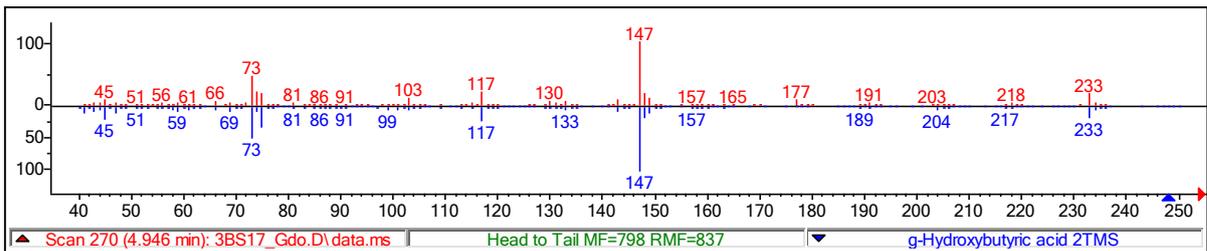


Рисунок 53. Результаты библиотечной идентификация масс-спектра соединения RT= 4.946 мин (верхний спектр, выделенный красным цветом) в пробе мочи, не содержащей оксибутират. Нижний масс-спектр - библиотечный масс-спектр ГНВ 2 TMS, выделен синим цветом. Масс-спектр фонового вещества совпадает с масс-спектром ГНВ 2 TMS по основным и минорным фрагментам, поэтому обнаружение ГНВ в моче выполняют по времени удерживания ГНВ 2TMS, которое составляет 5.64 мин в выбранных условиях хроматографирования.

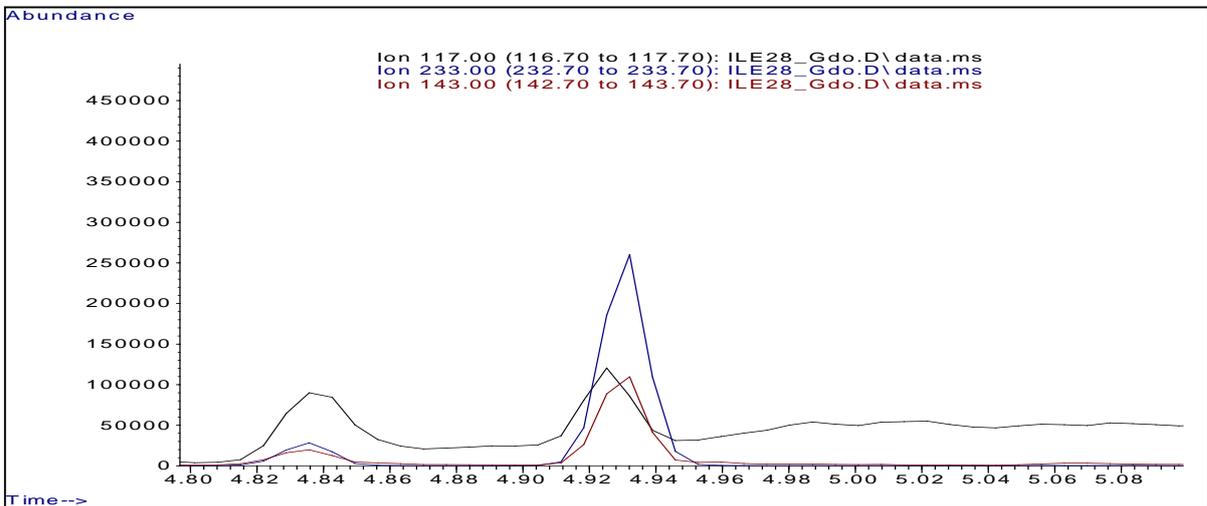


Рисунок 54. Фрагмент хроматограммы с экстрагированными хроматографическими профилями по m/z 117, m/z 233, m/z 143 экстракта мочи, не содержащей ГНВ (профили не совпадают). Время удерживания (RT) фонового соединения, дающего ложноположительный результат - 4.93 мин.

