



Обнаружение и количественное определение летучих токсичных компонентов в биологических объектах методом газовой хроматографии

Конспект доклада.

Докладчик: полномочный представитель компании NeoCHROM

Андрей Леонидович Стекленёв. email: ceodnepr@neochrom.biz

Тема: Обнаружение и количественное определение летучих токсичных компонентов в биологических объектах методом газовой хроматографии

Цель: представить специалистам метод обнаружения и количественного определения алкоголя и других летучих токсичных компонентов (метанол, изопропанол, ацетон и др.) в биологических объектах методом газохроматографического анализа равновесной паровой фазы (АРПФ) без термостатирования.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время основной из задач лабораторий аналитической токсикологии и судебно-медицинской экспертизы выявление лиц страдающих наркотической зависимостью, а также выявлять случаи алкогольного опьянения, одурманивания или непреднамеренного отравления летучими растворителями и низкомолекулярными токсичными веществами (нелетучими растворителями, антифризами и проч.). Для этих целей предпочтительно, чтобы все лаборатории имели однотипное современное газохроматографическое оборудование. Это позволит унифицировать методики анализа, создавать общий банк аналитической информации, обмениваться результатами анализа в виде компьютерных файлов для подтверждения правильности идентификации в базовой лаборатории.

На базе унифицированных методик возможна дальнейшая разработка курсов обучения персонала – врачей клинической лабораторной диагностики и экспертов-химиков бюро судебно-медицинской экспертизы.

1. Общие сведения о парофазном хроматографическом анализе.

Парофазный хроматографический анализ основан на сочетании газовой экстракции (ее разнообразных статических и динамических вариантов с хроматографией). Теоретические основы метода изложены в классических монографиях.

Наиболее известные из них работы Александра Григорьевича Витенберга – доктора химических наук, профессора, ведущего научного сотрудника Санкт-Петербургского государственного университета, ведущего научного сотрудника ВНИИМ им. Д.И. Менделеева. Крупнейшим научным достижением А.Г. Витенберга, без сомнения, следует считать разработку теории и многочисленных практических приложений газохроматографического парофазного анализа. Из его работ наибольшую известность и международное признание получили монографии (совместно с проф. Б.В.Иоффе) «Газовая экстракция в хроматографическом анализе» (1982), и «Head-Space Analysis & Related Methods in Gas Chromatography» (издательство Wiley, 1984). Ему принадлежит около 150 публикаций, посвященных установлению закономерностей газовой экстракции и 15 авторских свидетельств.

Термины и определения

(слайд №2)

Газовая экстракция - извлечение газом летучих веществ из конденсированной фазы.

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

Анализ равновесной паровой фазы без термостатирования - парофазный анализ при котором равновесная газовая фаза отбирается в газоплотный шприц при температуре окружающей среды и вводится в хроматограф в автоматическом режиме.

2. Алкилнитритный метод

На сегодняшний день основным повсеместно используемым способом обнаружения и количественного анализа спиртов является алкилнитритный вариант парофазного газо-хроматографического анализа. Точность и воспроизводимость этого метода вполне удовлетворительны: общая (систематическая плюс случайная) погрешность составляет не более 5 %.

Сущность нитритного метода заключается в превращении спиртов в алкилнитриты, более летучие, чем спирты, и в дальнейшем хроматографировании алкилнитритов.

Методика имеет несколько модификаций, но в основном последовательность следующая.

(слайд №3)

Во флакон (пенициллиновый), содержащий 0,5 мл раствора трихлоруксусной кислоты (50% водный раствор), вносят 0,5 мл исследуемой пробы, 0,5 мл внутреннего стандарта (изопропанол 0,4% водный раствор). Флакон закрывают стандартной резиновой пробкой и фиксируют алюминиевым колпачком с помощью ПОК (прибор для обжима пенициллиновых флаконов). После энергичного перемешивания во флакон шприцем вводят 0,35 мл раствора нитрита натрия (30% водный раствор). Содержимое флакона энергично встряхивают (30 маятникообразных движений) и оставляют на 1 минуту. Затем из флакона шприцем путем прокола пробки отбирают 0,5 мл парогазовой фазы, которую тотчас же вводят в инжектор газового хроматографа.

При этом применяется оборудование со следующими характеристиками:

(слайд №4)

- газовый хроматограф с детектором по теплопроводности, инжектор без деления потока;
- металлическая насадочная колонка 200 x 0,3см, твердый носитель (целиты, хромосорб, хроматон, цветохром и т.п.) и фаза (как правило ПЭГ), обеспечивающие необходимое разделение обнаруживаемых компонентов;
- ввод пробы медицинским шприцем емкостью 1,0 см³.

3. Прямой парофазный метод с автоматическим вводом пробы.

Представляемая нами методика с использованием анализа равновесной паровой фазы (АРПФ) без термостатирования от существующих методик парофазного анализа отличается следующим.

По данной методике алкоголь в биологических объектах определяют без предварительного получения алкилнитритных производных, что делает анализ более воспроизводимым (отсутствует составляющая погрешности, связанная с возможной неполнотой дериватизации). Также отсутствует необходимость работы с токсичными дериватизирующими агентами. В качестве внутреннего стандарта при определении алкоголя в биологических объектах (взятых от живых людей) используют пропанол-1, а не изопропанол, что повышает надежность анализа. (Примечание: до 20% изопропанола в водных растворах окисляется до ацетона в течение 3-х даже дней при хранении раствора в холодильнике). Настоящая методика предполагает использование стандартного автоинжектора с газоплотным шприцем и флаконы (виалы) емкостью 2,0 мл с плотно навинчивающейся крышкой и газоплотной септой. Равновесная газовая фаза отбирается в газоплотный шприц при температуре окружающей среды и вводится в хроматограф в автоматическом режиме.

В отличие от других, данная методика позволяет применять для идентификации и количественного анализа пламенно-ионизационный детектор (ПИД), обладающий более высокой чувствительностью и высоким линейным динамическим диапазоном, в котором сохраняется линейная зависимость показаний детектора от концентрации или количества анализируемого вещества (до 10^7), что повышает чувствительность анализа и надежность идентификации. Возможно применение более чувствительного масс-селективного детектора, однако линейный диапазон при этом уступает ПИД. масс-селективный детектор.

Сущность метода.

(слайд №5)

Пробу биологической жидкости объемом 1,0 мл с введенным внутренним стандартом помещают в стеклянную виалу (флакон), плотно укупоривают крышкой с полимерной мембраной. Анализуют воздушно-паровую фазу из газового пространства виалы над поверхностью пробы. Отбор равновесной паровой фазы производят путем прокалывания шприцем полимерной мембраны (используют газоплотный хроматографический шприц с тефлоновым уплотнением поршня). Отбор пробы проводят при комнатной температуре (в диапазоне температур от +15 до 35 °С) в автоматическом режиме. Парогазовую пробу анализируют методом хроматографии с пламенно-ионизационным (ГХ-ПИД).

