

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РОССИЙСКИЙ ЦЕНТР СУДИБНО-МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ОБНАРУЖЕНИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЕТУЧИХ ТОКСИЧНЫХ ВЕЩЕСТВ
И ГЛИКОЛЕЙ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ
МЕТОДАМИ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ
И ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**

Методические рекомендации

Москва
2020

Сад

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

А.В. Ковалев
«29» октября 2019 г.

**ОБНАРУЖЕНИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЕТУЧИХ
ТОКСИЧНЫХ ВЕЩЕСТВ И ГЛИКОЛЕЙ В БИОЛОГИЧЕСКИХ
ОБЪЕКТАХ МЕТОДАМИ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И
ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**

Методические рекомендации

УДК: 340.67
ББК: 58

Авторы:

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

Ризанова Лилия Нажиповна - заведующая клинико-диагностической лабораторией БУ ХМАО-Югры «Нижневартовская 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 Пилина 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 Муслинова Мария Александровна;

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

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

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

Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, заместитель декана по научно-инновационной работе Родин Игорь Александрович, доктор химических наук;

Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, младший научный сотрудник Площенко Иван Викторович.

Рецензенты:

А.К. Буряк – директор ФГБУН «Институт физической химии и электрохимии им. А.Н.Фrumкина РАН», профессор, д.х.н.

Р.А. Калёкин – главный научный сотрудник отдела специальных инновационных исследований ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России, д.фарм.н.

А.М. Орлова – ведущий научный сотрудник отдела специальных инновационных исследований ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России, к.фарм. наук.

Рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России (протокол № 4 от 29 октября 2019 года).

ISBN: 978-5-9631-0812-3

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.....	6
1 Объекты исследований для обнаружения и количественного определения летучих токсичных веществ и гликолей.....	7
1.1 Кровь.....	7
1.2 Моча.....	8
1.3 Слюна.....	9
1.4 Внутривенная жидкость.....	9
1.5 Волосы.....	9
1.6 Ногтевые пластины.....	10
1.7 Содержимое желудка.....	10
1.8 Органы и ткани трупа.....	10
1.9 Рекомендуемый алгоритм действий по определению пригодности объектов к исследованию на этанол и летучие токсичные вещества.....	10
2 Газохроматографические методы исследования летучих веществ и компонентов технических жидкостей.....	12
2.1 Требования к рабочему месту.....	12
2.2 ГХ-МС метод парофазного анализа без термостатирования для идентификации и количественного определения этанола и летучих токсичных соединений в биологических объектах с колонкой HP-FFAP... ..	13
2.2.1 Аппаратура и условия хроматографирования.....	13
2.2.2 Приготовление градуировочных растворов, содержащих этанол, метанол, ацетон, изопропанол и раствора внутреннего стандарта.....	14
2.2.3 Пробоподготовка.....	14
2.2.4 Результаты исследования.....	15
2.3 ГХ-МС определение компонентов технических жидкостей в биологических объектах с хроматографической колонкой HP-FFAP методом прямого ввода.....	18
2.3.1 Аппаратура и условия хроматографирования.....	18
2.3.2 Приготовление градуировочных растворов, содержащих компоненты технических жидкостей (этиленгликоль, диэтиленгликоль и вещества близкие им по летучести) и раствора внутреннего стандарта циклогексанола.....	19
2.3.3 Пробоподготовка.....	20
2.3.4 Результаты исследования.....	20
2.4 ГХ-МС метод парофазного анализа без термостатирования для идентификации летучих токсичных соединений с хроматографической колонкой HP-5MS.....	22
2.4.1 Аппаратура и условия хроматографирования.....	22
2.4.2 Пробоподготовка.....	22
2.4.3 Результаты исследования.....	23
2.5 ГХ-ДИП метод обнаружения и количественного определения этанола и других летучих веществ с хроматографической колонкой HP-FFAP.....	24
2.5.1 Аппаратура и условия хроматографирования.....	24
2.5.2 Пробоподготовка.....	24
2.5.3 Пробоподготовка.....	24
2.5.4 Результаты исследования.....	24
2.6 ГХ-ДИП метод определения этанола и других летучих веществ, обнаружение компонентов пропан-бутановых смесей с хроматографической колонкой HP-B ALC.....	25
2.6.1 Аппаратура и условия хроматографирования.....	25
2.6.2 Приготовление градуировочных растворов.....	25
2.6.3 Пробоподготовка.....	25
2.6.4 Результаты исследования.....	25
2.7 Оперативный контроль качества измерения.....	29
3 Методы определения этилглюкуронида – прямого метаболита этанола.....	29
3.1 Предварительное выявление этилглюкуронида иммунохроматографическим методом.....	30
3.2 Определение этилглюкуронида методом ВЭЖХ-МС/МС.....	31
3.2.1 Аппаратура и условия хроматографирования.....	31
3.2.2 Пробоподготовка.....	32
3.2.2.1 Подготовка проб крови для определения этилглюкуронида.....	32
3.2.2.2 Подготовка проб мочи для определения этилглюкуронида.....	32
3.2.2.3 Подготовка проб волос и ногтевых пластин.....	33
3.2.2.4 Подготовка проб для определения этилглюкуронида в сухих пятнах крови.....	33
3.2.3 Результаты исследований.....	36
4 ВЭЖХ метод определения карбогидрат-дефицитного трансферрина.....	44
4.1 Аппаратура и условия хроматографирования.....	45
4.2 Реагенты.....	45
4.3 Пробоподготовка.....	46
4.4 Результаты исследований.....	46
5 ГХ-МС метод определения гамма-гидроксибутирата (ГНВ).....	47
5.1 Аппаратура и условия хроматографирования.....	47
5.2 Пробоподготовка.....	48
5.3. Результаты исследований.....	48
Список литературы.....	51
Приложение 1. Компоненты технических жидкостей, определяемые на хроматографических колонках HP-FFAP 50м;0.32мм;0.50мкм и HP-B ALC 7,5м;0.32мм;20мкм.....	54
Приложение 2. Компоненты технических жидкостей, определяемые в моче методом прямого ввода на колонке HP-FFAP 50м;0.32мм;0.50мкм.....	55

Введение

Методические рекомендации предназначены 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, прямого 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.

Методические рекомендации содержат 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. Установлены рекомендуемые пороговые значения при определении этанола в трупной крови: cut off - 0,5 г/л, «серая зона» - 0,5-0,8 г/л. При попадании результатов в «серую зону» необходимы исследования на наличие/отсутствие этилглюкуронида, маркеров гниения, концентрации глюкозы. По результатам определения этилглюкуронида установить состояние опьянения не представляется возможным, устанавливается только факт употребления алкоголя. Впервые представлена техника определения этилглюкуронида в «сухих пятнах» крови с объектов вещественных доказательств. Также впервые представлен метод определения карбогидрат-дефицитного трансферрина в цельной, гемолизированной (трупной) крови, а также в «сухих пятнах» крови.

Выявлены различия в новообразовании этанола при хранении трупной крови и крови от живых лиц, отобранной с гепарином. Показана устойчивость крови, отобранной в вакуумные пробирки с антикоагулянтом, к новообразованию этанола.

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

1.1 Кровь

Во избежание ложноположительных результатов, категорически нельзя пользоваться спиртосодержащими дезинфицирующими средствами для обработки рук персонала и рабочего стола, а также инъекционного поля.

Кровь от живых лиц берут из поверхностной вены с соблюдением правил асептики с помощью специальной двусторонней иглы в две вакуумные пробирки с фторидом натрия/оксалатом калия (рис.1а) или другим антикоагулянтом, объемом не менее 5,0 мл в каждую [1]. Содержимое пробирок необходимо сразу тщательно перемешать. Одна из пробирок – анализируемый образец, вторая – контрольный образец, который сохраняется на случай проведения дополнительного анализа [2, 3].

Также можно отбирать кровь из поверхностной вены стерильным шприцем в два пенициллиновых флакона, в которые добавлен гепарин, из расчета 1-2 капли на 5 мл крови (контрольный образец NaF из расчета 2-4 мг на 1 мл образец 10 мл) [2]. Рекомендовано добавление NaF из расчета 2-4 мг на 1 мл крови [3]. Содержимое флаконов необходимо сразу тщательно перемешать. Маркировку и опечатывание взятых образцов крови проводят в соответствии с действующим регламентом.

Применение вакуумных пробирок с консервантом и антикоагулянтом предпочтительно по ряду причин: стерильная вакуумная среда не содержит кислорода, способствующего росту микроорганизмов; фторид натрия в качестве консерванта подавляет рост микроорганизмов и ингибирует гликолиз; антикоагулянт обеспечивает сохранение форменных элементов крови (эритроцитов, лейкоцитов). По имеющимся данным [4], в гепаринизированной крови нейтрофилы некоторое время сохраняют способность к фагоцитозу в условиях *in vitro*, соответственно препятствуя росту бактерий.

Кровь трупа берут стерильным одноразовым шприцем из периферических венозных сосудов (бедренной, подвздошной вен) или пазух твердой оболочки головного мозга. Вносят через иглу шприца в две вакуумные пробирки с фторидом натрия/оксалатом калия [5], объемом не менее 5,0 мл в каждую или в два пенициллиновых флакона с добавлением NaF из расчета 2-4 мг на 1 мл крови. Недопустимо зачерпывать кровь для исследования из полостей тела или выдавливать ее из внутренних органов. Один из образцов – анализируемый, второй – контрольный. Маркировку и опечатывание взятых образцов крови проводят в соответствии с действующим регламентом.

Температурные условия для жидкой крови. 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.

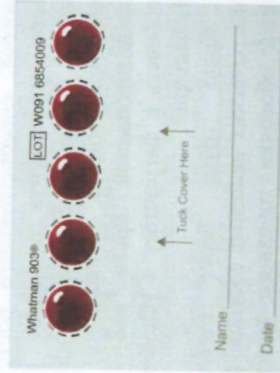
Предварительно замороженные образцы крови допускаются транспортировать к месту исследования в сумке-холодильнике при температуре не выше +4°C. При приемке проб фиксируют температуру в сумке-холодильнике. Непосредственно перед проведением исследования анализируемый образец полностью размораживают при температуре от +20°C до +25°C и тщательно перемешивают.

Техника приготовления «сухих пятен» крови. Кровь для исследования на этилглюкуронид, карбогидрат-дефицитный трансферрин и некоторые другие целевые анализы можно хранить и транспортировать в виде сухих пятен на специальных тест-бланках (например, Whatman 903, диаметр пятна 13 мм, объем пятна не менее 60 мкл или аналогичные). В экспериментах показано, что этилглюкуронид стабилен в крови при хранении в течение 2 недель в высушенном виде на бумажном носителе [6].

Кровь наносят каплями на бланки (карточки) из специальной фильтровальной бумаги с напечатанными на них кружками (рис.1б). На каждой обязательно вносят сведения по идентификации образца. Для каждой пробы используется не менее двух бланков, один из бланков сохраняется в качестве контрольного, на случай проведения дополнительного анализа. Пятна сушат на горизонтальной поверхности не менее 2 часов при комнатной температуре, в защищенном от прямого попадания солнечных лучей месте. Полностью высушенные образцы помещают в герметичный конверт и хранят в холодильнике при температуре не выше +4°C. К месту исследования пробы транспортируют в сумке-холодильнике.



а



б

Рисунок 1. а – Вакуумная пробирка с фторидом натрия/оксалатом калия, международная маркировка цвета крышки – серая. Фторид натрия и оксалат калия выступают в качестве антикоагулянтов, кроме того, фторид натрия стабилизирует уровень глюкозы.
б – Пример нанесения капель крови на тест-бланк Whatman 903.

1.2 Моча

Мочу отбирают в две одноразовые емкости из бесцветного прозрачного

материала с герметично закрывающейся крышкой, в количестве не менее 30,0 мл в каждую: анализируемый образец и контрольный образец. Необходимо, чтобы объем воздуха над пробой был минимальным. На каждые 10,0 мл мочи добавляют 20 мг NaF в качестве консерванта.

Емкости маркируют в соответствии с действующим регламентом.

Если исследование не проводят сразу после сбора мочи, пробы немедленно замораживают при температуре не выше -18°C.

Предварительно замороженные образцы мочи транспортируют к месту исследования в сумке-холодильнике при температуре не выше +4°C.

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

1.3 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 две чистые пробирки с герметично закрывающейся пробкой: анализируемый образец и контрольный образец. На каждые 1,0 мл слюны добавляют 2-4 мг NaF.

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.

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

1.4 Внутриглазная жидкость

Материал отбирают стерильным шприцем и вносят в две пробирки с фторидом натрия (консервант), в количестве не менее 5,0 мл в каждой: анализируемый образец и контрольный образец.

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

Предварительно замороженные образцы допускаются 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.

1.5 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

пучки толщиной около 0,5 см. Отобранные пробы делят на две равные части и помещают в конверты: анализируемый образец и контрольный образец.

Образцы хранят при температуре не выше +4°C. Образцы допускаются транспортировать к месту исследования при температуре до +25°C.

1.6 Ногтевые пластины

Необходимо отобрать не менее 100 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.

Образцы хранят при температуре не выше +4°C. Образцы допускаются транспортировать к месту исследования при температуре до +25°C.

1.7 Содержимое желудка

Содержимое желудка отбирают в две 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 добавляют 20 мг NaF в качестве консерванта.

Если исследование не производят сразу после изъятия, пробы немедленно замораживают при температуре не выше -18°C. Предварительно замороженные образцы транспортируют к месту исследования в сумке-холодильнике при температуре не выше +4°C.

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

1.8 Органы и ткани трупа

Каждый вид объекта отбирают в две емкости с герметично закрывающейся крышкой, в количестве не менее 50,0 г в каждой: анализируемый образец и контрольный образец. Емкости подбирают такого объема, чтобы количество воздуха над пробой было минимальным. Образцы немедленно замораживают при температуре не выше -18°C. К месту исследования транспортируют в сумке-холодильнике при температуре не выше +4°C. Перед проведением исследования объекты размораживают при температуре от +20°C до +25°C. Для анализа используют межклеточную и внутриклеточную жидкость, образующуюся в результате лизиса после замораживания и размораживания образцов.

1.9 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. Образцы 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 [2, 7]. На каждой емкости с объектами должны быть этикетки с необходимыми записями, включая дату и время отбора/изъятия пробы. Емкости должны быть герметично закупорены, объем воздуха над биологическим объектом должен быть минимальным.