Список литературы

- [1] Савчук С.А., Веденин А.Н., Изотов Б.Н. Обнаружение летучих токсичных веществ в биологических жидкостях организма методом газовой хроматографии и хромато-масс-спектрометрии//Наркология 2002 №3 с.37-45.
- [2] Савчук С.А., Веденин А.Н. Применение программы фиксации времен удерживания при хромато-масс-спектрометрическом определении анализируемых веществ //Рос.хим.ж.(Ж.хим.общества им.Д.И.Менделеева),2003,т.XLVII,№1, с.141.
- [3] J.D. Ramsey, R.J.Flanagan Detection and identification of volatile organic compounds in blood by head space gas chromatography as an aid to the diagnosis of solvent abuse//J. of Chromatograph.1982, V. 240, p.423-444.
- [4] D.R.Gere, R.Trengove, A.Gray Fast gas chromatography separation and detection of blood alcohol compounds for forensic methods// Agilent Technologies application 1999P/N 5968-759E.
- [5] Витенберг А.Г., Иоффе Б.В. Газовая экстракция в хроматографическом анализе. Ленинград, Химия, 1982, 279 с.
- [6] Хахенберг Х. Шмидт А., Газохроматографический анализ равновесной паровой фазы. Москва, Мир,1979, 160 с.
- [7] Витенберг А.Г. Статический парофазный газохроматографический анализ. Физико-химические основы и области применения. Рос.хим.ж.(Ж.хим.общества им.Д.И.Менделеева),2003,т.XLVII,№1, с.7-22.
- [8] Михайлов В.А. Журнал физической химии 1962 №2 с.306-313.
- [9] Михайлов В.А. Высаливание - всаливание веществ из их растворов Каунас 1970 г.
- [10] A.Reese, H.Prest Retention time locked GC-MS analysis of phenols//Agilent Technologies application, September 28, 2001, 5988- 3934EN.
- [11] C.Kai Meng Identification and Quantitation of Pesticides in the parts- per-trillion range using retention time locking and GC/MS. Agilent Technologies application, November 14,2001, 5988-4392EN.

- [12] Ludwig Huber Good Laboratory practice and current good manufacturing practice. Agilent Technologies Deutschland GmbH, Hewlett-Packard-Strasse 8, 76337 Waldbornn, Germany 03/00, Publication No 5968-6193E p.116.
- [13] Приказ Минздравсоцразвития России N 346н от 12.05.2010 «Об утверждении Порядка организации и производства судебно-медицинских экспертиз в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации».
- [14] Приказ Минздравсоцразвития России № 40 от 27.01.2006 «Об организации проведения химико-токсикологических исследований при аналитической диагностике наличия в организме человека алкоголя, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ».
- [15] Международная ассоциация гражданской авиации (ИКАО, ИКАО). Руководство по авиационной медицине. 3-е издание (официальный перевод на русский язык). – Квебек: Издательство ИКАО, DOC 8984-AN/895, 2012.
- [16] Энциклопедия клинических лабораторных тестов./ Под ред. Тица Н. - М.: ЮНИМЕД-Пресс, 2003 г.
- [17] Афанасьев В.В., Рубитель Л.Т., Афанасьев А.В. Острая интоксикация этиловым алкоголем. Оперативное руководство. - СПб., 2002. - 95 с.
- [18] Клиническая токсикология детей и подростков, под ред. И.В.Марковой и других. – СПб.: Интермедика, 1999. - Том 2..
- [19] Медицинская токсикология: национальное руководство / под ред. Е.А.Лужникова. - М.: ГОЭТАР-Медиа, 2014. - 923 с.
- [20] Приказ Минздрава России № 933н от 18.12.2015г. "О порядке проведения медицинского освидетельствования на состояние опьянения (алкогольного, наркотического или иного токсического)".
- [21] Приказ Министерства здравоохранения РФ от 10 мая 2017 г. № 203н "Об утверждении критериев оценки качества медицинской помощи".
- [22] Циркулярное письмо Министерства здравоохранения СССР от 25 февраля 1970 г. «Об улучшении диагностики острых смертельных отравлений этиловым спиртом».
- [23] Шлегель Г. Общая микробиология: Пер. с нем. - М.: Мир, 1987. 587 с.

- [24] Шабанов П.Д., Калишевич С.Ю. Биология алкоголизма. - СПб.: Издательство "Лань", 1998.
- [25] Маркизова Н.Ф., Гребенюк А.Н., Башарин В.А., Бонитенко Е.Ю. Спирты: Серия «Токсикология для врачей». - СПб: ООО Издательство «ФОЛИАНТ», 2004. - 112 с.
- [26] Большая медицинская энциклопедия//Гл.редактор Б.В.Петровский, 3-е издание. - М: Советская энциклопедия, т.26, 1985, 560с.
- [27] Dasgupta A. Alcohol and Its Biomarkers: Clinical Aspects and Laboratory Determination (Clinical Aspects and Laboratory Determination of Biomarkers). 1st edition. - Elsevier Science, 2015. – 312 p. [Dasgupta A. Алкоголь и его биомаркеры: клинические аспекты и лабораторное определение (клинические аспекты и лабораторное определение биомаркеров). 1-е издание. - Elsevier Science, 2015. – 312 p.]
- [28] Мирошниченко Л.Д., Пелипас В.Е. Наркологический словарь. Часть 1. Алкоголизм. – М., 2001. – 192 с..
- [29] Ливанов Г.А. и соавт. Клиника, диагностика и лечение острых отравлений алкоголем и его суррогатами. // Злоупотребление алкоголем в России и здоровье населения. Острые отравления этиловым алкоголем и его суррогатами. Соматическая патология при хронической алкогольной интоксикации. – М., 2000. – С. 62-106.
- [30] Лужников Е.А., Костомарова Л.Г. Острые отравления: Руководство для врачей. – М., 1989. – 432 с.
- [31] Стабников В.Н., Ройтер И.М., Процюк Т.Б. Этиловый спирт. – М., 1976. – 346 с.
- [32] Методические указания о судебно-медицинской диагностике смертельных отравлений этиловым алкоголем и допускаемых при этом ошибках (утв. Минздравом СССР 03.07.1974). – М.: Минздрав СССР, 1974. – 12 с.
- [33] Нужный В.П. Токсикологическая характеристика этилового спирта, алкогольных напитков и содержащихся в них примесей. // Вопр. наркологии. - 1995. - №3. - С. 65-74.
- [34] Zuba D. et al. Ethanol and other volatile compounds. Kinetics in alcohol dependent patients with ethanol. // Toxicol. Clin. Toxicol. – 2001. – V. 39, №

