https://doi.org/10.17116/sudmed201760329-33

Разработка методики определения содержания низкомолекулярных спиртов и ацетона в образцах биоматериалов

К.т.н. Д.А. АФОНИН[1], С.В. ХАТУНЦЕВ[1], к.х.н. О.В. ВИНОГРАДОВА[1], к. фарм. н. Т.В. ГОРБАЧЕВА[2]

[1]Отдел исследований и разработок ООО «ЕСА Сервис» (ген. дир. И.В. Шуваев), Санкт-Петербург, Россия, 191015; [2]Санкт-Петербургское бюро судебно-медицинской экспертизы (нач. — д.м.н. И.Е. Лобан), Санкт-Петербург, Россия, 195067

Цель исследования — разработка и аттестация методики определения низкомолекулярных спиртов и ацетона в моче, крови, в том числе в крови с пониженным содержанием воды. Методика основана на хроматографическом анализе равновесной паровой фазы, ввод пробы осуществлялся автоматически. Количественный расчет проводили по методу внутреннего стандарта (пропанол-1). Для повышения достоверности идентификации аналитов использовали двухканальную схему с одним испарителем, пассивным делением потока, капиллярными колонками различной полярности и двумя плазменно-ионизационными детекторами. Разработанная методика впервые позволяет учитывать возможное содержание пропанола-1 в исходной пробе при количественных определениях, а также проводить количественный анализ проб крови с пониженным содержанием воды. Наработан полный объем статистических данных, необходимый для расчета метрологических характеристик методики. Методика аттестована ВНИИМ им. Д.И. Менделеева под номером 754/242-(01.00250)-2016.

Ключевые слова: аттестованная методика, алкоголь в крови, парофазный метод анализа.

The development of the method for the determination of the low-molecular weight alcohol content in the specimens of the biological materials

D.A. AFONIN[1], S.V. KHATUNTSEV[1], O.V. VINOGRADOVA[1], T.V. GORBACHEVA[2]

[1]«ECA Service Ltd.», Saint-Petersburg, Russia, 191015; [2]Saint-Petersburg Bureau of Forensic Medical Expertise, Saint-Petersburg Health Committee, Saint-Petersburg, Russia, 195067

The objective of the present study was the development and metrological attestation of the method for the determination of concentrations of low-molecular weight (C1—C4) alcohols and acetone in the biological materials, such as urine and blood including partially dehydrated blood. The method is based on the chromatographic analysis of the equilibrium vapour phase with the use of the static headspace autosampler. The calculations were carried out making use of the results obtained with the application of propanol-1 as the internal standard. In order to enhance the reliability of the identification of the analytes in the complex blood matrix, the two-channel configuration was employed that consisted of a single evaporator, passive flow division, two capillary columns of different polarity, and two flame ionization detectors. The proposed technique provided for the first time the unique possibility to perform the quantitative measurement of the internal standard in the starting specimen before the main analysis. The validated procedure for the quantitative determination of the alcohol concentration of blood samples with the reduced water content has been described. The present study made it possible to collect the total amount of relevant statistical data necessary to calculate the metrological characteristics of the method in question. The method was certified based at D.I. Mendeleev All-Russian Research Institute of Metrology under No 754/242-(01.00250)-2016.

Keywords: certified method, blood alcohol, headspace analysis, metrologically approved method.

Определение содержания этанола в биожидкостях (кровь и моча) — востребованный вид анализа в медицинской и судебно-медицинской практике, который регламентирован правовыми документами [1—3]. Точным и информативным методом определения содержания этанола в биожидкостях является метод газовой хроматографии, на основе которого разработан ряд методик. В нашей стране наиболее широкое распространение получил «алкилнитритный» метод [4], который состоит в предварительном получении алкилнитритов спиртов с последующим газохроматографическим анализом паровой фазы. В мировой практике этот подход полностью вытеснен более простым методом — прямым хроматографическим анализом паровой фазы анализируемого образца без предварительной дериватизации аналитов. Современные дозаторы паровой фазы позволяют автоматизировать процесс анализа. В ряде случаев для повышения достоверности идентификации аналитов хроматографический анализ проводят параллельно на двух колонках с различной полярностью. Например, фирма «Agilent Technologies» предлагает специальный анализатор на основе газового хроматографа Agilent 7890B и дозатора паровой фазы Agilent 7697A, реализующий двухколоночную схему [5, 6].