(слайд №6)

Табл. 1. Компоненты технических жидкостей определяемые в крови, слюне и моче методом анализа равновесной паровой фазы при комнатной температуре на колонке HP-FFAP

	Определяемое вещество	Время удерживания, мин ГХ-ДИП	Предел определения, ПРО, мкг/мл	Примечания
1.	Диэтиловый эфир	2.873	2	
2.	Хлористый бутил	3.826	1,5	
3.	Ацетон	3.861	1,5	
4	Четыреххлористый углерод	4.188	5	
5	Метанол	4.348	56 мкг/мл (0,007%)	
6.	Метилэтилкетон	4.456	3,0	
7.	Изопропанол	4.626	56 мкг/мл (0,007%)	
8	Диметиловый эфир этиленгликоля	4.698	3,0	
9	Этанол	4.736	56 мкг/мл (0,007%)	
10	Метиленхлорид	4.736	1,5	
11	Бензол	5.014	1	
12	Дибутиловый эфир	5.084	1	
13	Метилизобутилкетон	5.925	3	
14	Ацетонитрил	6.035	3	
15	Хлороформ	6.125	1,5	
16	Пропанол (BC 1)	6.320	70 мкг/мл (0,007%)	Внутренний стандарт(BC) для парофазного анализа
17	Толуол	6.586	1	
18	1,4-Диоксан	6.978	2	
19	1,2-Дихлорэтан	7.000	1,5	
20	Метилбутилкетон	7.205	3	
21	p-Ксилол	8.273	0,25	
22	Пиридин	9.173	2	
23	Моноэтиловый эфир этиленгликоля	9.630	3	
24	Диметил формамид	11.703	2,0	Прямой ввод
25	Циклогексанол (BC 2)	12.382	2,5	BC для анализа методом прямого ввода
26	3,5-Диметилпиридин	12.842	2,5	
27	Диметилсульфоксид	15.165	2,0	Прямой ввод
28	Анилин	17.04	2,0	Прямой ввод

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

слайд №7

Табл.2 Компоненты технических жидкостей определяемые в моче методом прямого ввода

	Вещество	мол. масса а.е.м	Время удерживания RT, мин	МАСС-СПЕКТР (в скобках интенсивность в % от базового пика), условия анализа см. п. 5.3.	КОЧ (ГХ- ПВД)
1.	Ацетальдегид	44,0	1.96	44(81),29(100)	2,7
2.	Диметилацеталь формальдегида	76	2.09	75(44),45(100)	2,8
3.	Метилформиат	60	2.23	61(100),60(75),45(47)	
4.	Ацетон	58	2.60	58(7,7),43(100)	2,6
5.	Этилформиат	74,8	2.67	74(1,1),56(0,5),45(33),31 (100)	1,8
6.	Метилацетат	74,8	2.67	75(8),74(8),47(3),44(13), 43(100)	1,7
7.	Акролеин		2.94		
8.	н-Масляный альдегид	72,1 1	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(1 00)	2,0
10.	Метанол / изопропилацетат		3.35		2,3
11.	Метилэтилкетон	72,1	3.41	73(17),72(14),57(7,6),43(100)	1,5
12.	Изо -валериановый альдегид	86,1	3.61	87(5,2),69(19,3),58(36,1), 41(100)	1,6
13.	Пропилацетат	102, 1	3.68	89(7,3),59(3,7),57(5,6),55 (2,3),47(16),44(13),43(40 ,42(100)	1,8
14.	Диметиловый эфир этиленгликоля	90	3.70	91(5,4),69(5,0),58(22),45 (100)	3,4
15.	Этанол		3.87		
16.	4-метил-пентанон-2 (Метилизобутилкетон)	100, 16	4.92	101(12),85(12),58(18),43 (100)	1,2
17.	Втор-бутанол	74,1	5.18	75(1,3),73(1,8),63(1,6),59 (12,9),57(26,4),47(35)	1,4
18.	Пропанол-1	60	5.44	61(8,5),59(28,8),57(4,1),4 9(4,9),47(54,8),45(97),43 (100),42(60)	1,4
19.	Толуол	92,1 4	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),4 8(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(10 0)	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),4 3(36,2),41(100)	1,4
27.	Амилацетат	130, 19	7.73	131(7),70(15),61(34),55(14),43(100)	1,9
28.	Метилкапронат	130	7.98	131(81),99(19,8),87(16,2)	1,2

				,74(51),59(25),43(100)	
29.	Лимонен	136	8.04	136(6,2),121(8),107(11),93(37),79(32),67(71),53(21)45(100)	
30.	Пиридин	79,1	8.11	80(100),79(66),52(57)	1,7
31.	Изоамиловый спирт	88	8.35	87(0,89),71(38,2),55(77),45(22,7),41(100)	1,2
32.	Моноэтиловый эфир этиленгликоля	90	8.59	91(39),73(62),59(48),45(100),43(50)	2,7
33.	н-Амиловый спирт	88,1 5	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	60,0 5	12.25	60(19,6),45(71),43(100)	4,6
39.	Фурфурол	96,0 9	12.69	96(100),95(98),67(12,8),51(9,7),41(11,7)	1,5
40.	3,7-Диметил-1,3,7,-октатриен	136	13.41	136(2,3),121(8,6),107(4),105(5),93(37,5),81(19,3),71(49,9),55(51,3),43(100)	
41.	Пропионовая к-та	74,8	13.45	74(59),57(52),45(100)	2,6
42.	2,3-Бутиленгликоль	90	13.47	91(7,5),73(70),55(12,3),45(100),43(26)	2,7
43.	Октанол-1	130, 2	13.65	83(21),69(40),56(65),41(100)	1,0
44.	Бензальдегид	106, 1	13.64	105(100),77(90),51(63)	1,0
45.	Изо-масляная к-та	88,1	13.82	89(62),73(29),71(43),45(31),43(96),41(100)	2,9
46.	1,2-Бутиленгликоль	90	13.97	91(9,3),73(100),55(13),45(69)	
47.	1,2-Пропиленгликоль	76	14.21	77(5,5),59(42),45(100)43(28)	3,6
48.	Этилдеcanoат	200	14.73		
49.	2-Метил-2,4-пентандиол	118	14.64	119(2,3),101(21,8),83(16,5),59(69,5),43(100)	2,0
50.	Масляная к-та	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 к-та	102, 14	15.19	103(56),85(71),74(18),69(12),60(72),57(30),41(100)	3,2
54.	Валериановая к-та	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.	Этилдodecanoат	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(4,6

				23),55(73),92(100)	
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-Ионон	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(10 0)	9,7
69.	Фенол, 2-МеО, 4-Бг-	152	20.96		
70.	Фенол	94,1	20.37	94(100),66(47)	1,3
71.	Коричный альдегид	132, 2	21.62	131(100),103(48),78(37), 63(13),51(43)	2,2
72.	Фенол, 2-МеО, 4-Рг-	166	22.71		
73.	Тимол	150?	24.39		0,8
74.	о-Ванилин	152, 5	24.82	153(11),152(100),151(96), 137(61),123(16),109(26), 81(30)	
75.	Этилгексадеканоат	284	26.09		

3.1 Аппаратура, материалы и реактивы. слайд №8

Газовые хроматографы NeoCHROM, Class B с автоинжектором, позволяющим регулировать погружения иглы хроматографического шприца в виалу. Хроматографы снабжены пламенно-ионизационным детектором колонками HP-FFAP 50м;0.32мм;0.50мкм или аналог.

Для экспрессного определения алкоголя в биологических жидкостях (крови, моче, слюне) применяют капиллярную колонку HP-B ALC 7м;0,32мм;20 мкм или аналог.

Газ-носитель - азот особой чистоты по ГОСТ 9293.

Автоматические пипетки (диспенсеры) вместимостью 050-1000 мкл.

Микрошприцы хроматографические газоплотные вместимостью 100 мкл Hamilton (для работы с автоинжектором).

Виалы стеклянные с пластмассовой завинчивающейся пробкой (или с металлической пробкой, уплотняемой обжатием в кримпере) и тефлонированной полимерной мембраной вместимостью 2 мл.

Картриджи или патроны для твердофазной экстракции с октадецильными группами при использовании прямого ввода жидкостей в инжектор.

Реактивы, ч.д.а.

Химическая посуда общего назначения.

Весы аналитические 2 класса точности.

4. Отбор и хранение проб

Отбор проб биологических жидкостей производится согласно действующим методическим указаниям. Для каждого обследуемого необходимо указывать: возраст, пол, использование каких-либо лекарств, в том числе лекарств, содержащих этиловый спирт.