При несоблюдении условий хранения биологических объектов после отбора и при их транспортировке биологические объекты на химико-токсикологические исследования не принимаются [2].

При нарушении требований по отбору, упаковке и транспортировке крови, мочи и тканей объекты, направленные в судебно-химическое отделение, исследованию не подлежат [8].

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 хранятся до начала исследования при температуре не выше +2°C [2]. Объекты хранят в герметически закрытой посуде в условиях, исключающих их хищение, утрату, порчу или видоизменение [7].

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 [7].

Предварительные химико-токсикологические исследования биологического материала, взятого от живых лиц, выполняют не позднее 2 часов с момента отбора, подтверждающие – не позднее трех рабочих дней с момента поступления объекта в лабораторию [9].

При оказании медицинской помощи пациентам при токсическом действии алкоголя выполняют исследование уровня этанола, метанола в крови и в моче в течение 2-х часов госпитализации [10]. Обязательно одномоментное взятие крови и мочи, интервал не должен превышать 5 – 10 минут [11].

3. В случае необходимости дифференцировать прижизненно употребленный этанол от возможно новообразованного из сахаров вследствие микробной активности, рекомендуется измерить уровень глюкозы в крови перед началом исследования методом «сухой химии» (глюкометры с тест-полосками). Критерием пригодности образца для определения этанола (кроме случаев гипогликемического состояния) считать уровень глюкозы $\geq 0,5$ ммоль/л.

В таблице 1 даны возможные варианты интерпретации результатов определения в крови и в моче этанола, этилглюкуронида (EtG), летучих маркеров брожения и глюкозы.

4. При необходимости убедиться в пригодности образца мочи, определяют физико-химические свойства (тест-полосками): pH мочи должна быть в

пределах 4–8, относительная плотность в пределах 1,008–1,025 [2, 9].

Таблица 1

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

Объект	Этано	EtG	Летучие маркеры брожения	Глюкоза, ммоль/л	Варианты интерпретации
Кровь	+	+	-	≥ 0,5	Прижизненное употребление этанола
Моча	+	+	-	≥ 0,5	С момента употребления алкоголя прошло менее 45 мин. Или: не исключена контаминация образцов этанолом
Кровь	+	-	-	≥ 0,5	Время, прошедшее после употребления алкоголя, превышает время элиминации этанола из крови
Моча	+	+	-	≥ 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
Кровь	+	+	+	< 0,5	Возможно завышение содержания этанола в крови за счет сбраживания глюкозы
Моча	+	+	-	≥ 0,5	Новообразование этанола при ненадлежащем отборе или хранении образца, а также при повреждении трупа с возможностью бактериального загрязнения
Кровь	+	-	+	< 0,5	Достоверно установить факт употребления алкоголя не представляется возможным
Моча	+	-	-	≥ 0,5	

2 Газохроматографические методы исследования летучих веществ и компонентов технических жидкостей

2.1 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 м² 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.).

2.2 ГХ-МС метод парфазного анализа без термостагирования для идентификации и количественного определения этанола и летучих токсичных соединений в биологических объектах с хроматографической колонкой HP-FFAP

2.2.1 Аппаратура и условия хроматографирования

ГХ-МС оборудование
Хроматограф газовый с монокадрупольным масс-селективным детектором и автосамплером, обеспечивающий погрешность измерения целевых компонентов в среднем диапазоне градуировочной кривой не выше 5% (СКО) при парфазном вводе пробы без термостагирования (Agilent Technologies 7820/5975N или аналогичный по характеристикам).

Хроматографическая колонка
Капиллярная колонка HP-FFAP 50м;0,32мм;0,5мкм 19091F-115 (полиэтиленгликоль, модифицированный нитротерфталевой кислотой) или аналогичная по характеристикам.

Условия хроматографирования
Газ-носитель - гелий марки «А».
Постоянный поток через колонку 1,3 мл/мин.

Температура инжектора 180°C.

Температура интерфейса 190°C.

Программа термостага колонок:

60°C (4 мин), градиент 10°C/мин, 190°C (30 мин).

После каждых 50 анализов прибор кондиционируют в течение часа при температуре термостага колонок 210°C.

Условия масс-спектрометрического детектирования

Температура источника ионов 230°C.
Температура анализатора 150°C.
Режим сканирования по полному ионному току (SCAN).
Диапазон масс m/z 29-350 а.е.м.

Напряжение на умножителе: результат, полученный при автоматической настройке по перфторбутиламину в режиме lowpass tune.

Ввод пробы

Парогазовая фаза 50 мкл газоплотным шприцем.
Деление потока 1/10.

Уровень опускания иглы шприца позиционируют на 23 мм от минимального нижнего значения.

2.2.2 Приготовление градуировочных растворов, содержащих этанол, метанол, ацетон, изoproпанол и раствора внутреннего стандарта, содержащего н-пропанол

Для градуировки приборов растворы готовят на биологической матрице, которая будет использоваться для анализа (кровь, моча, слона, ткани органов), не содержащей целевые аналиты. На практике применяют одну из двух единиц измерения – промилле (‰) и г/л. Пересчет из одной единицы измерения в другую производят с учетом данных об удельном весе определяемого вещества.

- 1) Точка 6‰ «А». От 10 мл биожидкости отобрать и отбросить 240 мкл и дозировать по 60 мкл метанола х.ч, ацетона х.ч, изoproпанола х.ч., этанола 95% (концентрация этанола в растворе составит 5,70‰),
- 2) Точка 3‰ «В». Разбавить биожидкостью смесь «А» в 2 раза (концентрация этанола в растворе составит 2,85‰).
- 3) Точка 1‰ «С». Разбавить биожидкостью смесь «В» в 3 раза (концентрация этанола в растворе составит 0,95‰).
- 4) Точка 0,3‰ «D». Разбавить биожидкостью смесь «В» в 10 раз (концентрация этанола в растворе составит 0,29‰).

Внутренний стандарт (ВС) пропанола-1 концентрацией 10‰. В 10 мл дистиллированной воды дозировать 100 мкл пропанола-1. Концентрация пропанола-1 в этом растворе 10‰.

2.2.3 Пробоподготовка

Для предварительного качественного исследования: 1,5 мл исследуемого образца дозировать в вилу, герметично укулировать крышкой с центрально расположенной тefлоновой вставкой. Поместить вилу в автосамплер прибора.

Для количественного исследования: в две вилы дозировать по 1,5 мл исследуемого образца в каждую, добавив по 100 мкл водного раствора ВС, укулировать герметичной крышкой с центрально расположенной тefлоновой

вставкой. Поместить вилы в автосамплер прибора. Проводится по одному исследованию парогазовой фазы из каждой вилы (повтор 1 и повтор 2).

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

2.2.4 Результаты исследования

Идентификацию соединений в методе ГХ-МС выполняют по масс-спектрам (используют стандартные библиотеки масс-спектров MPW, NIST, Wiley) и временам удерживания соединений (приложение 1). Перед каждым исследованием анализируют фон воздуха помещения (бланковый образец) из пустой вилы. В фоне не должны детектироваться пики целевых соединений.

Количественный расчет проводят по методу внутреннего стандарта. Учитывая, что концентрация этанола в трупной крови новообразованного в результате микробиальной активности этанола может достигнуть 0,5-1,0‰ [12] и более, 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 непрямым 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, изoproпанол, этанол, ацетонитрил, н-пропанол, н-бутанол. На рис. 3 приведена хроматограмма парогазовой фазы мочи, содержащей дихлорэтан. Кроме 1,2-дихлорэтана в исследуемой моче определены ацетон, метилэтилкетон, метилпропилкетон – вещества, накапливающиеся вследствие нарушения гомеостаза при отравлении хлорированными углеводородами.

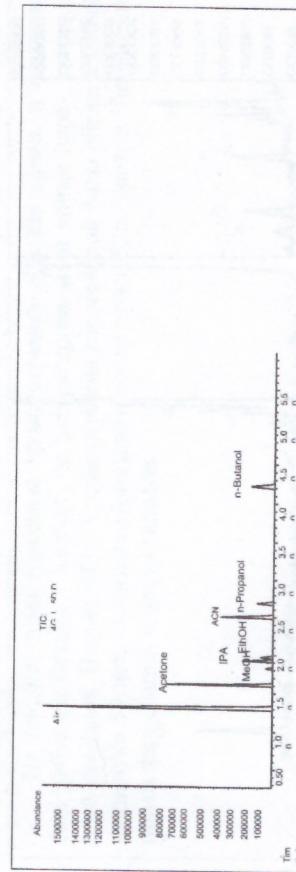


Рисунок 2. Хроматограмма градуировочной смеси летучих органических соединений, добавленных в кровь в концентрации 3,2 г/л. Времена удерживания (RT): воздух – 1,31 мин, ацетон – 1,61 мин, метанол – 1,81 мин, изoproпанол – 1,88 мин, этанол – 1,96 мин, ацетонитрил – 2,50 мин, н-пропанол – 2,68 мин, н-бутанол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

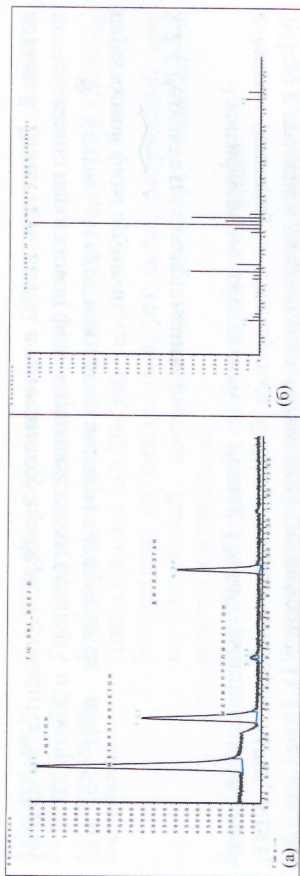


Рисунок 3. (а) - Хроматограмма (SCAN) по полному ионному току мочи (отобранной от живого лица) при отравлении 1,2-дихлорэтаном. (б) - Масс-спектр 1,2-дихлорэтана, соответствующий пику 9.77 мин. Содержание дихлорэтана в крови 8.2 мг/л, в моче 41.3 мг/л. Метод – парофазный анализ без термостатирования,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

На рис. 4 представлен хроматографический профиль парогозовой фазы крови от трупа, подвергшейся микробальному брожению. Обнаруженные в пробе ацетон, метилэтилкетон, метилпропилкетон и метилэтилкетон, являются, по нашему мнению, возможными маркерами «химического» стресса. В данном примере: ацетальдегид может являться как продуктом спиртового брожения - маркером микробального 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 этилглюкохуронида. Ацетон и метилэтилкетон – могут иметь эндогенное происхождение, этилацетат – возможный продукт взаимодействия новообразованных этанола и уксусной кислоты.

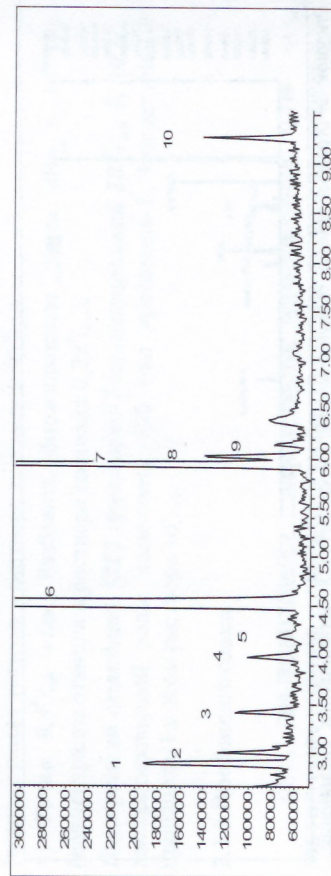


Рисунок 4. Хроматографический профиль в режиме полного сканирования парогозовой фазы крови от трупа ребенка 6 лет (ДТП), подвергшейся микробальному брожению. ГХ-МС «Маэстро» 7820/5975N с колонкой HP-FFAP 50 м, 0.32 мм, 0.50 мкм. Времена удерживания: 1. Ацетальдегид (RT=2.87 мин), 2. Дисульфид углерода (RT=3.01 мин).

3. Ацетон (RT=3.43 мин), 4. Этилацетат (RT=3.98 мин), 5. Метилэтилкетон (RT=4.19 мин), 6. Этанол (RT=4.51 мин), 7. Хлороформ (RT=5.95 мин), 8. Тетрахлорэтилен (RT=6.02 мин), 9. Пропанол-1 (RT=6.143 мин), 10. Изоамиловый спирт (RT=9.26 мин).

На рис. 5 представлена еще одна хроматограмма парогозовой фазы крови от трупа, также подвергшейся микробальному воздействию, и масс-спектры выявленных маркеров брожения. В данной пробе были выявлены этанол, н-бутанол и диметилсульфид, который может быть как продуктом спиртового брожения, так и продуктом деградации серосодержащих белков крови.

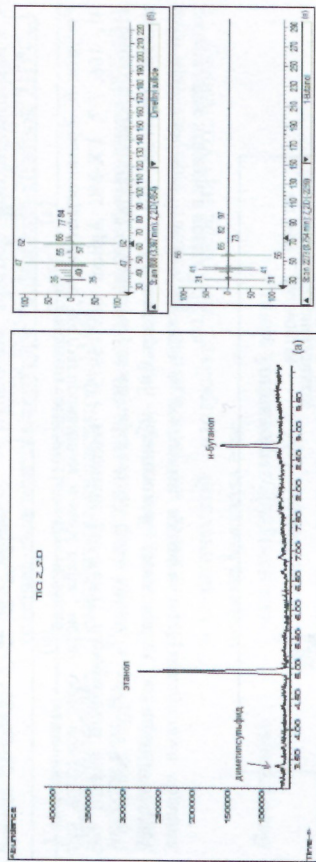


Рисунок 5. (а) - Хроматограмма парогозовой фазы крови от трупа ребенка 11 лет (утопление), подвергшейся микробальному брожению: диметилсульфид (RT=3.39 мин), этанол (RT=4.91 мин), н-бутанол (RT=8.75мин), ГХ-МС «Маэстро» 7820/5975N с колонкой HP-FFAP 50 м, 0.32 мм, 0.50 мкм. (б) - Масс-спектр, соответствующий пику 3.39 мин (верхний спектр) в сравнении с библиотечным масс-спектром диметилсульфида (нижний спектр). (в) - Масс-спектр, соответствующий пику 8.75 мин (верхний спектр) в сравнении с библиотечным масс-спектром н-бутанола (нижний спектр).