© Коллектив авторов, 2017

[1]e-mail: d.afonin@ecaservice.ru
[2]e-mail: tv-gorbacheva@yandex.ru

В отечественной практике известна методика определения летучих органических соединений, в том числе этанола, методом статического парофазного анализа с использованием автоматического дозатора для ввода жидких проб [7, 8]. На сегодняшний день данная методика не аттестована. В 2014 г. была разработана и аттестована методика определения массовой концентрации этанола в пробах крови методом статического парофазного анализа без перевода этанола в этилнитрит [9]. Несомненным преимуществом данной методики является возможность автоматизации ввода пробы, но методика метрологически аттестована только для определения этанола, что ограничивает область ее применения.

Цель исследования — обобщение как отечественных, так и зарубежных подходов по разработке и аттестации методики определения низкомолекулярных спиртов в образцах биоматериалов (кровь и моча) с автоматическим дозированием пробы. В ходе разработки методики учитывали специфику современной практики судебно-медицинского анализа, а также соблюдали требования действующих нормативных и правовых документов.

Материал и методы

При разработке методики и получении статистических данных использовали две хроматографические системы:

— газовый хроматограф Хроматэк-Кристалл 5000, оснащенный испарителем, двумя пламенно-ионизационными детекторами (ПИД) и автоматическим парофазным дозатором ДАЖ-2М;

— газовый хроматограф Agilent Technologies 7890B, оснащенный испарителем, двумя ПИД и парофазным пробоотборником Agilent Technologies 7697.

Для хроматографического анализа использовали две капиллярные колонки с различной полярностью неподвижной фазы: DB-ALC1 (длина 30 м, внутренний диаметр 0,32 мм, толщина фазы 1,8 мкм) и DB-ALC2 (длина 30 м, внутренний диаметр 0,32 мм, толщина фазы 1,2 мкм). Хроматографические колонки подсоединяли с помощью специального делителя к одному порту ввода пробы газового хроматографа.

Градуировочные растворы аналитов готовили с помощью стандартных образцов состава чистых веществ (метанол, этанол, пропанол-2, бутанол-1, бутанол-2, изобутанол, ацетон) производства ООО «ЭКОХИМ» с содержанием основного вещества не менее 99,5%.

Образцы крови и мочи брали у доноров-добровольцев. До проведения исследования образцы крови хранили при температуре −18 °С. Модельным образцом «густой крови» служила свернувшаяся кровь.

Результаты и обсуждение

Объекты анализа и определяемые аналиты

Согласно нормативным документам [1—3], для химико-токсикологических исследований в ходе проведения судебно-медицинской экспертизы используют образцы крови и/или мочи. Отбор проб слюны данными документами не предусмотрен. В судебно-медицинской практике экспертам часто приходится анализировать кровь с меньшим содержанием воды («густая кровь»), что сопряжено с рядом трудностей. Существующие методические документы не описывают процедуру анализа таких проб. В качестве объектов анализа для данной методики были выбраны моча и кровь, включая «густую кровь».

В практике судебно-медицинской экспертизы, помимо этанола, требуется определение содержания других низкомолекулярных спиртов и токсикологических соединений [10]. Разработанная методика позволяет количественно измерить содержание метанола, этанола, изопропанола, бутанола-2, изобутанола, бутанола-1 и ацетона (аналиты) в диапазоне от 0,05 до 10 г/дм^3.

Метод измерений

Метод измерений основан на хроматографическом анализе равновесной паровой фазы. Термостатирование проб, отбор паровой фазы и ввод ее в хроматограф проводили с использованием автоматического парофазного пробоотборника **(рис. 1)**. Продолжительность цикла единичного хроматографического анализа при указанных условиях составила 8±0,1 мин. Была достигнута линейность откликов детекторов во всем диапазоне измерений для полного перечня аналитов. Предел детектирования оказался значительно меньше нижней границы диапазона измерений **(табл. 1)**.