Наиболее распространенным биологическим объектом при токсико-химическом исследовании является моча. Процедура отбора биологической пробы мочи и слюны должна производиться под наблюдением врача во избежание замены и порчи пробы. Необходимо учитывать, что проба может быть заменена образцом в заранее принесенном контейнере, испорчена добавлением воды, отбеливателей и др. химических реагентов. Моча отбирается в разовый пластиковый или стеклянный флакон в количестве не менее

150-200 мл. Фиксируется рН и температура мочи. Проба делится пополам на пробы А и Б, аликвота пробы А поступает на анализ, проба Б опечатывается и хранится в замороженном состоянии в течении времени оговоренном действующими нормативными документами. Пробы слюны отбирают с помощью ватного тампона, тампон с отобранной пробой центрифугируют, отбирают 3 мл слюны, делят пополам, аликвоты пробы А поступают на анализ, пробу Б опечатывают и хранят замороженной.

Пробы крови отбирают с использованием разовых стерильных шприцов, объем пробы крови составляет 1 мл. В пробу добавляют антикоагулянт, делят пробу пополам, аликвота пробы А поступает на анализ, пробу Б опечатывают, замораживают и хранят в соответствии с действующими нормативными документами.

5. Приготовление стандартных растворов

Для определения этанола, метанола, ацетона и изопропанола, ожидаемые концентрации которых в исследуемых биообъектах находятся в диапазоне от 0,03 до 1,2 % об. готовят водные растворы перечисленных веществ, концентрация которых выражена в объемных %, при этом результат определения может выдаваться в % по объему или ‰.

Для определения других соединений, определяемых в низких концентрациях, градуировку проводят водными или водноспиртовыми растворами веществ, концентрация которых выражена в мкг/мл. Результаты определения также выдаются в мкг/мл.

5.1. Приготовление раствора внутреннего стандарта пропанола-1 для количественного определения этанола, метанола, ацетона, изопропанола и других определяемых компонентов в крови, моче и слюне.

В мерную колбу (1 класса точности) вместимостью 100 мл вносят 50 мл дистиллированной воды, 10 мл пропанола-1 и добавляют дистиллированную воду до метки 100 мл. Концентрация пропанола-1 в водном растворе составляет 10% по объему.

5.1.1 Пропанол-1 может быть использован как внутренний стандарт для соединений перечисленных в табл.1 и 2.

5.2. Приготовление раствора внутреннего стандарта циклогексанола для количественного определения компонентов технических жидкостей определяемых прямым вводом мочи, перечисленных в табл.1 приложения (этиленгликоль, диэтиленгликоль и вещества близкие им по летучести)

В качестве внутреннего стандарта при определении нелетучих этиленгликоля, диэтиленгликоля и близких им по летучести компонентов, перечисленных в табл. 1 и табл.1 Приложения используют циклогексанол.

В мерную колбу (1 класса точности) вместимостью 1000 мл вносят 300 мл этанола, 1 мл циклогексанола и добавляют дистиллированную воду до метки 1000 мл. Концентрация пропанола-1 в водном растворе составляет 0,1% по объему.

5.2.1 Циклогексанол может быть использован как внутренний стандарт для соединений близких по летучести этиленгликолю и диэтиленгликолю и перечисленных в табл. 1 Приложения.

5.3. Приготовление градуировочных растворов (смесей)

5.3.1. Приготовление градуировочных растворов этанола, метанола, ацетона, изопропанола

слайд №9

Приготовление раствора А. В мерную колбу (1 класса точности) вместимостью 100 мл вносят 50 мл дистиллированной воды, по 10 мл каждого вещества и добавляют дистиллированную воду до метки 100 мл. Концентрация стандартных веществ в растворе А составляет 10 % об.

Приготовление градуировочных растворов этанола, метанола, ацетона, изопропанола концентрациями 0,02; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0 % об.

Градуировочные растворы готовят с использованием биожидкостей крови, мочи или слюны не содержащих определяемых веществ. Выполняют три градуировки для анализа количественного анализа крови, мочи и слюны. К пробам крови предварительно добавляют 10% водный раствор цитрата (100 мкл раствора на 1 мл цельной крови). К трем аликвотным объемам (1 мл) биожидкости добавляют 2, 5, 10, 50, 100 и 200 мкл раствора А, при этом концентрация определяемых веществ составит 0,02; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0 % об., соответственно.

К каждому градуировочному добавляют 5 мкл внутреннего стандарта пропанола-1 (10%) и подвергают ГХ-ДИП или ГХ-МС анализу по п.5. Концентрация ВС пропанола-1 в градуировочной смеси составляет 0,05%.

Количественный расчет проводят по методу внутреннего стандарта согласно инструкции к прибору.

5.3.2. Приготовление градуировочных растворов (хлорорганических соединений, ароматических летучих веществ, этиленгликоля, диэтиленгликоля, а также других веществ перечисленных в табл. 1 и 2 (кроме перечисленных в п. 5.3.1.)

5.3.2.1. Приготовление градуировочных растворов концентрациями 500 мкг/мл

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

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

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

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

5.3.2.2. Приготовление градуировочных растворов концентрациями 50 мкг/мл

© Запрещено тиражирование и распространение в любой форме данного документа без письменного разрешения ЧП «НЕОХРОМ» стр 11 из 23

В мерную колбу вместимостью 100 мл вводят 10 мл раствора, приготовленного по п. 4.2.2.1 и добавляют мочу (не содержащую определяемых веществ) до объема 100 мл.

5.3.2.3. Приготовление градуировочных растворов концентрациями 5 мкг/мл

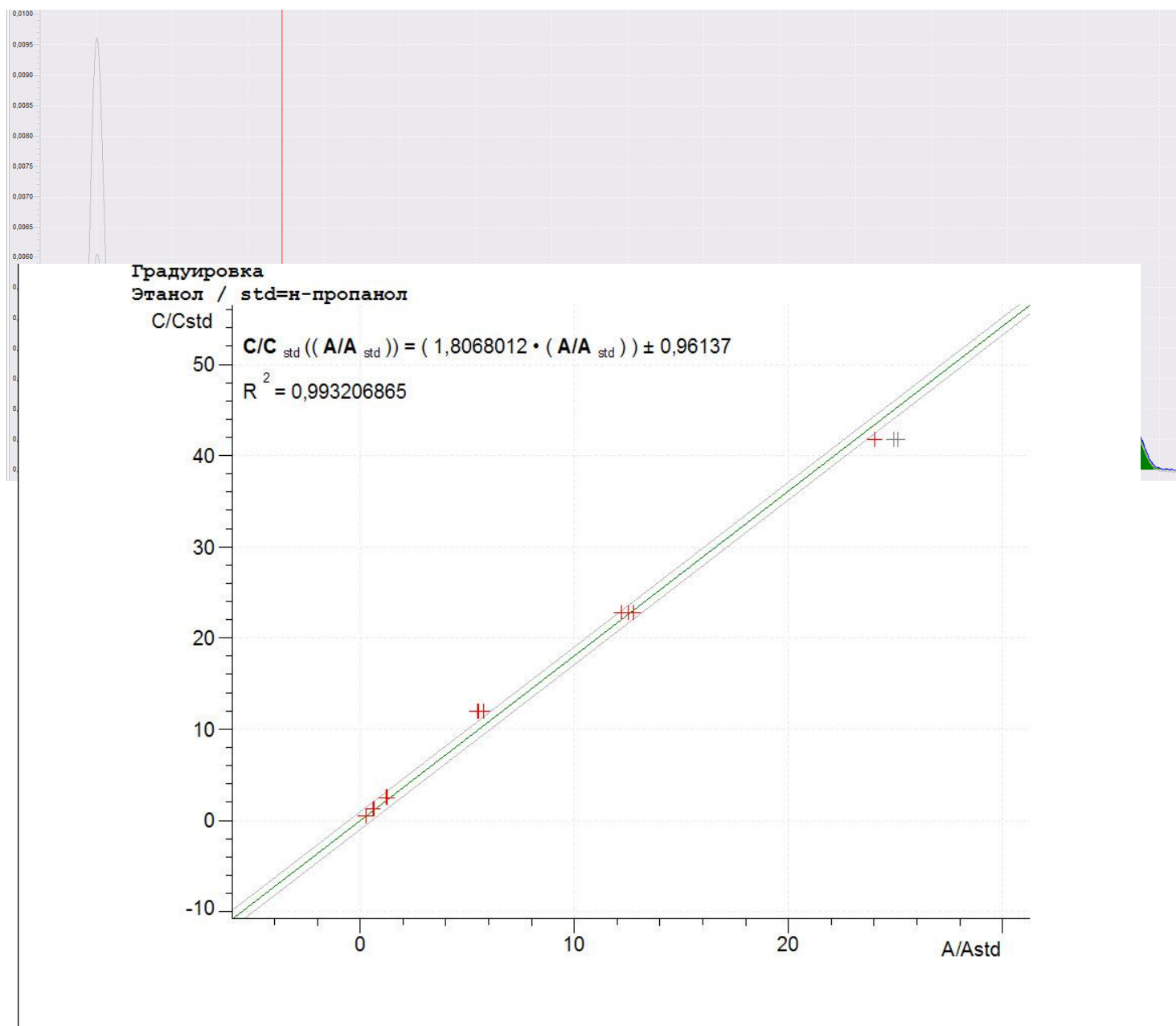
В мерную колбу вместимостью 100 мл вводят 10 мл раствора, приготовленного по п. 4.2.2.2 и добавляют мочу до объема 100 мл.