На рис.6(а) представлены хроматограмма образца крови, в которую был добавлен бензин 1 мкл/мл, по экстрагированным ионам пара-, мета- и орто-ксилолов. На рис.6(б) - хроматограмма парогозовой фазы образца крови пациентки 59 лет, госпитализированной после пожара, по экстрагированным ионам пара-, мета- и орто-ксилолов.

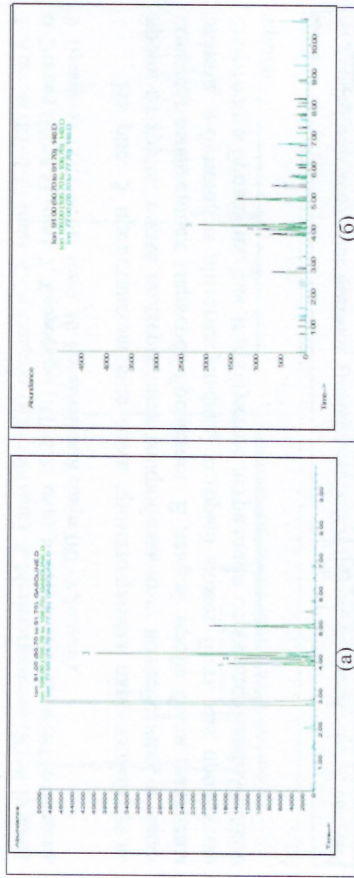


Рисунок 6. Хроматограммы по экстрагированному иону пара-, мета-, орто-ксилолов, m/z 91, 106, 77. ГХ-МС Agilent 6890/5973 с колонкой HP-FFAP, парфазный анализ без термостабилизации. (а) - Хроматограмма паргазовой фазы крови, в которую добавлен 1 мкл/мл бензина. (б) - Хроматограмма паргазовой фазы крови женщины 59 лет, госпитализированной после пожара в состоянии интоксикации продуктами горения, содержание этанола в крови 2,51 г/л.

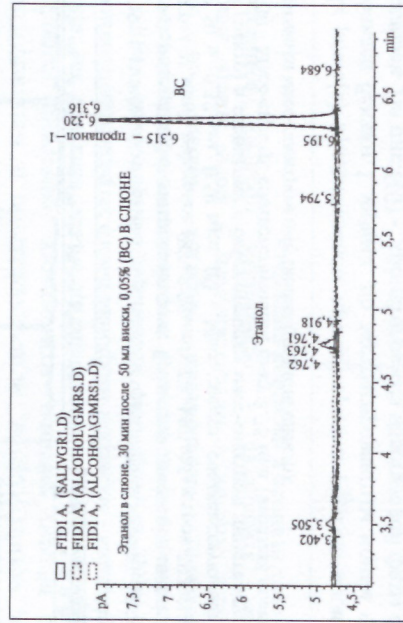


Рисунок 7. Хроматограмма паргазовой фазы слюны добровольца Р, 44 года после употребления 50 мл виски. Содержание этанола 0,3 г/л, внутренний стандарт n-пропанол.

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

2.3.1 Аппаратура и условия хроматографирования

ГХ-МС Хроматограф газовый с моноквадрупольным масс-селективным детектором и автосамплером (Agilent Technologies 7820/5975N или аналогичный по характеристикам).

Хроматогра- Капиллярная колонка HP-FFAP 50м; 0,32мм; 0,5мкм

Физическая колонка

1909 IF-115 (полиэтиленгликоль, модифицированный нитротерфталевой кислотой) или аналогичная по характеристикам.

Условия хроматографирования

Газ-носитель - гелий марки «А».
 Постоянный поток через колонку 1,3 мл/мин.
 Температура инжектора 180°C.
 Температура интерфейса 190°C.
 Программа термостага колонок: 60°C (4 мин), градиент 10°C/мин, 190°C (30 мин).
 После каждых 50 анализов прибор кондиционируют в течение часа при температуре термостага колонок 210°C.
 Температура источника ионов 230°C.
 Температура анализатора 150°C.

Условия масс-спектрометрического детектирования

Режим сканирования по полному ионному току (SCAN).
 Диапазон масс m/z 29- 350 а.е.м.
 Напряжение на умножителе: результат, полученный при автоматической настройке по перфторбутиламину в режиме lowmass tune.

Ввод пробы

1 мкл центрифугированной мочи.
 Деление потока 1/15.
 Уровень опускания иглы шприца позиционируют на 0 мм от минимального нижнего значения.

2.3.2 Приготовление градуировочных растворов, содержащих компоненты технических жидкостей (этиленгликоль, диэтиленгликоль и вещества близкие им по летучести) и раствора внутреннего стандарта циклогексанола

Для градуировки приборов растворы готовят на биологической матрице, которая будет использоваться для анализа (моча), не содержащей целевые аналиты.

1) **Точка 500 мкг/мл «А».** 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:

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

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.

2) **Точка 50 мкг/мл «В».** Разбавить биожидкостью смесь «А» в 10 раз.

3) **Точка 5 мкг/мл «С».** Разбавить биожидкостью смесь «В» в 10 раз.

Внутренний стандарт (ВС) циклогексанола концентрацией 0,1% об. 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.

2.3.3 Пробоподготовка

Малолетучие соединения: этиленгликоль, диэтиленгликоль и близкие им по летучести, перечисленные в приложении 2, анализируют прямым вводом 1 мкл биожидкости в приложение 2, анализируют прямым вводом 1 мкл биожидкости в хроматограф. Мочу предварительно центрифугуют, для анализа отбирают супернатант. Для проведения центрального 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.

2.3.4 Результаты исследования

Идентификацию соединений в методе ГХ-МС выполняют по масс-спектрам (используют стандартные библиотечные масс-спектры MPW, NIST, Wiley) и временам удерживания целевых соединений. Количественный расчет проводят по методу внутреннего стандарта с помощью программного обеспечения согласно инструкции к прибору. Времена удерживания целевых аналитов даны в приложении 2.

На рис.8 представлена хроматограмма мочи пациента (30 лет), госпитализированного в состоянии комы после употребления технической жидкости. В моче, отобранной в первые часы госпитализации, выявлены этиленгликоль и гликолевая кислота. На рис.9 – хроматограмма мочи этого же пациента на третий день после интоксикации этиленгликолем, в составе антидотной терапии получавшего этанол внутривенно капельно. Кроме этиленгликоля и гликолевой кислоты, в пробе присутствуют этанол, ацетон, ацетальдегид и уксусная кислота.

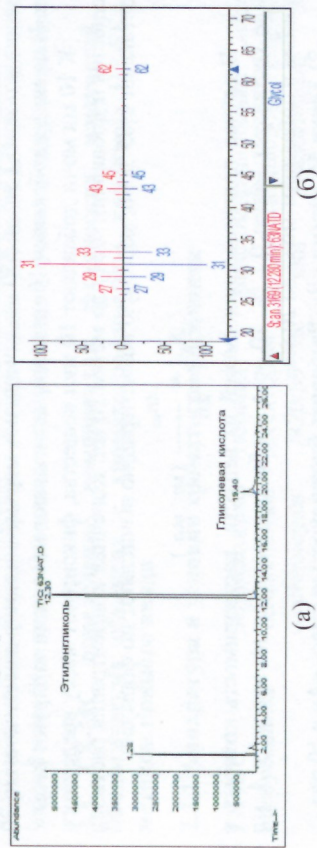


Рисунок 8. (а) - Хроматограмма по полному ионному току мочи пациента 30 лет, госпитализированного в состоянии комы вследствие интоксикации. Времена удерживания:

воздух – 1,28 мин, этиленгликоль – 12,28 мин, гликолевая кислота – 19,30 мин. (б) - Масс-спектр соответствующий пику 12,3 мин (верхний спектр) в сравнении с библиотечным масс-спектром этиленгликоля (нижний спектр). ГХ-МС Agilent 6890/5973, с колонкой HP-FFAP, прямой ввод 1 мкл мочи. Для улучшения хроматографических свойств желательнее добавлять в мочу 20% этанола. В этом случае при исследовании на этанол используют вторую аликвоту пробы.

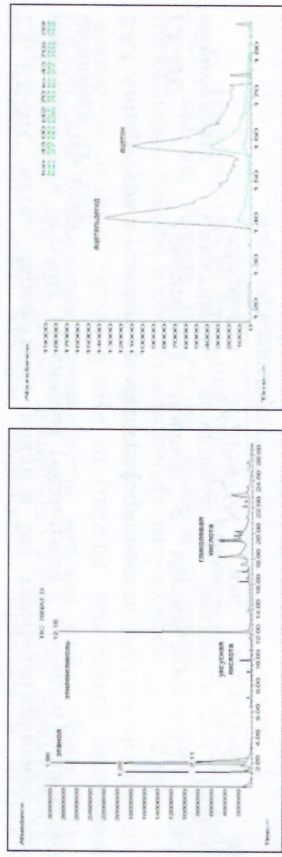


Рисунок 9. (а) - Хроматограмма по полному ионному току мочи пациента 30 лет на третий день госпитализации вследствие интоксикации этиленгликолем. Применялся антидотная терапия, включающая капельное введение этанола внутривенно. Времена удерживания: воздух – 1,28 мин, этанол – 1,96 мин, уксусная кислота – 9,97 мин, этиленгликоль – 12,18 мин, гликолевая кислота – 19,27 мин. (б) - Хроматограмма (фрагмент) по экстрагированным ионам, соответствующим ацетальдегиду и ацетону. Времена удерживания: ацетальдегид – 1,41 мин, ацетон – 1,58 мин. ГХ-МС Agilent 6890/5973, с колонкой HP-FFAP, прямой ввод 1 мкл мочи (без добавления этанола).

С целью токсикоманического опьянения употребляют также бутиленгликоль. На рис.10 представлен фрагмент хроматограммы мочи пациента Р., 37 лет, госпитализированного в состоянии комы вследствие острой интоксикации после употребления внутрь 1,4-бутандиола. В моче, отобранной в первые часы госпитализации, были выявлены 1,4-бутандиол и бутиролактон, которые в организме метаболизируются до СНВ (см. раздел 5) при участии ферментов алкогольдегидрогеназы и альдегиддегидрогеназы.

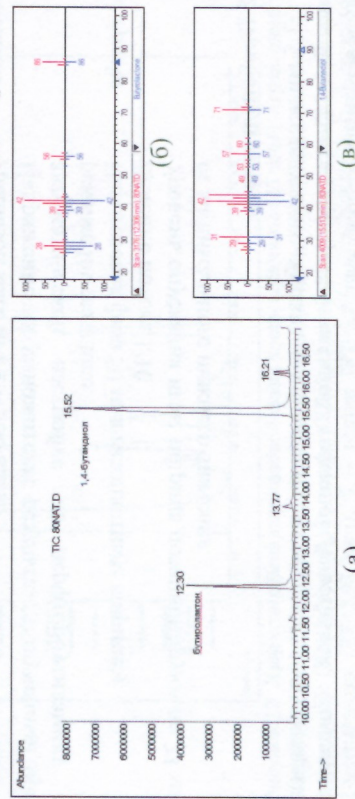


Рисунок 10. (а) – Фрагмент хроматограммы по полному ионному току мочи мужчины 37 лет, госпитализированного с интоксикацией бутиленгликолем. Времена удерживания:

бутиролактон – 12,31 мин, 1,4-бутандиол – 15,51 мин. (б) – Масс-спектр, соответствующий пику 12,31 мин (верхний спектр) в сравнении с библиотечным масс-спектром бутиролактона (нижний спектр). (б) – Масс-спектр, соответствующий пику 15,51 мин (верхний спектр) в сравнении с библиотечным масс-спектром 1,4-бутандиола (нижний спектр). ГХ-МС Agilent 6890/5973, с колонкой HP-FFAP, прямой ввод 1 мкл мочи. Для улучшения хроматографических свойств в мочу добавляли 20% этанола.

2.4 ГХ-МС метод парового анализа без термостатирования для идентификации летучих токсичных соединений с хроматографической колонкой HP-5MS

2.4.1 Аппаратура и условия хроматографирования

ГХ-МС оборудование Хроматограф газовый с моноквадрупольным масс-селективным детектором и автосамплером (Agilent Technologies 7820/5975N или аналогичный по характеристикам).

Хроматографическая колонка Капиллярная колонка HP-5MS (19091S-433) длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм, толщиной пленки неподвижной фазы 0,25 мкм ((5%-фенил)-метилполисилоксан) или аналогичная по характеристикам.

Условия хроматографирования Газ-носитель - гелий марки «А».

Постоянный поток через колонку 0,6 мл/мин.

Температура инжектора 270°C.

Температура интерфейса 280°C.

Программа термостага колонок:

60°C (4 мин), градиент 10°C/мин, 190°C (30 мин).

После каждых 50 анализов прибор кондиционируют в течение часа при температуре термостага колонок 210°C.

Температура источника ионов 230°C.

Температура анализатора 150°C.

Режим сканирования по полному ионному току (SCAN).

Диапазон масс m/z 29- 350 а.е.м.

Напряжение на умножителе: результат, полученный при автоматической настройке по перфторуглеводороду в режиме lowmass tune.

Ввод пробы Парогазовая фаза 50 мкл газоплотным шприцем.

Деление потока 1/10.

Уровень опускания иглы шприца позиционируют на 23 мм от минимального нижнего значения.

2.4.2 Подготовка

1,5 мл исследуемого образца дозировать в виалу, герметично укупорить крышкой с центрально расположенной тefлоновой вставкой. Поместить виалу в автосамплер прибора.

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

2.4.3 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 NIST, Wiley. Перед каждым исследованием анализируют фон воздуха помещения (бланковый образец) из пустой виалы. В фоне не должны детектироваться пики целевых соединений.

На рис. 11 представлена 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.