Методика допускает изменять перечень определяемых аналитов, а также использовать одноколоночный вариант, например при определении только этанола в образцах биоматериалов. Цикл хроматографического анализа при этом может быть сокращен до 4—5 мин.

Для расчета концентраций аналитов применяют метод внутреннего стандарта, в качестве которого используют пропанол-1. Градуировочные характеристики для аналитов определяют на основании анализа 5 градуировочных смесей, которые готовят путем смешивания 1 см^3 градуировочного раствора и 4 см^3 раствора внутреннего стандарта. Номинальные концентрации аналитов в градуировочных растворах 0,1, 0,2, 0,5, 2 и 5 г/дм^3. Номинальная концентрация пропанола-1 в растворе внутреннего стандарта составляет 0,025 г/дм^3.

Выполнение измерений

При проведении анализа жидких образцов пробу биоматериала в количестве от 0,5 до 1 см^3 смешивали с 4 см^3 раствора внутреннего стандарта. Такой объем является достаточным, чтобы обеспечить требуемую точность измерений. Разбавление пробы раствором внутреннего стандарта позволяет, с одной стороны, снизить влияние матрицы, с другой — ускорить достижение межфазного равновесия.

Основная причина ошибочных результатов при количественном анализе биоматериалов — наличие в исходных образцах пропанола-1, который является внутренним стандартом. В связи с этим процедура методики предусматривает предварительное проведение для каждого образца анализа фоновой пробы, т.е. пробы биоматериала без добавления внутреннего стандарта. Это позволяет определить наличие пропанола-1 в исходном образце и оценить содержание определяемых аналитов. При наличии в анализируемом образце пропанола-1 по данной методике можно учесть его содержание при количественных расчетах. Если содержание аналитов меньше нижней границы измерений, методика позволяет не проводить повторный анализ с добавлением раствора внутреннего стандарта.

Особым случаем является анализ образцов «густой крови». Прямой парофазный анализ таких образцов обе-