Ход анализа

Для анализа отбирают 1 мл растворов приготовленных согласно п.5.3.1-5.3.2, вводят 5 мкл раствора внутреннего стандарта пропанола-1, приготовленного согласно п. 5.1 для определения летучих компонентов перечисленных в табл.1 и 2 (концентрация ВС пропанола-1 в градуировочной смеси составляет 0,05% об.) или 1 мкл раствора внутреннего стандарта циклогексанола приготовленного согласно п.5.2 при определении этиленгликоля, диэтиленгликоля и веществ близких им по летучести представленных в табл.2. Концентрация ВС циклогексанола в градуировочной смеси составляет 2,8 мкг/мл.

Количественный расчет результатов проводят по методу внутреннего стандарта согласно инструкции к прибору.

слайды 9-12



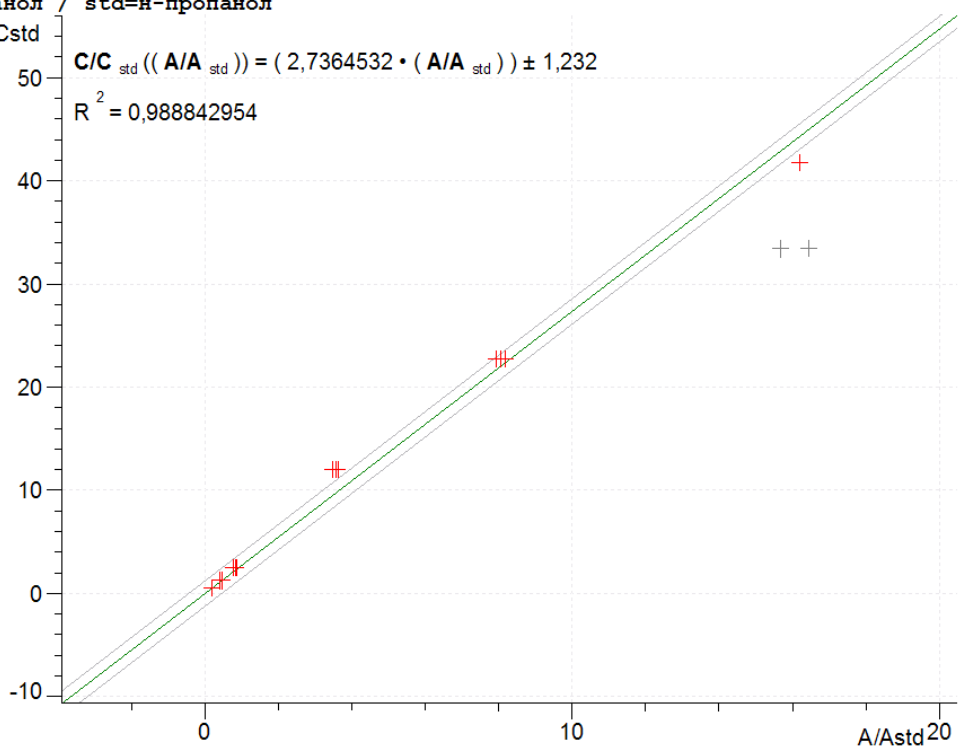
Градуировка

метанол / std=н-пропанол

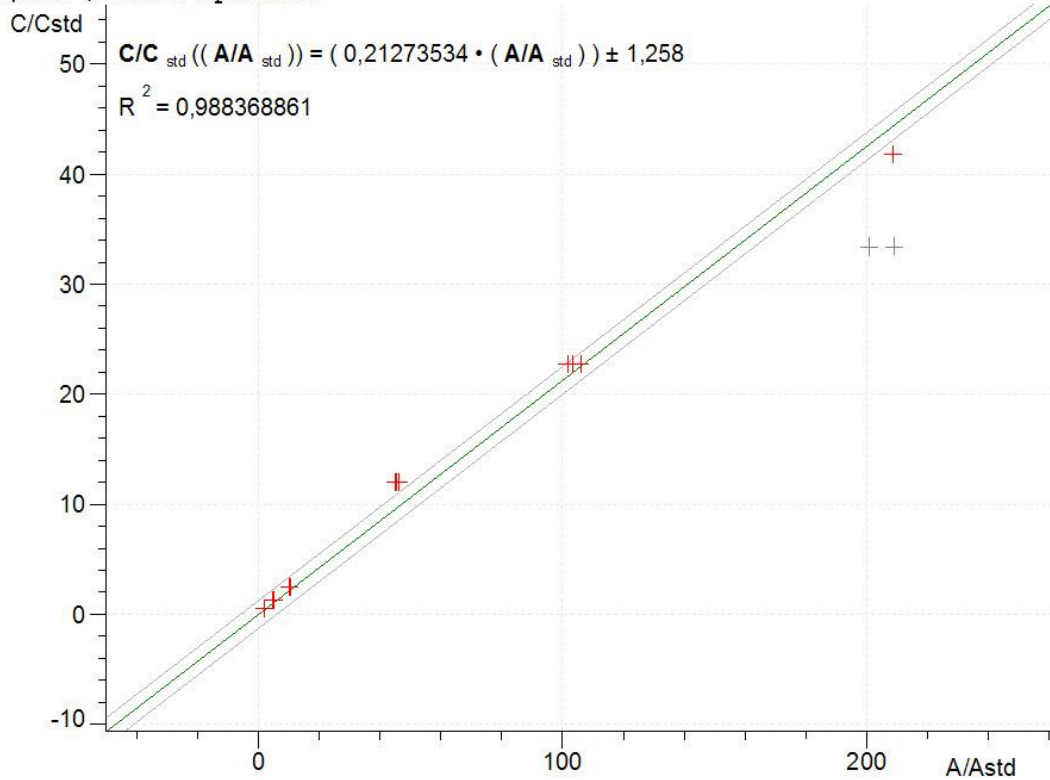
C/Cstd

$$C/C_{std} ((A/A_{std})) = (2,7364532 \cdot (A/A_{std})) \pm 1,232$$

$$R^2 = 0,988842954$$



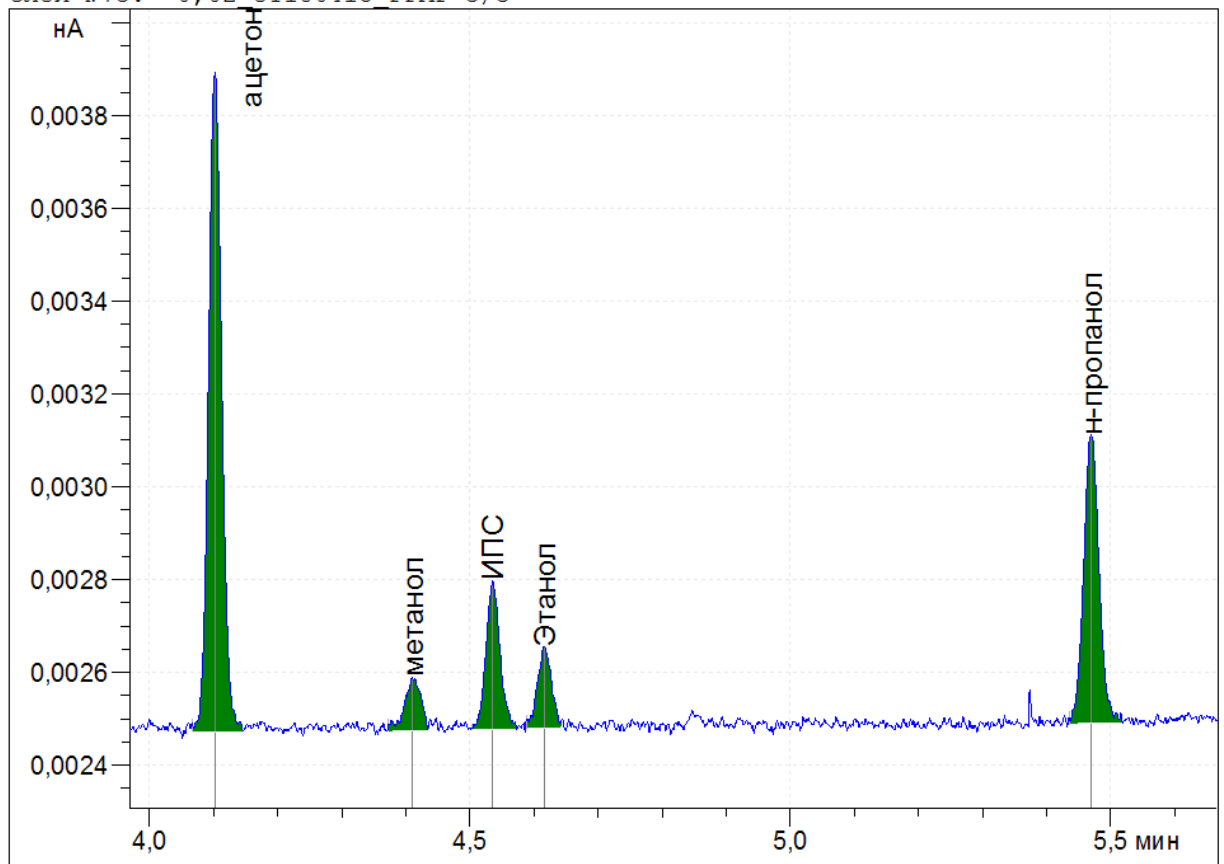
Градуировка
ацетон / std=н-пропанол

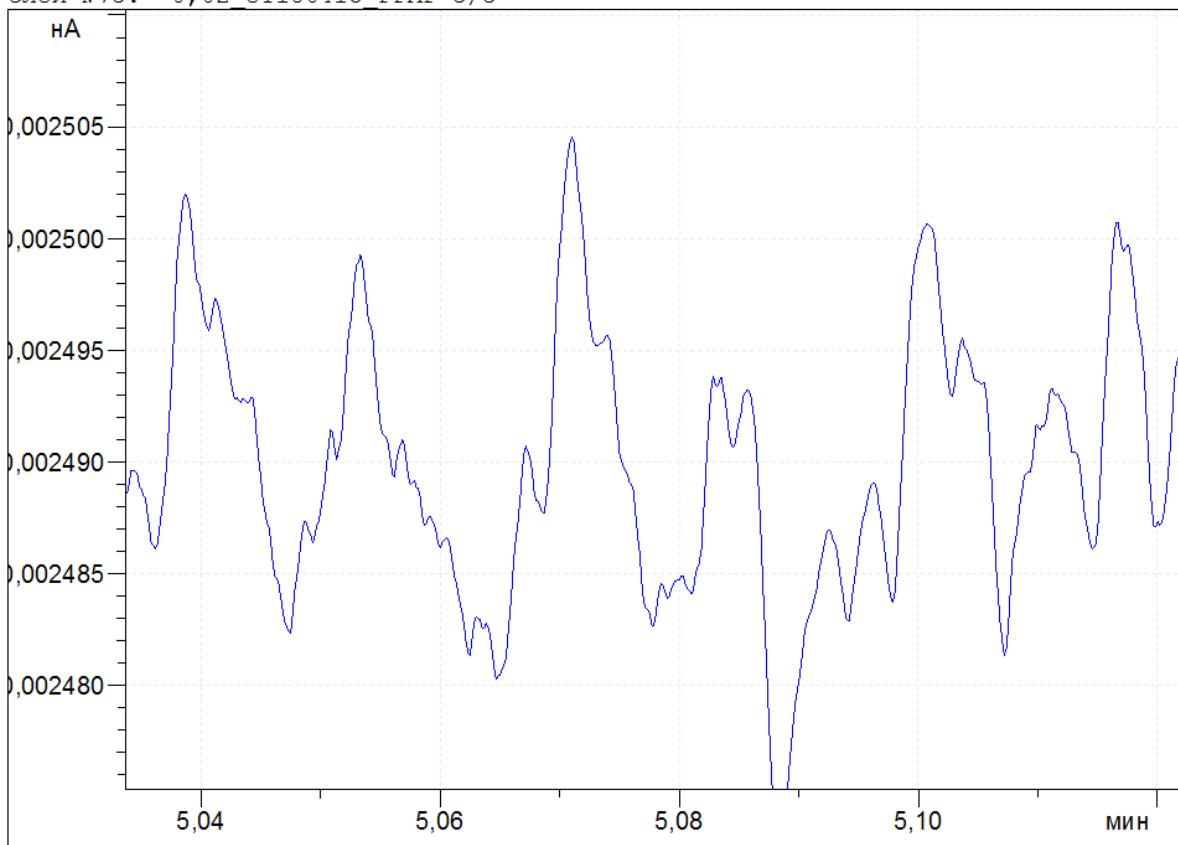


При этом было установлено, что соотношение сигнал/шум для наименьшей калибровочной концентрации 0,02% составляет не менее 10:1.