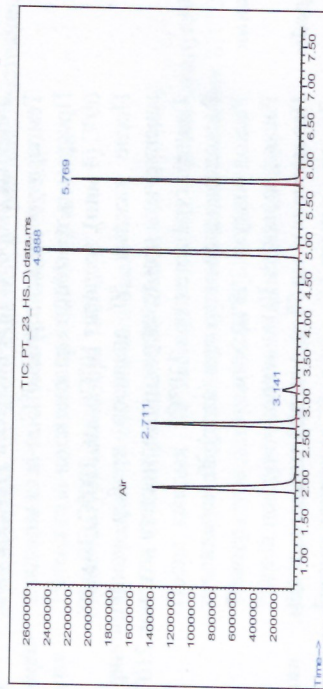


Рисунок 11. Хроматограмма паровозой фазы смеси летучих органических соединений, добавленных в кровь по 3,2 г/л. ГХ-МС Agilent 7820/5975 с колонкой HP-5ms 30 м, 0,25 мм, 0,25 мкм. Времена удерживания: воздух – 2,00 мин, этилацетат – 2,71 мин, бутанол-1 – 3,14 мин, толуол – 4,88 мин, бутилацетат – 5,76 мин.

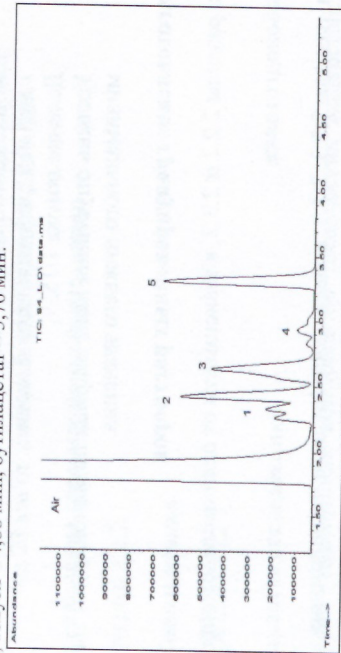


Рисунок 12. Хроматограмма паровозой фазы крови мужчины (43 года), отравление уайт-спиритом. Разметка хроматографических пиков соответствует соединениям: 1 - 2-метилпентан (RT=2,26 мин), 2 - гексан (RT=2,41 мин), 3 - циклогексан (RT=2,62 мин), 4 - 2-метилгексан (RT=2,93 мин), 5 - гептан (RT=3,29 мин). ГХ-МС Agilent 7820/5975 с колонкой HP-5ms 30 м, 0,25 мм, 0,25 мкм.

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

ГХ-ДИП Хроматограф газовый с пламенно-ионизационным детектором (Agilent Technologies 7890 или аналогичный по характеристикам).

Хроматографическая колонка Капиллярная колонка HP-FFAP 50м; 0,32мм; 0,5мкм 19091F-115 (полиэтиленгликоль, модифицированный нитрофталевой кислотой) или аналогичная по характеристикам.

Условия хроматографирования Газ-носитель - азот. Анализ в режиме постоянного давления газа-носителя (Constant Pressure).

Расход газа-носителя при 60°C - 1 мл/мин.

Линейная скорость газа-носителя 19,8-22,2 см/с.

Температура инжектора 210°C.

Программа термостага колонок:

60°C (4 мин), градиент 10°C/мин, 190°C (30 мин).

После каждых 50 анализов прибор кондиционируют в течение часа при температуре термостага колонок 210°C.

Условия детектирования Температура детектора 230°C.

Расход поддувочного газа (азот) 20 мл/мин.

Расход воздуха 300 мл/мин.

Расход водорода 30 мл/мин.

Парогазовая фаза 50 мкл газоплотным шприцем.

Деление потока 1/3.

Уровень опускания иглы шприца позиционируют на 23 мм от минимального нижнего значения.

или

1 мкл центрифугированной мочи.

Деление потока 1/15.

Уровень опускания иглы шприца позиционируют на 0 мм от минимального нижнего значения.

2.5.2 Приготовление градуировочных растворов

См. разделы 2.2.2 и 2.3.2, в зависимости от цели исследования.

2.5.3 Пробоподготовка

См. разделы 2.2.3, 2.3.3, в зависимости от цели исследования.

2.5.4 Результаты исследования

Времена удерживания определяемых соединений для колонки HP-FFAP представлены в приложениях 1 и 2.

2.6 ГХ-ДИП метод определения этанола и других летучих веществ, обнаружение компонентов пропан-бутановых смесей с хроматографической колонкой HP-B ALC

2.6.1 Аппаратура и условия хроматографирования

ГХ-ДИП Хроматограф газовый с пламенно-ионизационным детектором (Agilent Technologies 7890 или аналогичный по характеристикам).

Хроматографическая колонка Капиллярная колонка HP-Blood ALC длиной 7,5 м, внутренним диаметром 0,32 мм, толщиной пленки неподвижной фазы 0,20 мкм (19091S-510) или аналогичная по характеристикам.

Условия хроматографирования Газ-носитель - азот. Анализ в режиме постоянного давления газа-носителя (Constant Pressure).

Расход газа-носителя при 120°C - 3 мл/мин.

Температура инжектора 180°C.

Программа термостага колонок:

120°C (1 мин), градиент 25°C/мин, 165°C (1 мин).

После каждых 50 анализов прибор кондиционируют в течение часа при температуре термостага колонок 270°C.

Условия детектирования Температура детектора 250°C.

Расход поддувочного газа (азот) 20 мл/мин.

Расход воздуха 300 мл/мин.

Расход водорода 30 мл/мин.

Парогазовая фаза 50 мкл газоплотным шприцем.

Деление потока 1/10.

Уровень опускания иглы шприца позиционируют на 23 мм от минимального нижнего значения.

2.6.2 Приготовление градуировочных растворов

См. раздел 2.2.2.

2.6.3 Пробоподготовка

См. разделы 2.2.3

2.6.4 Результаты исследований

Времена удерживания компонентов технических жидкостей даны в приложении 1. На рис. 13 представлена хроматограмма на колонке HP-B ALC смеси спиртов C1-C4 и ацетона, добавленных в кровь по 0,8 г/л. На хроматограммах крови и мочи пациентки Р., 12 лет, госпитализированной в тяжелом состоянии (рис. 14), хорошо видны пики ацетона («голодный» кетоацидоз). Кровь была взята сразу при поступлении в больницу, мочу

удалось получить только через 3 часа со времени госпитализации.

На рис. 15 представлена хроматограмма парогозовой фазы мочи мужчины 57 лет, госпитализированного в состоянии интоксикации после употребления изопренола. Идентифицированы этанол (антидотная терапия), изопренол, ацетон. Происхождение ацетона в данном случае практически невозможно дифференцировать - употребленный, или эндогенный (маркер стресса), или новообразованный (результат окисления изопренола), скорее всего суммировались все влияющие факторы.

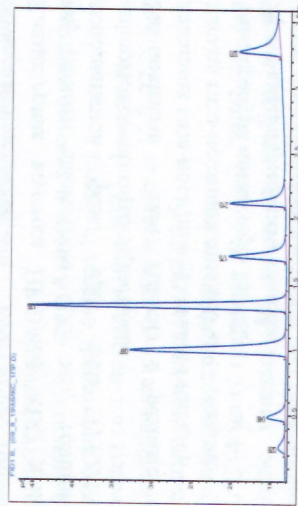


Рисунок 13. Хроматограмма градуировочной смеси летучих органических соединений, добавленных в кровь по 0,8 г/л. ГХ-ДИП Agilent 6890 с колонкой HP-V ALC 7.5 мм, 0,32 мм, 0,20 мкм. Времена удерживания (RT): отклик на ввод пробы - 0,26 мин, метанол - 0,49 мин, этанол - 0,99 мин, ацетон - 1,336 мин, изопренол - 1,72 мин, н-пропанол - 2,11 мин, н-бутанол - 3,27 мин.

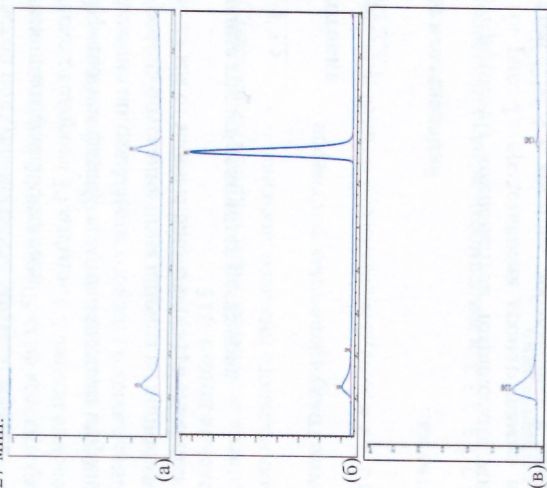


Рисунок 14. Пациентка Р., 12 лет, приступ мигрени с аурой, «голодный» кетоацидоз. Хроматограммы парогозовой фазы: (а) - крови, взятой в момент госпитализации; (б) - мочи через три часа, в этот период времени проводилась инфузионная терапия; (в) -

«бланковой» мочи здорового человека (ребенок 4 года). ГХ-ДИП Agilent 6890 с колонкой HP-V ALC 7.5 мм, 0,32 мм, 0,20 мкм. Времена удерживания (RT): отклик на ввод пробы - 0,26 мин, ацетон - 1,33 мин.

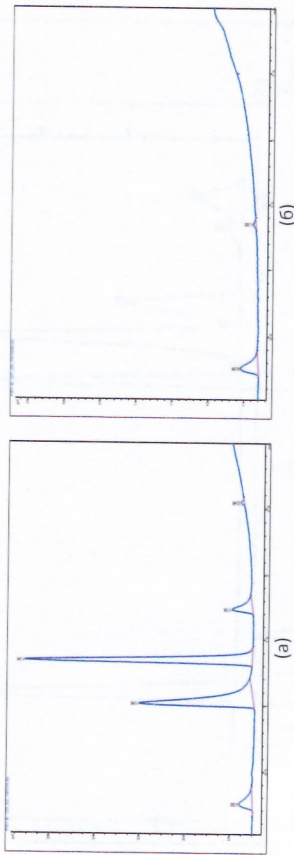
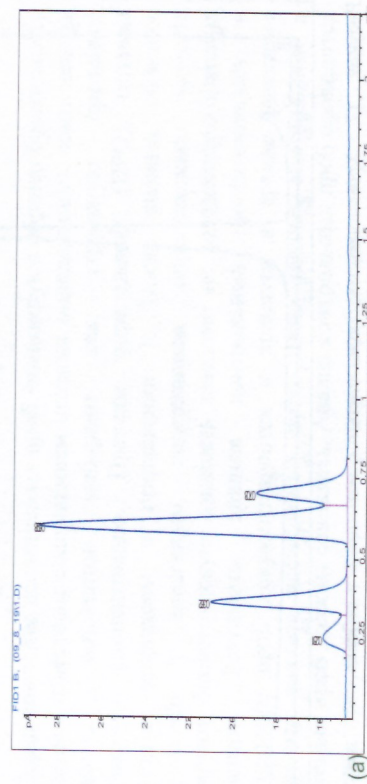


Рисунок 15. Хроматограммы: (а) парогозовой фазы крови пациента П., 57 лет, интоксикация изопренолом; (б) - крови, не содержащей целевых веществ. ГХ-ДИП Agilent 6890 с колонкой HP-V ALC 7.5 мм, 0,32 мм, 0,20 мкм. Времена удерживания (RT): отклик на ввод пробы - 0,26 мин, этанол - 1,01 мин, ацетон - 1,33 мин, изопренол - 2,11 мин.

На рис. 16 представлены хроматограммы и времена удерживания пропана, изобутана и бутана для колонки HP-V ALC. На рис. 17 и 18 представлены хроматограммы парогозовой фазы крови взятой у пациентов, в разное время госпитализированных в состоянии интоксикации в отделение реанимации и интенсивной терапии.



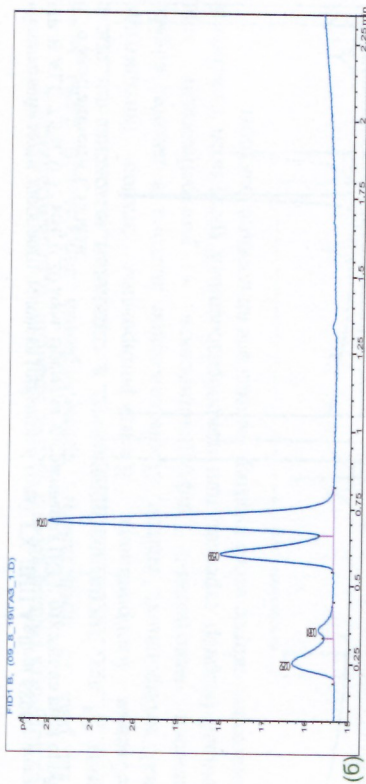


Рисунок 16. Хромотограммы смеси летучих органических соединений, добавленных в мочу способом барботирования: (а) - из баллончика с освежителем воздуха «GOLD WIND Citrus» (рис.20); (б) - из газовой зажигалки. ГХ-ДПИ Agilent 6890 с колонкой HP-B ALC 7.5 м, 0.32 мм, 0.20 мкм. Времена удерживания (RT): отклик на ввод пробы - 0,252 мин, пропан - 0,361 мин, изобутан - 0,599 мин, н-бутан - 0,704 мин.

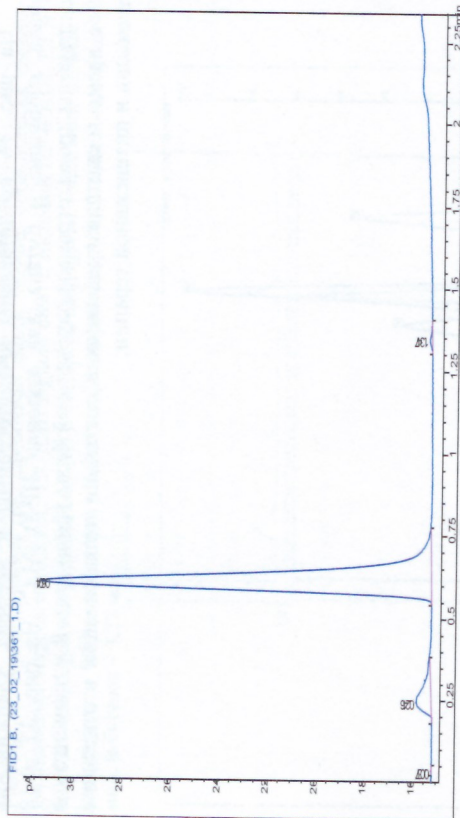


Рисунок 17. Хромотограмма парогазовой фазы крови ребенка 11 лет (муж), госпитализированного в отделение реанимации и интенсивной терапии в состоянии интоксикации. ГХ-ДПИ Agilent 6890 с колонкой HP-B ALC 7.5 м, 0.32 мм, 0.20 мкм. Времена удерживания (RT): 0,249 мин (фоновый пик), изобутан - 0,604 мин, ацетон - 1,347 мин.