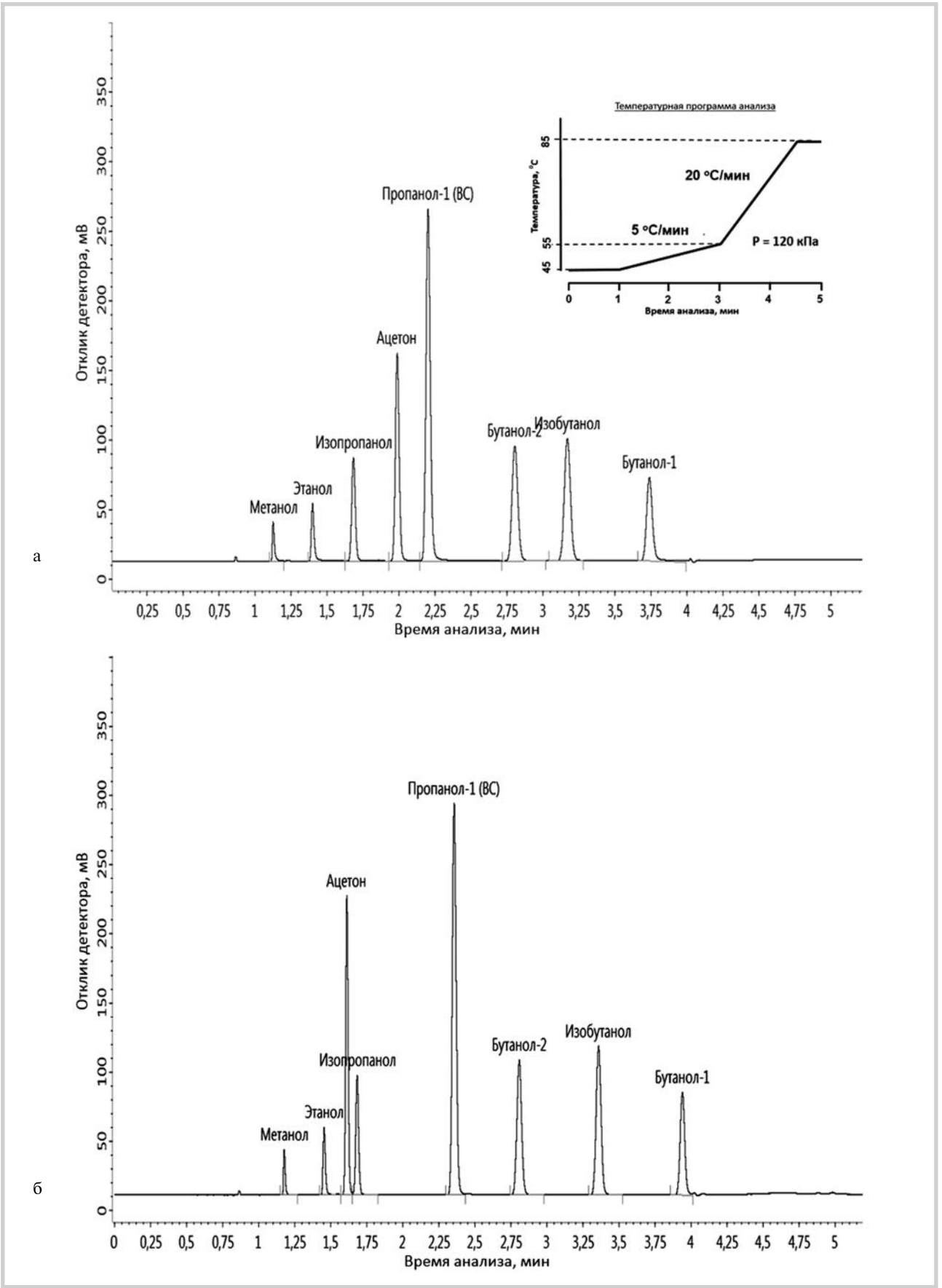

Рис. 1. **Хроматограммы раствора модельной смеси аналитов.**

а — колонка DB-ALC1; б — колонка DB-ALC2.

Таблица 1. **Валидационная оценка качества хроматографического анализа**

Аналит	Предел детектирования, г/дм^3	Коэффициент линейной корреляции градуировочной зависимости, r^2
Метанол	0,0014	0,999
Этанол	0,00092	0,998
Изопропанол	0,00047	0,996
Ацетон	0,00018	0,999
Бутанол-2	0,00033	0,994
Изобутанол	0,00027	0,993
Бутанол-1	0,00038	0,993