слайд №13

Слой №73: "0,02 от180415 FFAP 3/3"





Сигнал/шум = 10:1, шум – не более 20 фА

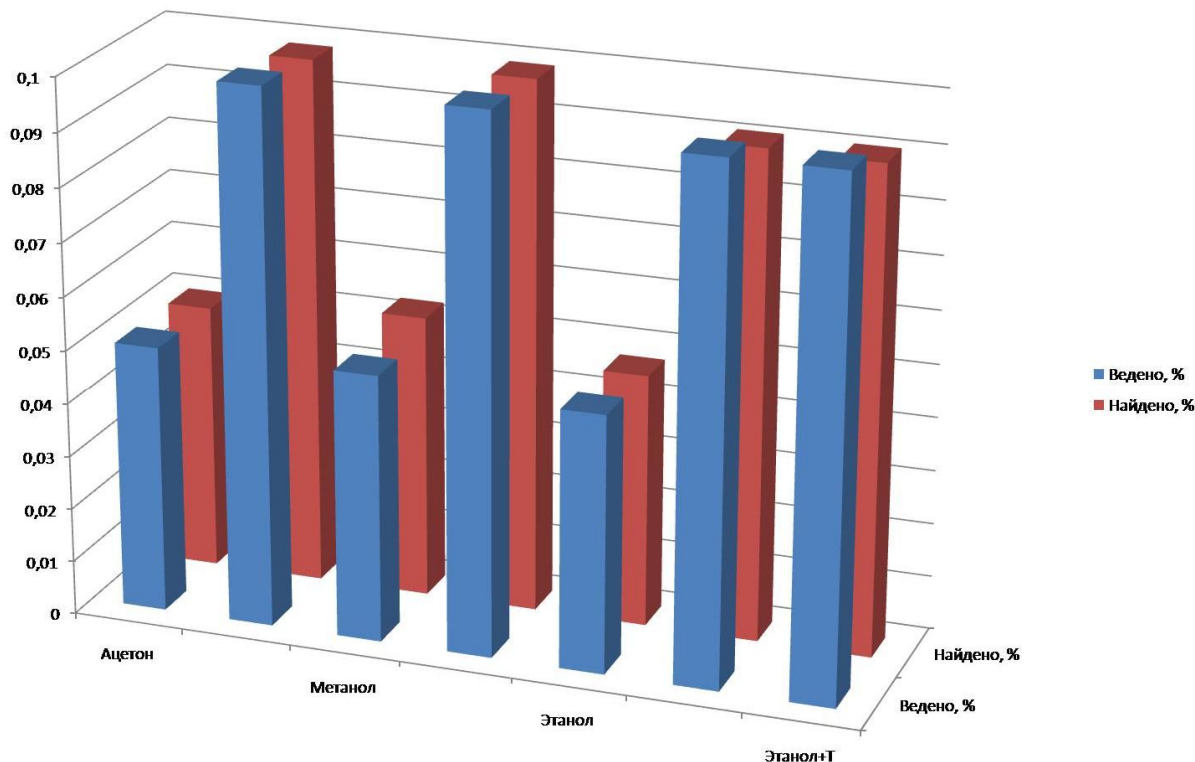
Метрологические характеристики определения летучих веществ.

Исследование проводили с использованием проб мочи с известным внесенным содержанием определяемых компонентов: ацетона, метанола и этанола. Определяемые вещества вводили в пробы в концентрациях 0,05% и 0,1%.

слайд №14

Согласно методике в пробы вводили внутренний стандарт - пропанол-1, во всех трех пробах его концентрация составляла 0,05%. Результаты анализа и статистическая оценка погрешности определения приведены на следующих слайдах

слайды №15-16



№п/п	Компонент	Внесено, %	Найдено, %	СКО _{отн.%} выборки	Отклон. найдено- внесено, отн%
1.	Ацетон	0,050	0,0499	1,5655	-0,2654
		0,100	0,0985	1,2090	-1,4763
2	Метанол	0,050	0,0530	1,6552	6,0693
		0,100	0,0991	1,9955	-0,8779
3	Этанол	0,048	0,0473	1,1608	-1,4215
		0,096	0,0910	2,4732	-5,2366
4	Этанол+Т	0,096	0,0906	0,6245	-5,5982

При этом мы видим, что концентрация выявленных компонентов соответствует количеству, которое было внесено в модельные растворы.

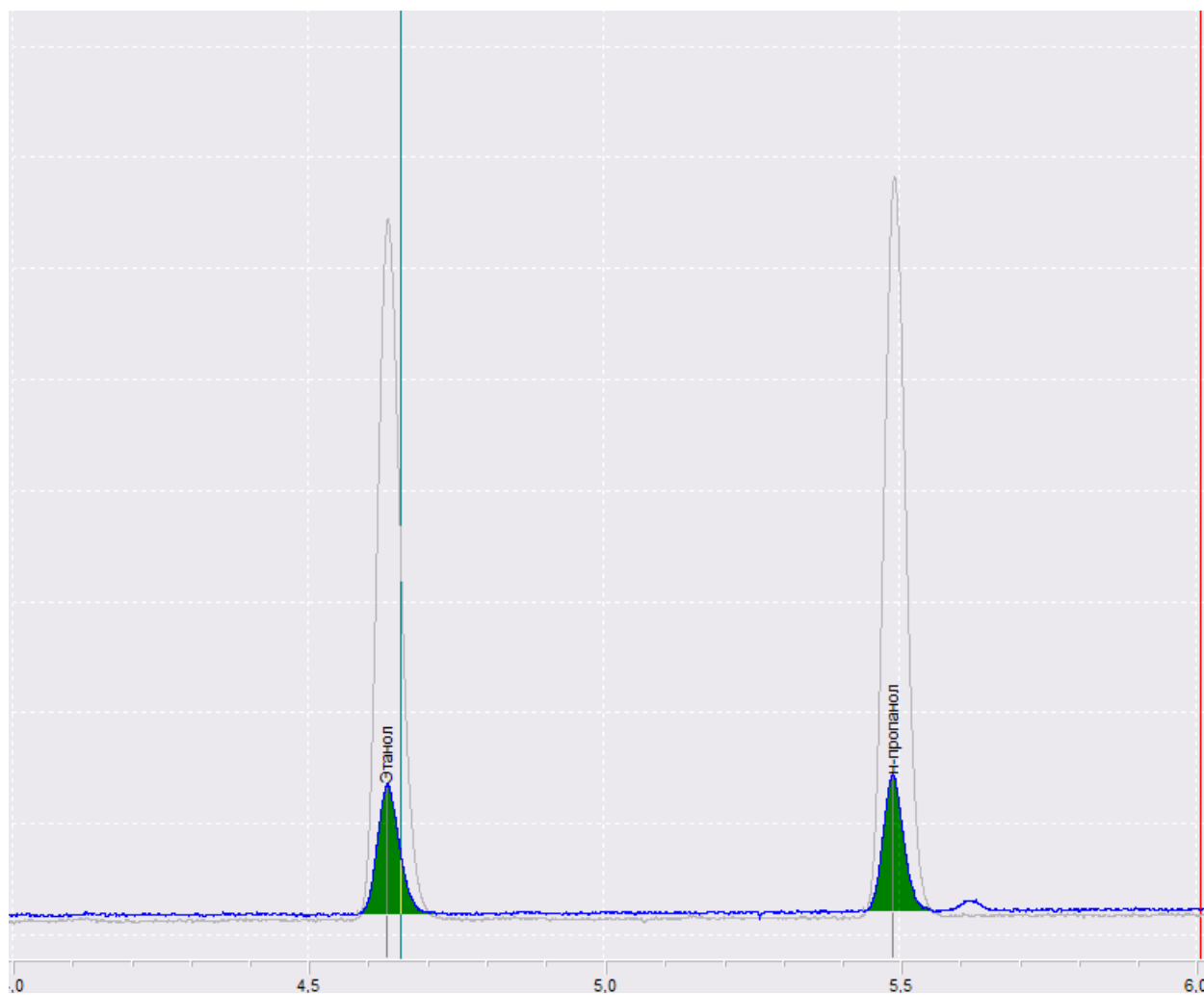
Из таблицы видно, что значения относительного стандартного квадратичного отклонения (СКО_{отн.}) при обсчете результатов по методу внутреннего стандарта, не превышали 2,5% при анализе методом парофазного ввода пробы без термостатирования, при этом максимальное значение (СКО_{отн.}) не должно превышать 5%.