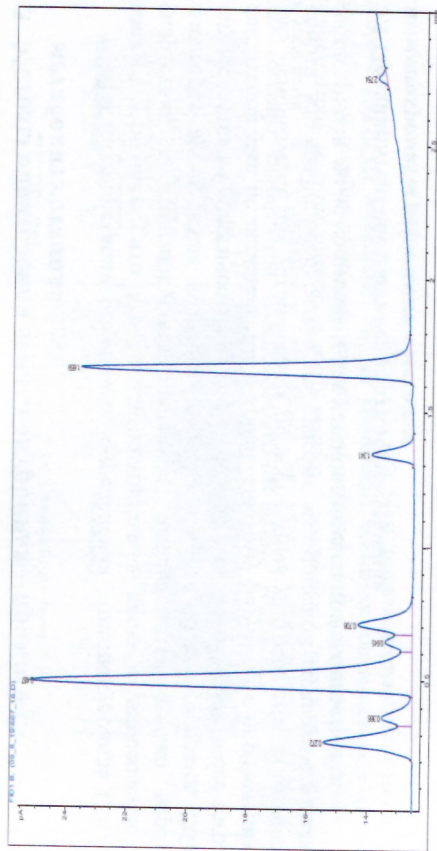


Рисунок 18. Хромотограмма парогазовой фазы крови мужчины 47 лет, госпитализированного в отделение реанимации и интенсивной терапии в состоянии комы. ГХ-ДПИ Agilent 6890 с колонкой HP-B ALC 7.5 м, 0.32 мм, 0.20 мкм. Времена удерживания (RT): 0,249 мин (фоновый пик), пропан - 0,361 мин, метанол (6,68 г/л) - 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).

2.7 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. Пределы определения (ПРО) целевых компонентов приведены в приложении 1. После анализа образцов биожидкостей с введенным содержанием определяемых веществ анализируют биологическую жидкость заведомо не содержащую целевых компонентов. 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.

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-ДПИ погрешность определения не должна превышать 10% и 5% на уровне определяемых концентраций 0,5-5 и 5-1000 мг/мл, соответственно.

Режим хроматографирования градиентный:

Время (мин)	Скорость потока (мл/мин)	Элюент А, %	Элюент В, %
0.00	0.3	90.0	10.0
1.20	0.3	90.0	10.0
2.20	0.3	1.0	99.0
3.20	0.3	1.0	99.0
4.20	0.3	90.0	10.0
5.20	0.3	90.0	10.0

Условия детектирования

Детектирование в режиме MRM с одновременной регистрацией полных спектров целевых веществ при отрицательной ионизации. Прекурсор-ион - m/z 221.

MRM переходы: m/z 221 – 113, 221 – 129, 221 – 85, 221 – 75. Для Shimadzu 8050:

энергия коллизии 22,

поток столбцовительного (CID) газа (аргон) - 270 Клг.

Параметры источника ионизации:

температура осушающего газа 250°C, поток 10,0 л/мин;

температура нагреваемого газа 300°C, поток 10,0 л/мин;

поток через небулайзер – 3,0 л/мин,

напряжение на капилляре – 3000 В.

Для Toxturner Vtuber параметры источника ионизации:

температура осушающего газа 159°C,

поток осушающего газа 8,0 л/мин,

давление на небулайзере – 2,0 бар,

напряжение на капилляре – 4500 В.

Ввод пробы

3.2.2 Пробоподготовка

3.2.2.1 Подготовка проб крови для определения этилглюкуронида

К 200 мкл образца крови добавляют 1,0 мл холодного метанола (метанол хранить в морозильной камере), встряхивают на вибромиксере 1 мин, центрифугируют при 14 000 об/мин в течение 10 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. Допускается вводить в хроматограф непосредственно метанольный экстракт после фильтрования.

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

3.2.2.2 Подготовка проб мочи для определения этилглюкуронида

К 200 мкл мочи добавляют 1,0 мл метанола, встряхивают на вибромиксере 1 мин, центрифугируют при 14 000 об/мин в течение 10 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.

Для исследования мочи также применяют метод прямого ввода 5 мкл образца после центрифугирования при 14 000 об/мин в течение 10 мин.

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

3.2.2.3 Подготовка проб волос и ногтевых пластин

100 мг образца волос или ногтевых пластин отмывают с применением мощных средств (мыло, шампунь), высушивают и измельчают ножницами. Добавляют 300 мкл деионизованной воды и экстрагируют 1 час в ультразвуковой бане. Экстракт пропускают через фильтр с порами диаметром 0,44 мкм или центрифугируют при 14 000 об/мин в течение 10 мин, 5 мкл экстракта вводят в хроматограф.

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

3.2.2.4 Подготовка проб для определения этилглюкуронида в сухих пятнах крови

Подготовка проб биологического материала высушиванием на стекле.

200 мкл образца крови вносят во флакон с плоским дном (пенициллиновый флакон) и высушивают при 100°C в течение 7 минут. При этом происходит денатурация белков и удаление влаги из образца. После охлаждения до комнатной температуры добавляют 250 мкл метанола, закрывают крышечкой и встряхивают на вибромиксере 2 мин. Экстракт получается прозрачным и почти бесцветным (рис. 22), его переносят в вials, упаривают и реконструируют 100 мкл деионизованной воды. После фильтрования или центрифугирования 5 мкл экстракта вводят в хроматограф.



Рисунок 22. (а) – Аликвоты 200 мкл крови, высушенные при 100°C в течение 7 минут в стеклянных флаконах. (б) – Метанольный экстракт после встряхивания на вибромиксере.

Подготовка проб биологического материала, обработанного в виде сухих пятен на бумаге. Сухие пятна диаметром 1,5 см, ориентировочно соответствующие 200-300 мкл крови (рис. 23), вырезают и при необходимости измельчают, помещают в вial или пробирку, добавляют 1,0 мл метанола и встряхивают на вибромиксере 2 мин. Бумагу удаляют

пинцетом, экстракт упаривают досуха в токе воздуха при 40°C. К сухому остатку добавляют 100 мкл деионизированной воды, пропускают через фильтр 0,44 мкм или центрифугируют 10 минут при 14 000 об/мин. 5 мкл экстракта вводят в хроматограф.



Рисунок 23. (а) – Аликвоты 200 мкл крови, нанесенные на фильтровальную бумагу. (б) – Сухие пятна крови на бумажном носителе, подготовленные к экстрагированию.

Подготовка проб биологического материала, предоставленного на исследование в виде сухих пятен на различных носителях. В серии экспериментов, проведенных авторами на значительной выборке материала и на различных носителях: ткань (вискоза, полиэстер, хлопок, шерсть), кожа/кожаменитель, натуральная кожа, бумага, резина, стекло – показана возможность определения этилглюкуронида в сухих пятнах крови на объектах вещественных доказательств (рис. 24). Для исследования использовали четыре образца трупной крови с гнилостными изменениями, содержащие этанол в концентрациях: 3,3, 3,1, 3,1 и 1,5 г/л. Сухие пятна крови, нанесенные на шерстяной трикотаж, резиновый автомобильный коврик, обувь из кожаменителя, натуральную кожу, линолеум, выдерживали два дня, пять дней и неделю в помещении при комнатной температуре и естественной влажности, после чего анализировали. При повторных анализах не наблюдали значимых потерь этилглюкуронида.

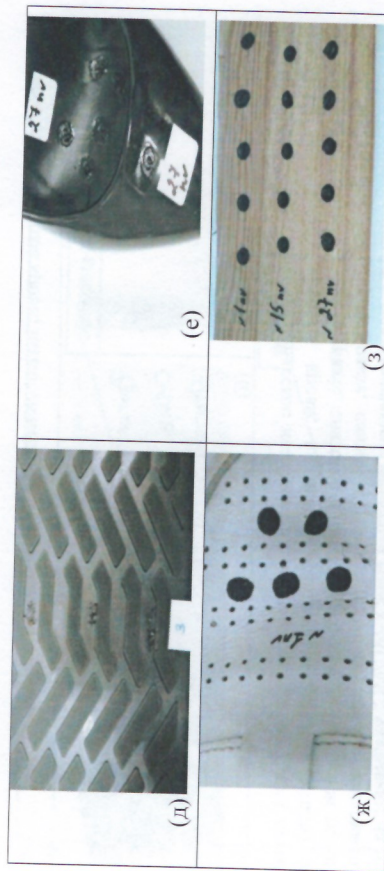
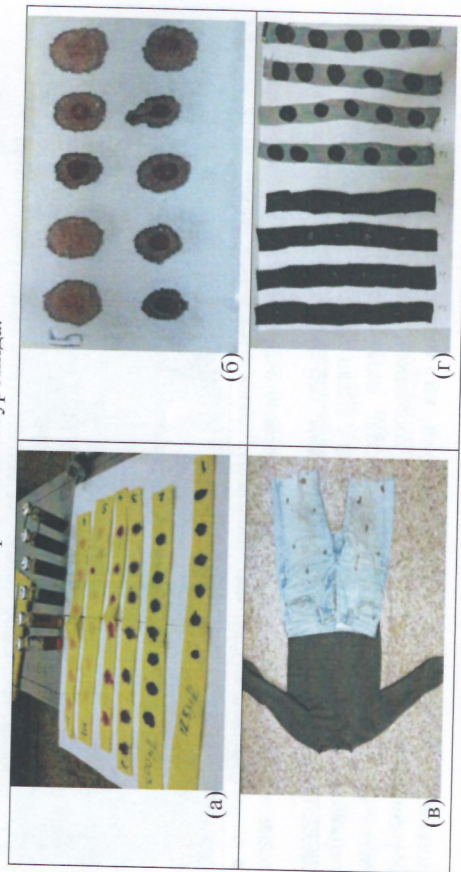


Рисунок 24. Сухие пятна крови на различных носителях: (а) - вискоза; (б) - хлопок; (в) - шерстяной трикотаж (слева) и джинсовая ткань (справа); (д) - резиновый автомобильный коврик; (е) – обувь из кожаменителя; (ж) - кожа; (з) - линолеум.

Сухое пятно крови диаметром 1,5 см, ориентировочно соответствующее 200-300 мкл, вырезают и при необходимости измельчают (бумага, ткань, кожаменитель, кожа) или соскабливают с твердой поверхности (стекло, резина, пластмасса). Помещают в виалу или пробирку (рис. 25, 26), добавляют 1,0 мл метанола, встряхивают на вибромиксере 2 минуты. Переносят органический слой в сухую чистую виалу, упаривают досуха в токе воздуха при 40°C. К сухому остатку добавляют 100 мкл деионизированной воды, центрифугируют 10 минут при 14 000 об/мин, 5 мкл супернатанта вводят в хроматограф.

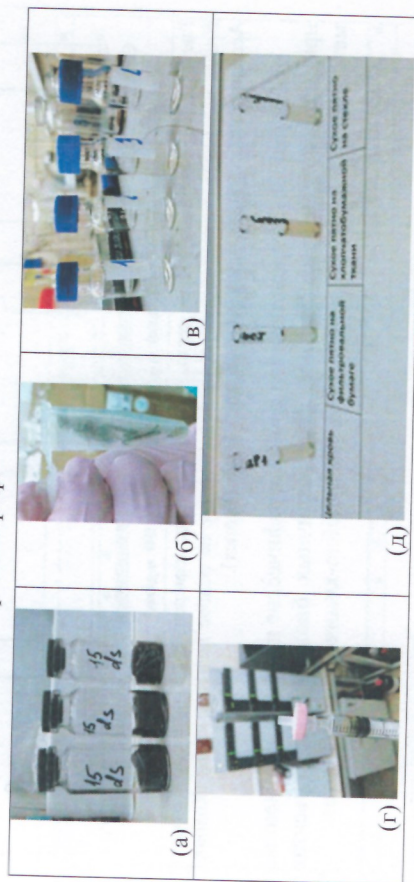


Рисунок 25. (а) – Аликвоты 200 мкл крови от живого лица (этанол 3,7 г/л, EtG 1300 нг/мл), нанесенные и высушенные на вискозной ткани, подготовленные к экстрагированию 1,0 мл метанола. (б) – Аликвоты 200 мкл трупной крови (этанол 3,9 г/л), нанесенная и высушенная на джинсовой ткани, подготовленная к экстрагированию 1,0 мл метанола. (в) – Метанольные экстракты из сухих пятен крови, подготовленные к упариванию. (г) – Очистка экстракта пропусканием через фильтр с порами диаметром 0,44 мкм. (д) –

Экстракты из сухих пятен крови, подготовленные к хроматографированию.

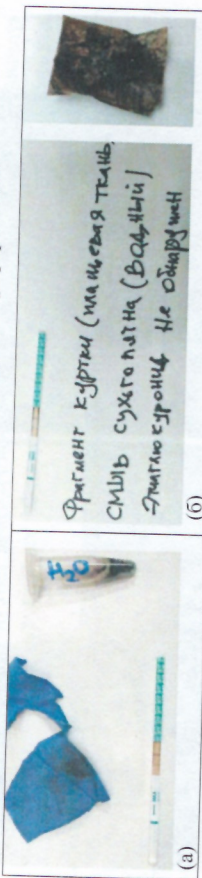


Рисунок 26. Иммунохроматографическое исследование водных экстрактов сухих пятен гнилостно измененной трупной крови, в которой ранее был выявлен этанол в концентрации 0,5 г/л: (а) – в экстракте, снятом с хлопчатобумажной трикотажной ткани, EtG не обнаружен; (б) – в экстракте, снятом с плащевой ткани, EtG не обнаружен. Результаты определения EtG, подтвержденные методами ВЭЖХ-МС/МС, указывают на то, что этанол не был употреблен прижизненно.

3.2.3 Результаты исследований

Результаты исследований мидких проб. На рис. 27 представлены хроматограммы серии градуировочных измерений на приборе Toxturner Bruker растворов этилглюкуронида, приготовленных на основе цельной крови.