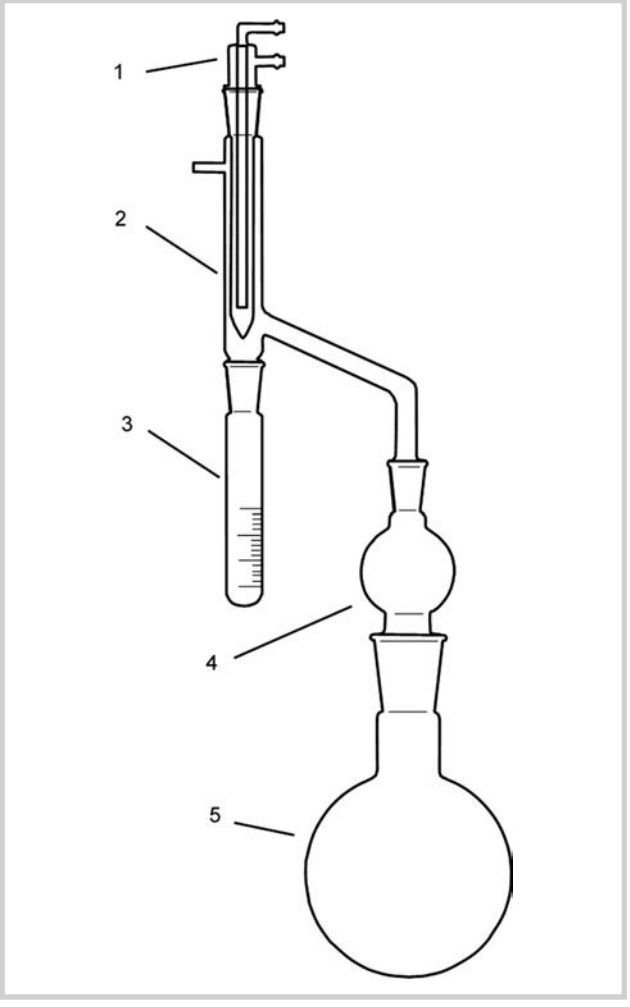

Рис. 2. **Схема установки для перегонки проб «густой крови».**

1 — пальчиковый холодильник; 2 — переходник; 3 — приемная пробирка; 4 — каплеуловитель; 5 — отгонная колба.

спечивает полуколичественное определение содержания аналитов. Для получения результатов с гарантированной точностью разработали процедуру, включающую предварительную отгонку аналитов.

Отгонку образцов биоматериалов проводили в специальном аппарате **(рис. 2)**. Навеску пробы 3±1 г помещали в отгонную колбу, добавляли 4 см^3 раствора внутреннего стандарта 50±5 см^3 насыщенного раствора натрия хлорида и полидиметилсилоксановую жидкость (ПМС-100 или ПМС-200) для предотвращения пенообразования. Отгонку проводили до тех пор, пока количество продукта отгонки не достигнет 5 см^3, который затем переносили во флакон, предназначенный для установки в автоматический дозатор. В отгон переходит не менее 95% количества аналитов, содержащихся в исходной пробе, при этом соотношение компонентов, за исключением ацетона, в исходной пробе и отгоне практически не меняется. Степень потери ацетона в процессе перегонки оценивали при наработке статистических данных и учитывали при расчете погрешности анализа.

Контроль качества результатов измерений

Процедура методики предусматривает 3 вида контроля: повторяемости, градуировочного коэффициента и правильности измерений. Контроль правильности проводили ежедневно, используя аналитические пробы, приготовленные из одного биоматериала. Контроль градуировочных коэффициентов осуществляли также ежедневно на примере одного из градуировочных растворов. Контроль правильности измерений проводили периодически: например, при внедрении методики в практику работы лаборатории.

Экспериментальные данные для оценки метрологических характеристик данной методики собирали согласно плану, составленному ВНИИМ им. Д.И. Менделеева. Измерения проводили для трех модельных матриц — вода, кровь и моча. Образцы готовили путем внесения в матрицу добавки аналитов, при этом полученные концентрации охватывали весь диапазон методики — от 0,05 до

Таблица 2. **Метрологические характеристики методики**

Объект	Измеряемая величина	Диапазон измерений	Относительная расширенная неопределенность измерений (при коэффициенте охвата k=2), U^0 % *	Предел повторяемости результатов измерений, r % **
Кровь Моча	Массовая концентрация аналита, г/дм^3	0,05—10,0	10 12 ***	5
«Густая кровь»	Массовая доля аналита, % (‰)	0,005—1,00 (0,05—10,0)	20	15 для низкомолекулярных спиртов 20 для ацетона

Примечание. * — соответствует границам относительной суммарной погрешности при p=0,95; ** — относительно среднего значения двух результатов единичных измерений; *** — при повышенном значении содержания пропанола-1 в образце биоматериала.

10 г/дм^3. Для каждого вида матрицы приготовили не менее 6 образцов, каждый образец измеряли с использованием двух хроматографических систем и варьированием операторов. Установленные метрологические характеристики представлены в **табл. 2**.