Исследование влияния температуры окружающей среды на чувствительность анализа.

Исследование влияния температуры окружающей среды на результаты парофазного анализа проводили с использованием образцов мочи с введенным содержанием компонентов 0,1% об.

Пробы с одинаковым содержанием компонентов анализировали без термостатирования и с предварительным нагревом до 80⁰С. Виалу с пробой помещали в нагревательное устройство, выдерживали 10 мин и переносили в автоинжектор для анализа. Сравнивали площади пиков соответствующих компонентов при анализе без нагрева и с предварительным нагревом виалы с пробой. Результаты показали, что нагрев пробы позволяет увеличить чувствительность анализа без перегрузки колонки в 6-7 раз.

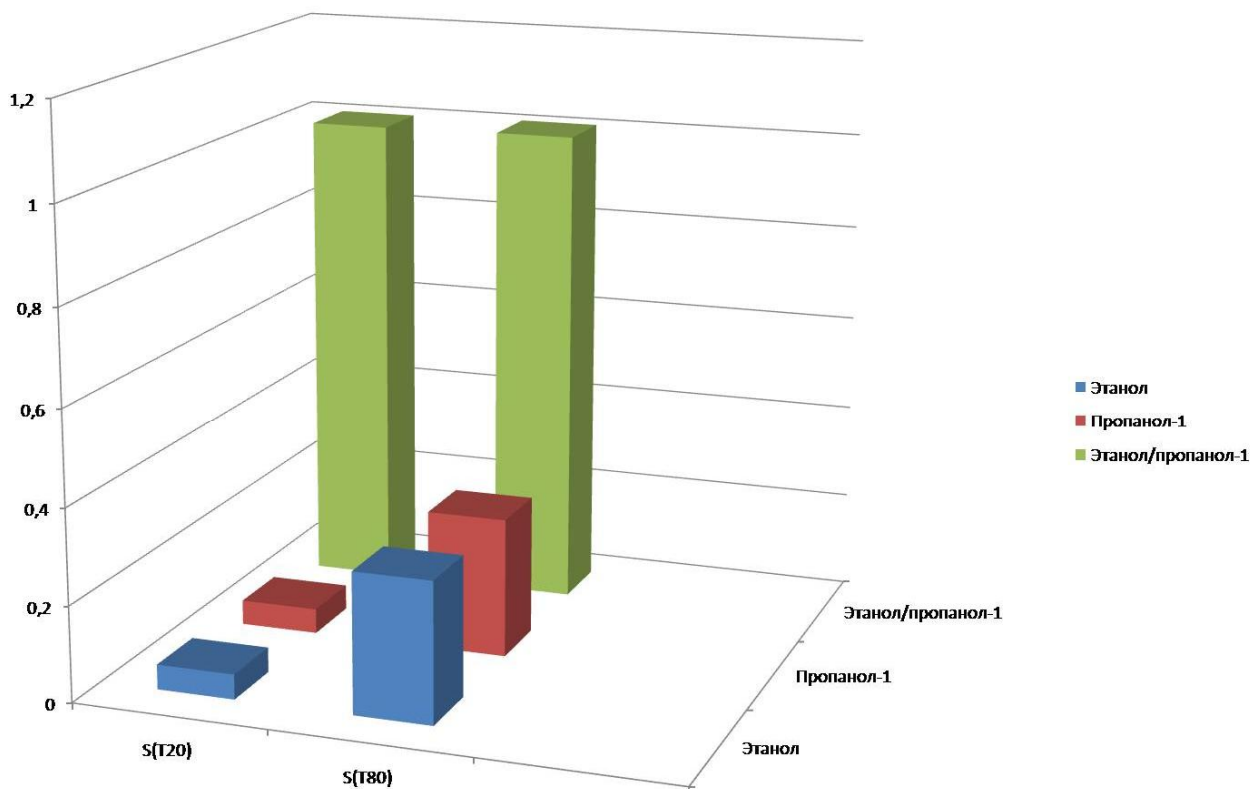
слайды 17-18



Этанол без и с термостатированием.

Компонент	S(T20)	S(T80)	S _{T80/T20}
-----------	--------	--------	----------------------

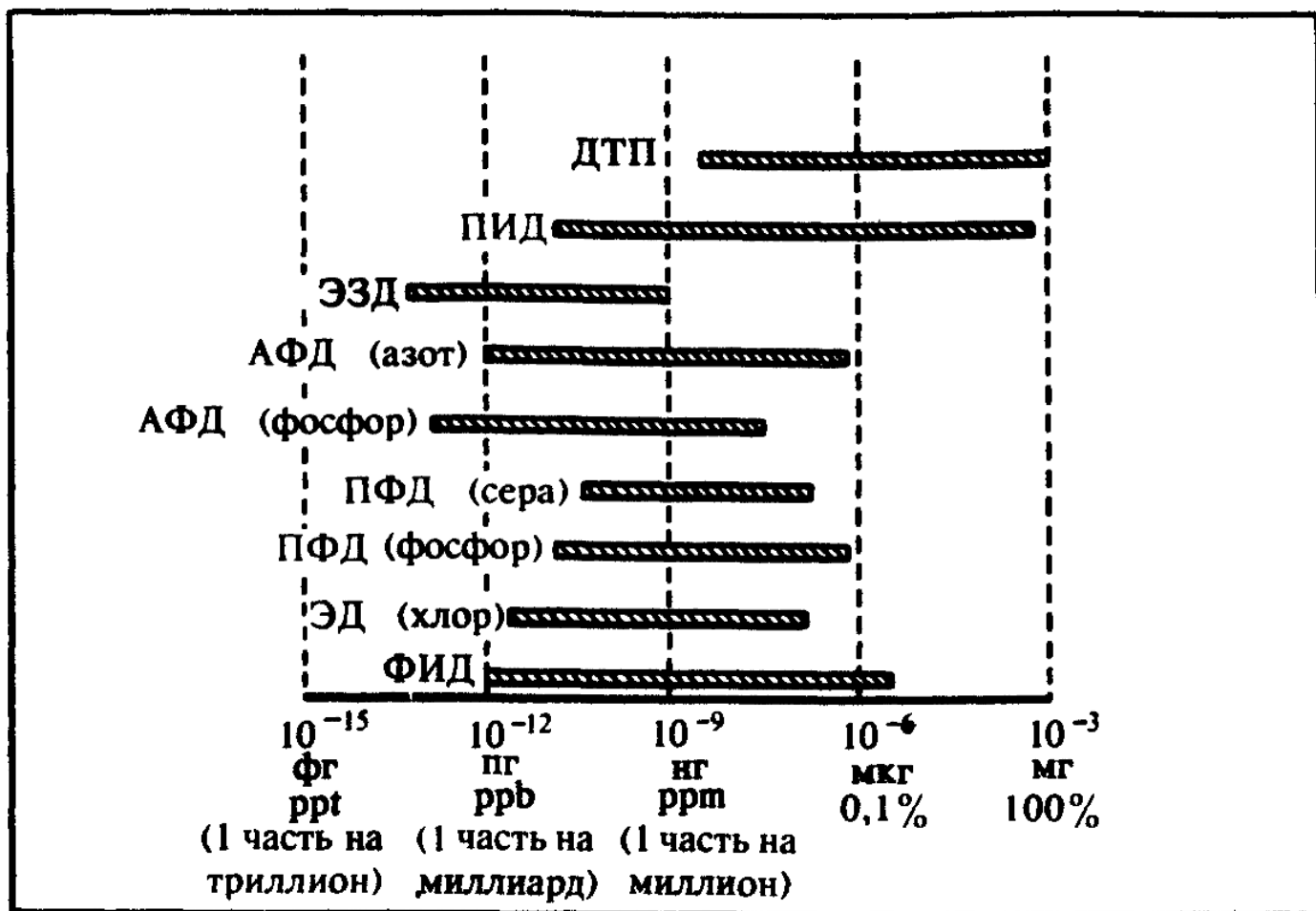
Этанол	0,0522	0,2940	5,65
Пропанол-1	0,0519	0,2913	5,61
Этанол/пропанол-1	1,0057	1,0092	



При этом соотношение пиков образец/стандарт не менялось. Однако, потери чувствительности варианта газовой экстракции без термостатирования успешно компенсировались чувствительностью используемого хроматографического детектора.