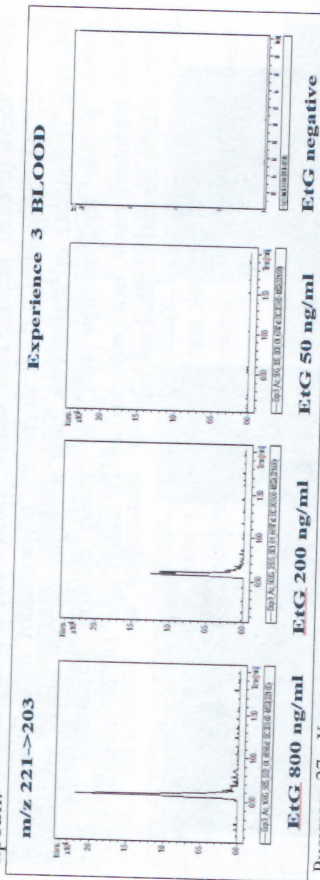


Рисунок 27. Хроматограммы серии градуировочных измерений на приборе Toxturner Bruker растворов этилглюкуронида, приготовленных на основе цельной крови. Колонка Acclaim RSLC 120 C18, 120A 2.1×100 mm, 2.2 μm (Dionex).

На рис. 28-33 представлены хроматографические профили, полученные при определении этилглюкуронида в различных биологических объектах методом ВЭЖХ-МС/МС при проведении судебно-химических экспертиз.

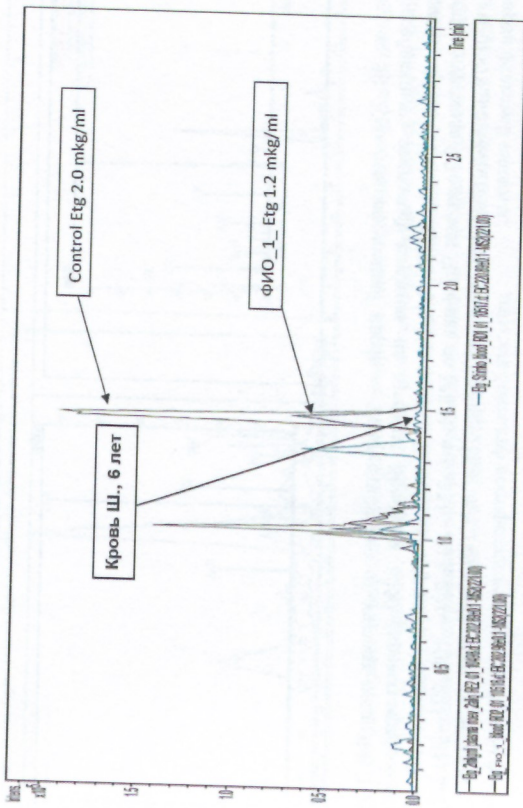


Рисунок 28. Хроматографические профили (Toxturner Bruker, колонка Acclaim RSLC 120 C18, 120A 2.1×100 mm, 2.2 μm) по нону-прекурсору этилглюкуронида m/z 221 (M-H) - экстракта образца крови от трупа Ш., муж. 6 лет, калибровочного образца EtG 2,0 мкг/мл и крови, положительной по этилглюкурониду (кровь от трупа ФИО 1). Содержание этанола в крови от трупа Ш., 6 лет составило 1,34‰. Обзорный анализ, проведенный на приборе Toxturner Bruker, показал отсутствие этилглюкуронида в крови Ш., 6 лет.

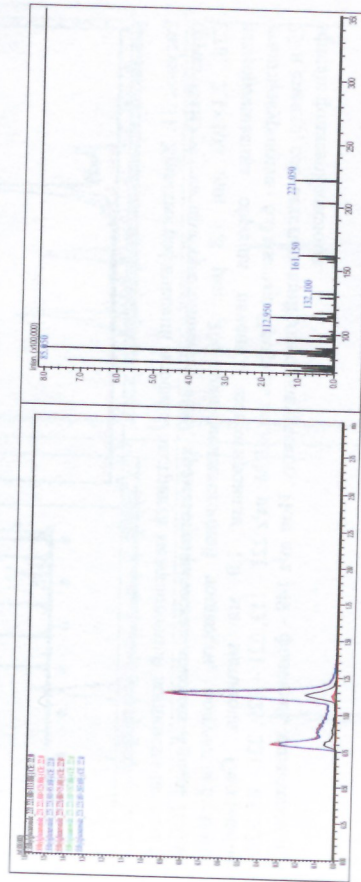


Рисунок 29. Хроматографический профиль мочи от трупа ФИО 1 на приборе Shimadzu 8050, разбавление в 50 раз. Профиль по MRM: m/z 221 – 113, 221 – 129, 221 – 85, 221 – 75 и спектр, соответствующий этилглюкурониду. Этилглюкуронид - «high» (высокое содержание, вне калибровочного диапазона). Хроматографическая колонка Agilent Eclipse C18, 2.1×100 mm 1.8 μm (Agilent).

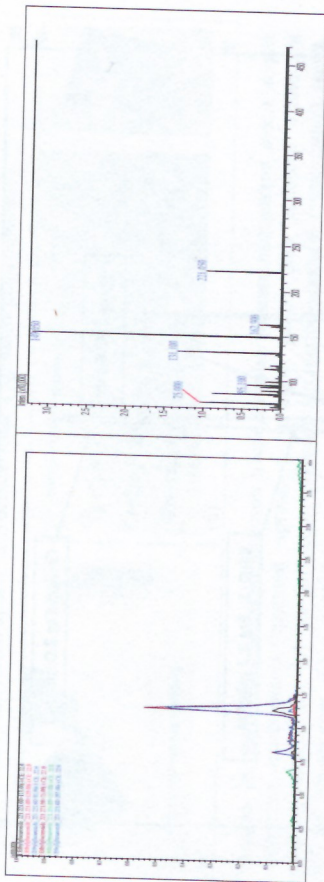


Рисунок 30. Хроматографический профиль экстракта крови от животного лица ФИО 2, употребившего этиловый алкоголь на приборе Shimadzu 8050 (хроматографическая колонка Agilent Eclipse C18, 2.1×100 мм 1.8 μm). Содержание этанола 0,3 г/л, этилглюкуронида 0,7 мкг/мл. Профиль по MRM: m/z 221 – 113, 221 – 129, 221 – 85, 221 – 75 и спектр, соответствующий этилглюкурониду. Ион m/z 149 - фоновый, характерен для эфиров фталевой кислоты.

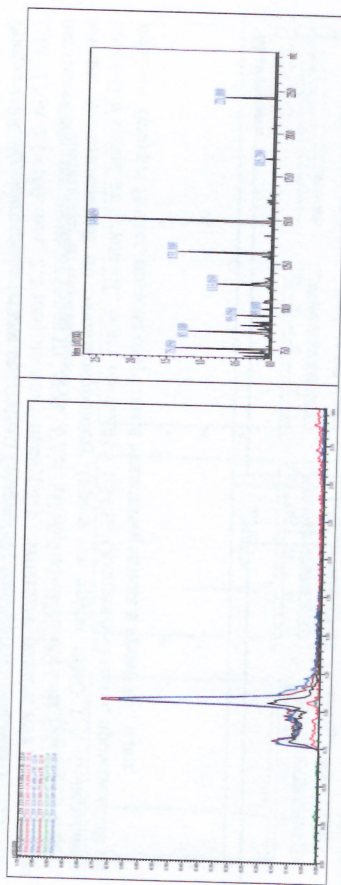


Рисунок 31. Хроматографический профиль экстракта межклеточной жидкости печени от трупа ФИО 4 на приборе Shimadzu 8050, хроматографическая колонка Agilent Eclipse C18, 2.1×100 мм 1.8 μm. 200 мкл межклеточной жидкости, полученной после размораживания образца печени, экстрагировали 1,0 мл метанола. Содержание 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.

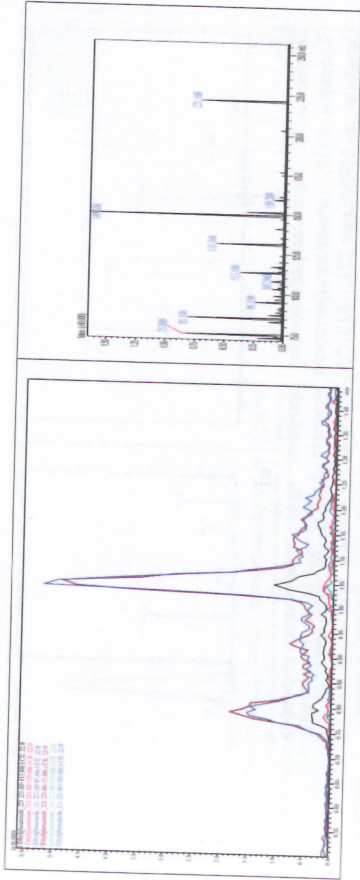
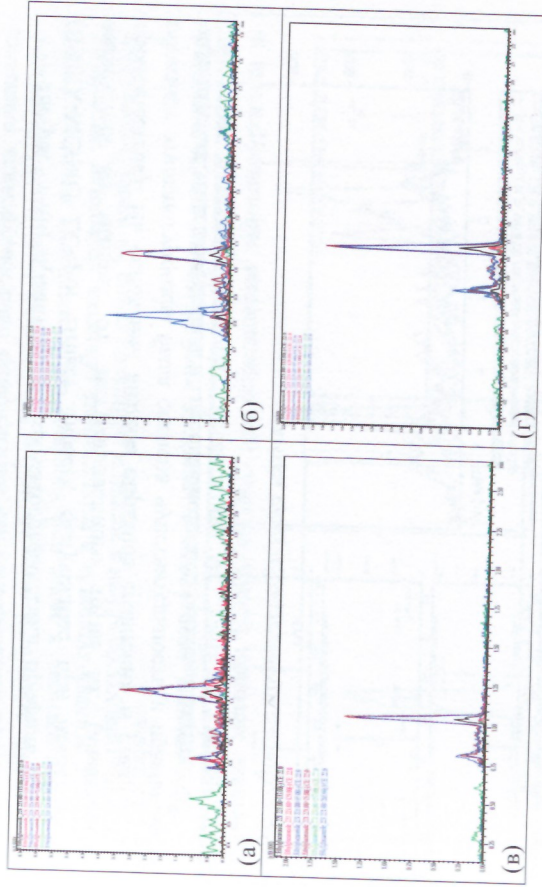


Рисунок 32. Хроматографический профиль экстракта межклеточной жидкости почки от трупа ФИО 4 на приборе Shimadzu 8050, хроматографическая колонка Agilent Eclipse C18, 2.1×100 мм 1.8 μm. 200 мкл межклеточной жидкости образца почки, экстрагировали 1,0 мл метанола. Содержание этилглюкуронида - 3,5 мкг/мл. 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. 33 представлены хроматограммы серии измерений на приборе Shimadzu 8050 градуировочных растворов, приготовленных на основе плазмы с введенным известным количеством этилглюкуронида.



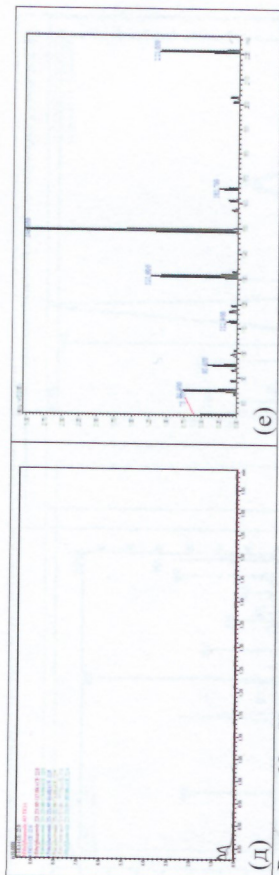


Рисунок 33. Хроматографические профили градуировочных образцов на приборе Shimadzu 8050, хроматографическая колонка Agilent Eclipse C18, 2.1×100 mm 1.8 μm. Профили по MRM: m/z 221 – 113, 221 – 129, 221 – 85, 221 – 75.

(а) – Градуировочный раствор, приготовленный на основе плазмы, с введенным известным количеством этилглюкуронида - 0.2 мкг/мл, нижний предел количественного определения.

(б) - Градуировочный раствор, приготовленный на основе плазмы, с введенным известным количеством этилглюкуронида - 0.4 мкг/мл.

(в) - Градуировочный раствор, приготовленный на основе плазмы, с введенным известным количеством этилглюкуронида - 0.8 мкг/мл.

(г) - Градуировочный раствор, приготовленный на основе плазмы, с введенным известным количеством этилглюкуронида - 1.5 мкг/мл.

(д) - Фон прибора по этилглюкурониду. Этилглюкуронид отсутствует.

(е) – Масс-спектр, соответствующий этилглюкурониду. Ион m/z 149 - фоновый, характерен для эфиров фталевой кислоты.

На рис. 34(а) представлены хроматографический профиль и спектр (ВЭЖХ-МС/МС LC-qtof Bruker Impact), полученные при исследовании извлечения из мышцы от экстумированного трупа М. (авиационное происшествие). На основании анализа образцов трупа М. (авиационное происшествие). На основании анализа образцов трупа М. (авиационное происшествие) этилглюкуронида была оценена чувствительность и правильность определения этилглюкуронида не превышающая 25 ppb (рис. 34(б)).

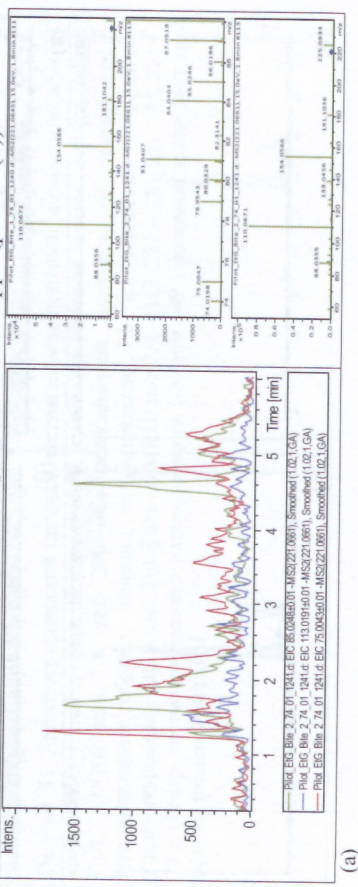


Рисунок 34. (а) - Хроматограмма (ВЭЖХ-МС/МС LC-qtof Bruker Impact, колонка Intensity T18 3.0 μm, 2.1 x 150 mm) извлечения из мышцы от экстумированного трупа М. (авиационное происшествие), и фоновый масс-спектр на месте выхода этилглюкуронида (EIG RT 1.8 min). 200 мл межклеточной жидкости, полученной после размораживания образца мышцы, экстрагировали 1.0 мл метанола. Этилглюкуронид не обнаружен.