Выводы

Разработана методика определения содержания низкомолекулярных спиртов (метанол, этанол, изопропанол, бутанол-1, изобутанол и бутанол-2) и ацетона в пробах биоматериалов (кровь, моча, «густая кровь»). Диапазон измеряемых концентраций (массовые доли) аналитов от 0,05 до 10,0 г/дм^3 (от 0,005 до 1%). Впервые описана процедура количественного анализа проб с остаточным содержанием пропанола-1 и проб «густой крови». Выполнен эксперимент по наработке статистических данных, по результатам которого проведена метрологическая аттестация.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Приказ Минздрава России №40 «Об организации проведения химико-токсикологических исследований при аналитической диагностике наличия в организме человека алкоголя, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ» от 27.01.06. [Prikaz Minzdrava RF №40 «Ob organizatsii provedeniya khimiko-toksikologicheskikh issledovanii pri analiticheskoi diagnostike nalichiya v organizme cheloveka alkogolya, narkoticheskikh sredstv, psikhotropnykh i drugikh toksicheskikh veshchestv» ot 27.01.16. (In Russ.)].
2. Приказ Минздрава России №346н «Об утверждении порядка организации и производства судебно-медицинских экспертиз в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации» от 12.05.10. [Prikaz Minzdrava RF №346n «Ob utverzhdenii poryadka organizatsii i proizvodstva sudebno-meditsinskikh ekspertiz v gosudarstvennykh sudebno-ekspertnykh uchrezhdeniyakh Rossiiskoi Federatsii» ot 12.05.10. (In Russ.)].
3. Приказ Минздрава России №933н «О порядке проведения медицинского освидетельствования на состояние опьянения (алкогольного, наркотического или иного токсического)» от 18.12.15. [Prikaz Minzdrava Russia №933n «O poryadke provedeniya meditsinskogo osvidetel'stvovaniya na sostoyanie op'yaneniya (alkogol'nogo, narkoticheskogo ili inogo toksicheskogo)» ot 18.12.15. (In Russ.)].
4. Методика выполнения измерений массовой концентрации этанола в крови, моче и слюне. М.: РЦСМЭ. 2012. [Metodika vypolneniya izmerenii massovoi kontsentratsii etanola v krovi, moche i slyune. M.: RCSME. 2012. (In Russ.)].
5. Boswell H, Dorman F, Lynam K. Determine Blood Alcohol with Dual Column/Dual FID for Precision and Reproducibility. 5991-3671EN. USA: Agilent Technologies Inc. 2013.
6. Agilent Dual Channel Blood Alcohol Analyzer. 5991-2654EN. USA: Agilent Technologies Inc. 2013.
7. Савчук С.А., Веденин А.Н. Обнаружение и количественное определение летучих токсических веществ и гликолей в биологических объектах методами газовой хроматографии и хромато-масс-спектрометрии. Пособие для врачей КЛД. М.: ММА им. Сеченова. 2003. [Savchuk SA, Vedenin AN. Obnaruzhenie i kolichestvennoe opredelenie letuchikh toksicheskikh veshchestv i glikolei v biologicheskikh ob'ektakh metodami gazovoi khromatografii i khromato-mass-spektrometrii. Posobie dlya vrachei KLD. M.: MMA im. Sechenova, 2003. (In Russ.)].
8. Савчук С.А., Веденин А.Н., Изотов Б.Н. Обнаружение летучих токсических веществ в биологических жидкостях организма методом газовой хроматографии и хромато-масс-спектрометрии. *Наркология*. 2002;2:37-45. [Savchuk SA, Vedenin AN, Izotov BN. Detection of volatile toxic compounds in biological fluids by GC and GC/MS. *Narkologiya*. 2002;2:37-45. (In Russ.)].
9. Михеев А.С., Тумурова Л.В., Максимов А.А., Доржиева Т.В. Газохроматографическое определение алкоголя и его суррогатов в крови с использованием статического парофазного анализа. *Наркология*. 2016;4:88-95. [Mikheev AS, Tumurova LV, Maksimov AA, Dorzhieva TV. GC method for determination of alcohol and alcohol surrogates in blood with static headspace. *Narkologiya*. 2016;4:88-95. (In Russ.)].
10. Приказ Минздрава России №1021 «О введении нового перечня токсикологических веществ, подлежащих судебно-химическому исследованию в лабораториях бюро судебно-медицинской экспертизы» от 25.12.73. [Prikaz №1021 Minzdrava SSSR «O vvedenii novogo perechnya toksikologicheskikh veshchestv, podlezhashchikh sudebno-khimicheskomu issledovaniyu v laboratoriyakh byuro sudebno-meditsinskoi ekspertizy» ot 25.12.73. (In Russ.)].

Поступила 12.01.17