3. – Р. 229-230.

- [35] Варшавец Н.П. Судебно-медицинская экспертиза острых отравлений пропиловыми спиртами и спиртосодержащими жидкостями. // Суд.-мед. экспертиза. – 1986. – Т.29, № 3. – С. 40-43.
- [36] Лисовик Ж.А., Ключев А.Е. Современные методы лабораторной диагностики при острых химических отравлениях. // Анестезиол. и реаниматол. – 1995. - № 3. – С. 43-45.
- [37] Ключев А.Е., Белова М.В., Изотов Б.Н., Лужников Е.А. Количественное определение технических жидкостей в дифференциальной диагностике острых отравлений. // Токсикол. вестник. – 1997. - № 3. – С. 43-45.
- [38] Белова М.В., Лисовик Ж.А., Колдаев А.А., Ключев А.Е. Анализ образцов алкогольной продукции, как причины острого отравления. // Сб.: Тез. Первой научно-практич. конф. «Идентификация качества и безопасность алкогольной продукции» (1-4 марта 1999 г.). – П.
- [39] Красик Е.Д., Миневич В.Б., Агарков А.П. Опьянение, абстинентный синдром и психозы при злоупотреблении суррогатами алкоголя. // Неотложная наркология. – Тез. докл. – Харьков, 1987. – С. 99-101.
- [40] Wurst F.M., Skipper G.E., Weinmann W. Ethyl Glucuronide - the Direct Ethanol Metabolite on the Threshold from Science to Routine Use // Society for the Study of Addiction to Alcohol and Other Drugs. *Addiction*. 2003; 98(2):51-61. [Wurst F.M., Skipper G.E., Weinmann W. Этилглюкуронид - прямой метаболит этанола на пороге от научного к рутинному использованию // Society for the Study of Addiction to Alcohol and Other Drugs. *Addiction*. 2003; 98(2):51-61.]
- [41] <http://c-d-t.ru/pryamy-e-markery/>.
- [42] <http://c-d-t.ru/nepryamy-e-markery/>.
- [43] Sorio, D., De Palo, E. F., Bertaso, A., Bortolotti, F., & Tagliaro, F. (2016). Fluorescent adduct formation with terbium: a novel strategy for transferrin glycoform identification in human body fluids and carbohydrate-deficient transferrin HPLC method validation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(5), 1369–1378. doi:10.1007/s00216-016-0069-9.
- [44] G.Musile, E.F.De Palo, S.A.Savchuk, K.Shestakova, F.Bortolotti, F.Tagliaro A novel low-cost approach for the semi-quantitative analysis of carbohydrate-

deficient transferrin (CDT) based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) // *Clinica Chimica Acta* 495 (2019) 556-561.

- [45] Руководство по судебной экспертизе наркотиков, с помощью которых совершаются насильственные действия сексуального характера и другие преступные деяния. Секция лабораторного и научного обеспечения УНП ООН Вена - Нью-Йорк, 2013 год. с.54.
- [46] Савчук С.А., Григорьев А.М., Катаев С.С., Изотов Б.Н., Гофенберг М.А., Гизетдинова Л.А., Мингазов А.А., Никитина Н.М. Обнаружение метаболитов синтетических каннабимиметиков в моче, волосах и сыворотке крови методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием. // Информационное письмо ННЦ Наркологии Минздрава России. – М.: 2014.
- [47] Савчук С.А., Изотов Б.Н. Идентификация наркотических и психоактивных веществ в биологических жидкостях и волосах методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием. // Информационное письмо ННЦ Наркологии Минздрава России. – М.: 2014.
- [48] Савчук С.А. Обнаружение синтетических каннабимиметиков, наркотических, психоактивных веществ и их метаболитов в моче, волосах и ногтях методами жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием. // Информационное письмо ННЦ Наркологии Минздрава России. – М.: 2014.