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

Результаты ГХ-МС исследования состава летучих веществ показали, что в желчи и мышце от трупа М. содержится 1,2% и 1,4% этанола, соответственно. В моче содержание этанола составило <0,1. Результаты ВЭЖХ-МС/МС исследования по определению этилглюкуронида показали, что в желчи, мышце и моче от трупа М. этилглюкуронид не обнаружен. Отсутствие этанола в моче при наличии его в мышце и желчи, а также отсутствие этилглюкуронида в исследуемых объектах позволили заключить, что этанол, присутствующий в желчи и мышце от трупа М. имеет посмертное происхождение.

Результаты исследований жидких проб с применением техники сухих пятен.

На рис. 35 представлен хроматографический профиль, полученный методом ВЭЖХ-МС/МС при определении этилглюкуронида в жидком образце крови через «сухие пятна».

Рисунок 35. Метанольный экстракт сухого пятна крови, нанесенного на хлопчатобумажную ткань. Пациент 52 года, госпитализирован с диагнозом: алкогольный абстинентный синдром. Концентрация этилглюкуронида в крови 2,4 мкг/мл, этанол не

обнаружен. Хроматографический профиль по m/z 221 и масс-спектр этилглюкуронида, время удерживания 1,2 мин (Toxturner Bruker).

Результаты исследований сухих пятен крови на объектах исследований. На рис. 36-37 представлены хроматографические профили, полученные методом ВЭЖХ-МС/МС при определении этилглюкуронида в сухих пятнах крови на предметах одежды.

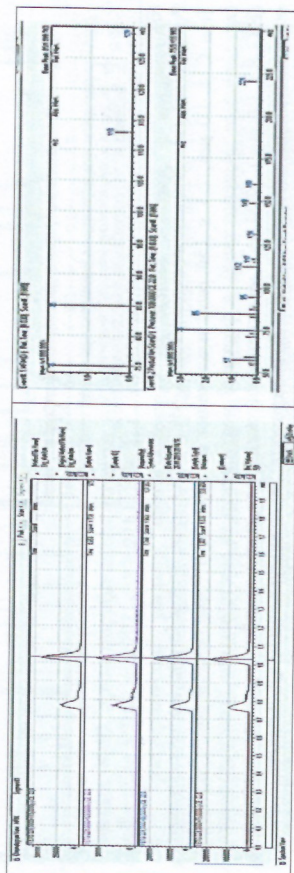


Рисунок 36. Хроматографические профили по MRM: m/z 221 – 113, 221 – 129, 221 – 85, 221 – 75 метанольного экстракта сухого пятна из 200 мкл гнилостно измененной трупной крови, этанол 3,1 г/л, положительная по этилглюкурониду, с джинсовой ткани, после 2 дней хранения в помещении при комнатной температуре и естественной влажности. Масс-спектр, соответствующий масс-спектру этилглюкуронида. ВЭЖХ-МС/МС система Shimadzu 8050, хроматографическая колонка Agilent Eclipse C18, 2.1×100 mm 1.8 μ m.

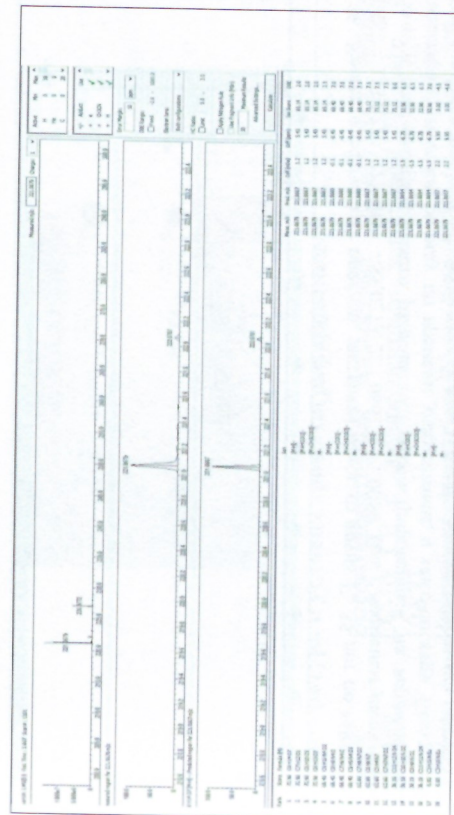
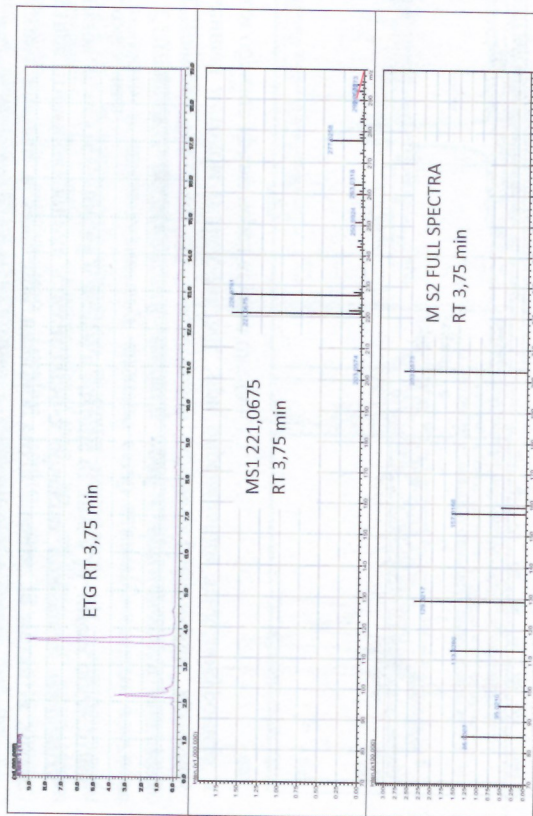
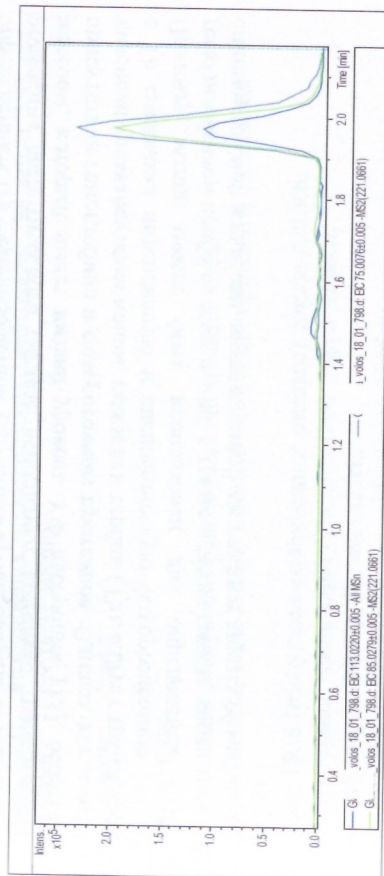


Рисунок 37. Хроматограмма метанольного экстракта сухого пятна из 200 мкл гнилостно измененной трупной крови (этанол 3,1 г/л, положительная по этилглюкурониду) с джинсовой ткани, после трех месяцев хранения в герметично закрытом пластиковом пакете при комнатной температуре и естественной влажности. Сравнение экспериментально полученных и расчетных результатов по MS1 221,0675 а.е.м. пика со временем удерживания 3,75 мин, соответствующим этилглюкурониду. Согласно результатам, полученным по программе Formula Predictlog, брутто-формула идентифицируемого вещества C8H14O7 соответствует этилглюкурониду. ВЭЖХ-МС/МС система, состоящая из жидкостного хроматографа LC-20AD (Shimadzu, Япония) и масс-спектрометра LCMS-IT-TOF (Shimadzu, Япония), хроматографическая колонка Shim-pack SB C18 Aqua (150×3.0 мм, 3 μ m, Shimadzu, Япония). Подвижные фазы: смесь 0,1% муравьиной кислоты в воде (А) и ацетонитрил (Б), скорость потока 0,35 мл/мин в градиентном режиме, температура колонки 35°C. Объем ввода пробы 10 мкл. Время удерживания этилглюкуронида в выбранных условиях хроматографирования составило 3,75 мин.

Результаты исследования волос. На рис. 38 представлен хроматографический профиль, полученный методом ВЭЖХ-МС/МС при определении этилглюкуронида в волосах от трупа в состоянии сильного гнилостного изменения.



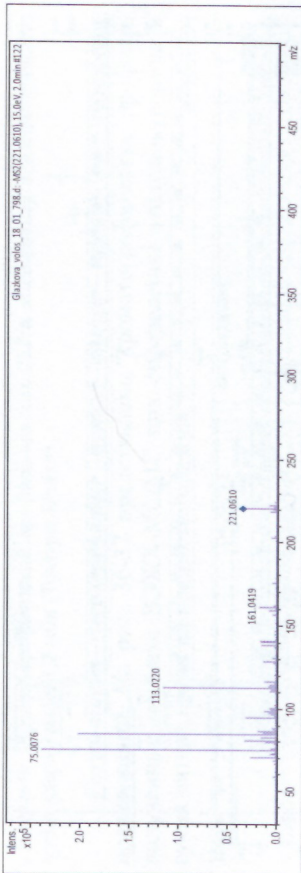


Рис. 38. Хроматографический профиль экстракта волос от трупа Г., 35 лет по MRM: m/z 221.0661 – 113.0220, 221.0661 – 85.0273, 221.0661 – 75.0069. Пик с временем удерживания 1.9 мин и масс-спектр высокого разрешения, зарегистрированный на вершине пика, соответствуют этиллакурониду по времени удерживания и масс-спектру. Содержание этиллакуронида в волосах Г., 35 лет составило 128 нг/г. Анализ выполняли на приборе, включающим масс-спектрометрический детектор высокого разрешения Maxis Impact II фирмы Bruker и жидкостный хроматограф Dionex Ultimate 3000 и колонкой Acclaim® RSLC 120 C18 2.2 μm, 120Å 2.1×100 mm (Dionex). Градиентный режим элюирования: деионизованная вода (HPLC grade), 0.1% муравьиной кислоты, 2 mM формата аммония, 1% ацетонитрил (элюент А), ацетонитрил (HPLC grade), 0.1% муравьиной кислоты, 2 mM формата аммония, 1% деионизованной воды (элюент В). Поток через колонку - 0.25 мл/мин, температура термостата колонок - 35°C. Объем вводимой пробы - 2 мкл.

4 ВЭЖХ метод определения карбогидрат-дефицитного трансферрина

Для определения СДТ в нетемозированной сыворотке крови используют методы капиллярного электрофореза или высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ) при длинах волн 200 и 460 нм, соответственно. Невозможность определения СДТ гемолизованной (трупной) крови связана с тем, что для получения аналитического сигнала используют комплекс трансферрина с железом, который имеет низкий уровень УФ адсорбции [13], особенно в присутствии гемоглобина и сывороточных протеинов. Однако, когда железо замещено трехвалентным ионом, таким как тербий (Tb), аддукт трансферрина с Tb показывал интенсивную и специфическую флуоресценцию [14, 15]. Поэтому метод может быть использован для определения СДТ в гемолизованной пробе от живых лиц, а также в сухих пятнах крови (рис. 39), спинномозговой жидкости, внутриглазной жидкости и других объектах.



Рисунок 39. Сухие пятна крови для исследования на СДТ.

4.1 Аппаратура и условия хроматографирования

ВЭЖХ Высокоэффективный жидкостный хроматограф Shimadzu
система LC-10 CE с флуоресцентным детектором Shimadzu RF-10AXL.

Колонка Инообменная колонка Waters Protein-Pak (5мкм, 4,6x100мм).

Условия хроматогра-
фирования Элюент А: деионизованная вода (HPLC grade) с 20mmol/l Tris буфера (рН 8).

Элюент В: деионизованная вода (HPLC grade) с 20 mmol/l Tris буфера (рН 8), NaCl 0,5 моль/л.

Температура термостата колонок 50°C.

Режим хроматографирования градиентный:

Время (мин)	Скорость потока (мл/мин)	Элюент А, %	Элюент В, %
0.00	0.3	100.0	0
25.0	0.3	70	30

После анализа колонку регенерируют водным раствором NaCl 1,0 моль/л (0,3 мл/мин 10 мин) и уравновешивают с деионизованной водой (0,3 мл/мин 10 мин).

Условия детек-
тирования Условия флуоресцентного детектирования: длины волн возбуждения и поглощения составляли 298 нм и 550 нм, соответственно.

Ввод пробы 5 мкл

4.2 Реагенты

Использовали следующие реагенты квалификации ч.д.а.:

- деионизованная вода Milli-Q с остаточным сопротивлением 18 Мом/см при 25°C;

- буфер TRIS (trihydroxy-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).

4.3 Пробоподготовка

Кровь гемолизованная (трупная). К 50 мкл гемолизованной или трупной крови добавляют 5 мкл водного раствора TbCl₃ концентрацией 0.5 ммоль/л и 5 мкл водного раствора препарата Desferal концентрацией 50 ммоль/л, 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 вырезают (при необходимости измельчают) и помещают во флаконы для фильтрации/центрифугирования. Диаметр пор фильтра 0.22 µm. К образцам добавляют 60 мкл водного раствора гликолевой кислоты концентрацией 200 ммоль/л. 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 TbCl₃, центрифугируют при 10 мин при 10000g, 5 мкл надосадочной жидкости вводят в хроматограф.

4.4 Результаты исследований

Карбогидрат-дефицитный трансферрин определяют как процентное соотношение суммы фракций 0-сиало и 2-сиало к общему содержанию трансферрина. Рекомендовано пороговое значение CDT, определяемого методом ВЭЖХ-ФЛ - 1,9%.

На рис.40 представлены хроматографические профили изоформ трансферрина, полученные при анализе сыворотки крови, взятой у живых лиц, на рис.41 – при анализе трупной крови.

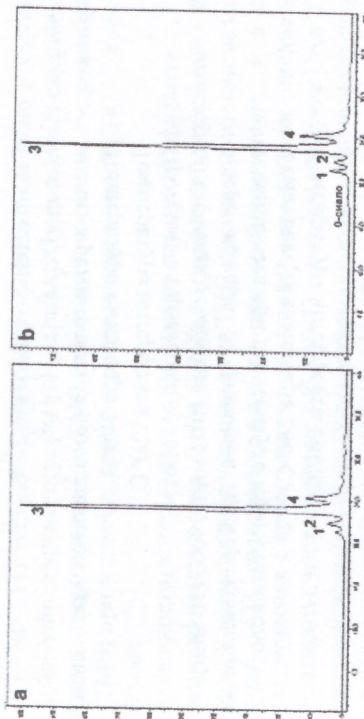


Рисунок 40. ВЭЖХ-ФЛ профили сыворотки крови от лица, не злоупотребляющего алкоголем - CDT 1% (а) и от лица, злоупотребляющего алкоголем - CDT 2,8% (б). Изоформы трансферрина: 1) 2-сиало, 2) 3-сиало, 3) 4-сиало, 4) 5-сиало. На хроматограмме (б) виден небольшой отклик слева от пика 2-сиало, соответствующий 0-сиало изоформе.

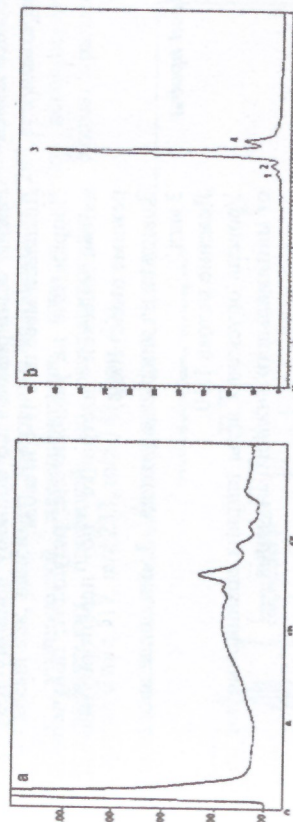


Рисунок 41. ВЭЖХ-УФ (а) и ВЭЖХ-ФЛ (б) профили трупной крови. Изоформы трансферрина: 1) 2-сиало, 2) 3-сиало, 3) 4-сиало, 4) 5-сиало.

5 ГХ-МС метод определения гамма-гидроксибутирата (ГНВ)

5.1 Аппаратура и условия хроматографирования

ГХ-МС оборудование

Хроматограф газовый с моноквадрольным масс-селективным детектором и автосамплером (Agilent Technologies 7820/5975N или аналогичный по характеристикам).

Хроматографическая колонка

Капиллярная колонка HP-5MS (19091S-433) длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм, толщиной пленки неподвижной фазы 0,25 мкм ((5%-фенил)-метилполисилоксан) или аналогичная по характеристикам.

Условия хроматографирования

Газ-носитель - гелий марки «А».
Метод «DOAS» [16, 17, 18]: анализ в режиме постоянного давления газа - носителя.
Температура инжектора 270°C.
Температура интерфейса 280°C.
Программа термостага колонок: 60°C (4 мин), градиент 10°C/мин, 190°C (30 мин).
После каждых 50 анализов прибор кондиционируют в течение часа при температуре термостага колонок 210°C.
Температура инжектора 280°C.
Температура интерфейса 280°C.
Программа термостагирования колонок: 50°C (0,5 мин), градиент 99°C/мин, 100°C (1 мин), градиент 15°C/мин, 280°C (30 мин).
Время удерживания (RT) дифениламина 9,29 мин.
Температура источника ионов 230°C.
Температура анализатора 150°C.
Режим сканирования по полному ионному току (SCAN).
Диапазон масс m/z 41-650 а.е.м.
Напряжение на умножителе: результат, полученный при автоматической настройке по перфторбутиламину в режиме atune+100В.
Задержка на пик растворителя - 3 мин после ввода пробы. 2 мкл.
Деление потока 1/10.
Уровень опускания иглы шприца позиционируют на 0 мм от минимального нижнего значения.

5.2 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 вибротексе типа Вортекс. Центрифугируют 10 минут при 4000 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 GHB.

5.3. Результаты исследований

Идентификацию целевых соединений выполняют с помощью программ AMDIS и MSD ChemStation с использованием библиотек масс-спектров

MWR2011, NIST11, Wiley 9. Калибровку проводят согласно инструкции к прибору, на основе хроматограмм экстрактов градуировочных смесей.

Время удерживания ди-ТМС производного гамма-гидроксибутирата (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. 42), создаваемой 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), поэтому уточняющую идентификацию проводят по характеристическим ионам m/z 117, 233, 143 (рис. 43, 44).

- 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. Как и у ди-ТМС производного гамма-гидроксибутирата, 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. При уточняющей идентификации хорошо видно несоответствие хроматографических профилей по экстрагированным хроматограммам фрагментов с m/z 117, m/z 233, m/z 143 (рис. 45).

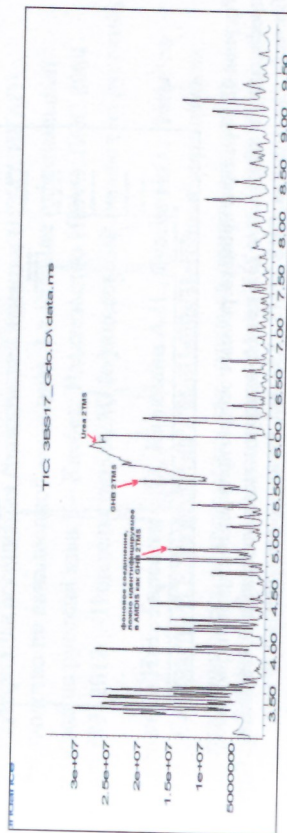


Рисунок 42. Хроматограмма по полному ионному току (SCAN) экстракта мочи, содержащей 16650 нг/мл GHB (RT 5,59 мин). Фоновое соединение (RT 4,89 мин) было идентифицировано программой AMDIS как GHB 2TMS.

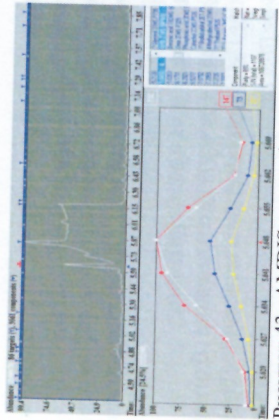


Рисунок 43. AMDIS идентификация хроматограммы экстракта мочи, содержащей 18 700 нг/мл ГНВ. Времена удерживания (RT) ГНВ 2 TMS - 5.64 мин, Улеа 2 TMS - 6.17 мин. Экстрагированные хроматографические профили по m/z 117, m/z 233, m/z 143 совпадают.

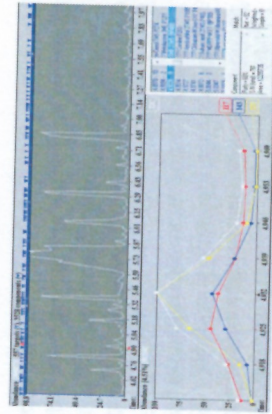


Рисунок 44. AMDIS идентификация хроматограммы экстракта мочи, не содержащей ГНВ. Время удерживания фонового вещества, ошибочно идентифицируемого в AMDIS как ГНВ 2 TMS - 4.93 мин. Экстрагированные хроматографические профили по m/z 117, m/z 233, m/z 143 не совпадают.

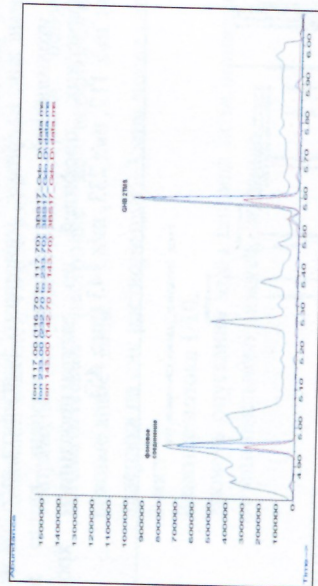


Рисунок 45. Фрагмент хроматограммы с экстрагированными хроматографическими профилями по m/z 117, m/z 233, m/z 143 экстракта мочи, содержащей 16650 нг/мл ГНВ. Времена удерживания: ГНВ 2TMS - 5.59 мин, фонового соединения 4.89 мин.

Список литературы

- [1] ГОСТ Р 52623.4-2015 Технологии выполнения простых медицинских услуг инвазивных вмешательств. Утвержден и введен в действие приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии Российской Федерации от 31 марта 2015 г. N 200-ст.
- [2] 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».
- [3] 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.
- [4] Герасимов И.Г., Гальбурт Т.М. Морфология нейтрофилов крови человека в процессе их фагоцитоза in vitro. // Вісник Донецького національного університету. - Сер. А: Природничі науки. - 2009, вып. 1. - С.377-382.
- [5] Международная ассоциация гражданской авиации (ИКАО, ИКАО). Руководство по авиационной медицине. 3-е издание (официальный перевод на русский язык). – Киев: Издательство ИКАО, ДОС 8984-AN/895, 2012. – Издательство ИКАО (официальный перевод на русский).
- [6] Ерошенко Н.Н., Барсегян С.С., Кирюшин А.Н., Туаева Н.О., Носырев А.Е., Саломатин В.Е. Разработка и валидация методики определения этилглюкуронида и этилсульфата как маркеров прижизненного употребления. // Судебно-медицинская экспертиза. - №4,2018. С.42-47.
- [7] 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».
- [8] Циркулярное письмо Министерства здравоохранения СССР от 25 февраля 1970 г. «Об улучшении диагностики острых смертельных отравлений этиловым спиртом».
- [9] Приказ Минздрава России № 933н от 18.12.2015г. «О порядке проведения медицинского освидетельствования на состояние опьянения (алкогольного, наркотического или иного токсического)».

- [10] Приказ Министерства здравоохранения РФ от 10 мая 2017 г. № 203н «Об утверждении критериев оценки качества медицинской помощи».
- [11] Медицинская токсикология: национальное руководство / под ред. Е.А.Лужникова. - М.: ГОЭТАР-Медиа, 2014. - 923 с.
- [12] Долгов К.С., Киричек А.В. Исследование новообразования алифатических спиртов группы C1-C5 в биологическом материале и изучение динамики их концентраций в постмортальном периоде. // Бутлеровские сообщения. 2016. №6. Том 46. - С.11-18.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Музиле Дж., Де Пало Э.Ф., Бортолотти Ф., Тальяро Ф., Савчук С.А., Шестакова К.М. Полуколичественная тест-система на основе FRET: быстрый и дешевый метод диагностики хронического алкоголизма. // Лаборатория и производство. - №5, 2019 (9). - С.94-99.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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.
- Наркологии Минздрава России. - М.: 2014.
- [19] 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.
- [20] Энциклопедия клинических лабораторных тестов. / Под ред. Тита Н. - М.: ЮНИМЕД-Пресс, 2003 г.
- [21] Ковалев А.В. Этанол в биологических средах: маркером каких состояний он является. Минорные маркеры метаболизма этанола: являются ли они абсолютными критериями алкогольного опьянения? // IV Ежегодная НПК «Создание единой системы межведомственного взаимодействия экспертов лабораторий правоохранительных органов, ХТЛ и лабораторий бюро СМЭ в сфере выявления новых наркотических средств», г.Москва, май 2018.

Приложение 1. Компоненты технических жидкостей, определяемые на хроматографических колонках HP-FFAP 50м;0.32мм;0.50мкм и HP-B Alc 7,5м;0.32мм;20мкм

Определяемое вещество	Время удерживания, мин HP-FFAP	Время удерживания, мин HP-B 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 Дистилловый эфир	2.87	3.031	2.0	0.3
3 Диметилсульфид	3.39	4.0	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	0.3
8 Метанол	4.34	0.459	4.0	0.3
9 Метилэтилкетон	4.45	3.0	3.0	0.3
10 Изопропанол	4.62	1.711	4.0	0.3
11 Диметиловый эфир этиленгликоля	4.69	3.0	3.0	0.2
12 Этанол	4.73	0.961	3.5	0.2
13 Метилхлорид	4.73	1.315	1.5	0.2
14 Бензол	5.01	3.087	1	0.2
15 Дибутиловый эфир	5.08	1	1	0.3
16 Метилэтилкетон	5.92	2.497	3	0.3
17 Ацетонитрил	6.03	2.137	3	0.3
18 Хлороформ	6.12	5.517	1.5	0.2
19 Пропанол (BC1)	6.32	2	3.2	0.3
20 Толуол	6.58	2	1	0.2
21 1,4-Диоксан	6.97	2	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	0.25	0.2
25 Бутанол-1	8.75	3.250	3.5	0.3
26 Пиридин	9.17	2	2	0.2
27 Моноэтиловый эфир этиленгликоля	9.63	3	3	0.2
28 Стирол	10.37	0.25	0.25	0.2
29 Диметилформамид	11.70	2.0	2.0	0.3
30 Циклогексанол (BC 2)	12.3	2.5	2.5	0.3
31 3,5-Диметилпирдин	12.84	2.5	2.5	0.3
32 Диметилсульфоксид	15.16	2.0	2.0	0.2
33 Анилин	17.04	2.0	2.0	0.3

Приложение 2. Компоненты технических жидкостей, определяемые в моче методом прямого ввода на колонке HP-FFAP 50м;0.32мм;0.50мкм

Вещество	мол. масса а.е.м.	Время удерживания 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 Метилформат	60	2.23	61(100),60(75),45(47)	
4 Алетон	58	2.60	58(7,7),43(100)	2,6
5 Этилформат	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 n-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	46	3.87	33(100),35,46	1,7
16 4-метил-пентанон-2 (Метилэтилкетон)	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 Толуол	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	Метилкаронат	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	Монотриловый эфир этиленгликоля	90	8,59	91(39),73(62),59(48),45(100),43(50)	2,7
33	n-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),43(59),41(92)	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)	2,2
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)	3,3
47	1,2-Прошленгликоль	76	14,21	77(5,5),59(42),45(100),43(28)	3,6
48	Этилдеканоат	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),6(0,72),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	Этилодеканоат	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	Додециловый спирт	186,3	19,17	111(15),97(26,7),83(38,6),69(53),55(64,3),41(100)	3,2
66	beta-Иопон	192,3	19,28	193(10),177(81),105(11),91(17),43(100)	2,6
67	Фенол, 2-МеО, 4-Ме	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	Кориичный 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	o-Ванилин	152,5	24,82	153(11),152(100),151(96),137(61),123(16),109(26),81(30)	
75	Этилгексадеканоат	284	26,09		

Подписано в печать 20.03.2020.
Формат 60x90/16. Бумага офсетная. Гарнитура Times.
Заказ № 2664.7. Тираж 200.

Отпечатано в типографии ООО «Принт»
426035, г. Ижевск, ул. Тимирязева, 5.