слайд 19

Однако при парофазном анализе с термостатированием пробы при последующих вколах наблюдали занижение концентрации анализируемого компонента. При анализе без термостатирования несколько последовательных вколов (до 10) не влияли на концентрацию определяемого компонента при использовании внутреннего стандарта.



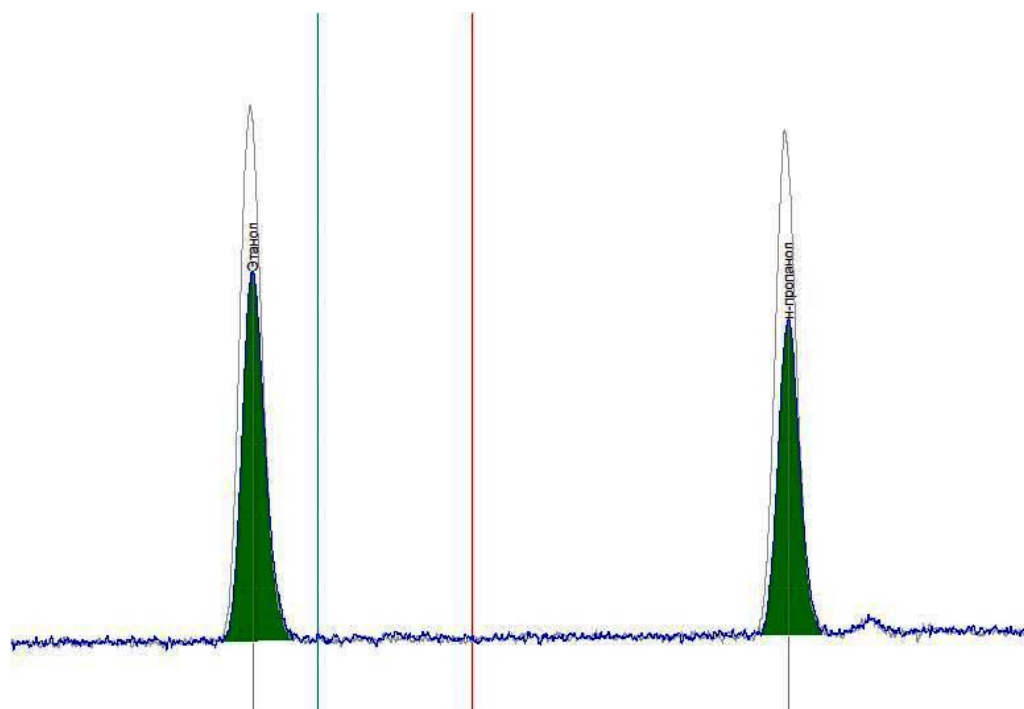
Влияние высаливающего агента

Чувствительность анализа парофазного анализа можно повысить добавлением в анализируемую пробу высаливающего агента. Высаливание - выделение определяемого вещества из раствора в другую фазу (газовую) путем введения в раствор другого вещества - высаливателя, как правило хорошо растворимого в фазе из которой проводят высаливание. В случае газовой экстракции имеет место высаливание веществ неэлектролитов под действием веществ электролитов из водных растворов к которым можно отнести и биологические жидкости. К наиболее часто используемым высаливающим агентам при анализе биологических объектов на летучие вещества можно отнести сульфаты аммония и натрия, хлорид натрия, хлорид аммония.

В нашем случае высаливание проводили хлоридом аммония.

Результаты показали, что высаливание данным агентом не приводит к существенному повышению чувствительности анализа.

слайд №20



Компонент	S_0 (исх.)	S_1 (высалив)	$S_{1/0}$
Этанол	0,0445	0,0658	1,45
Пропанол-1	0,0362	0,0571	1,56
Этанол/пропанол-1	1,2293	1,1524	

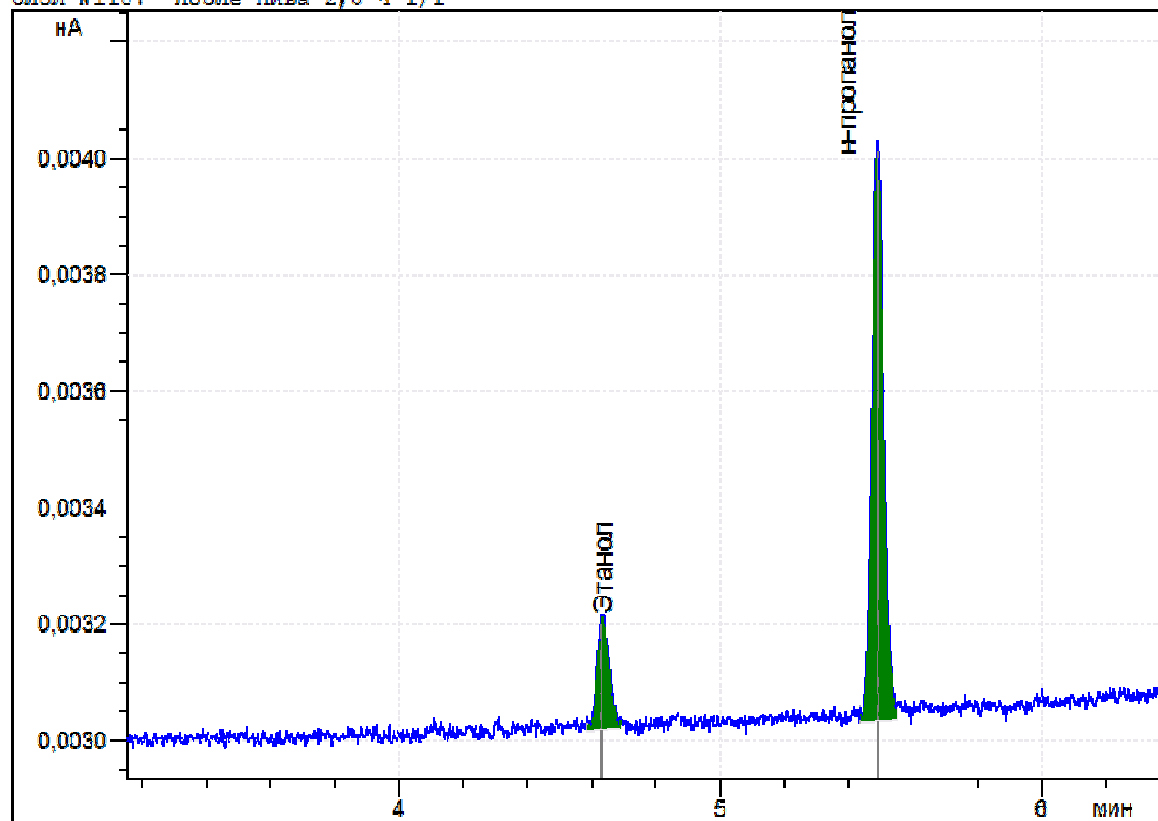
Также нами были проанализированы реальные биологические объекты, содержащие этанол.

Одним из примеров – хроматограмма парогазовой фазы мочи через 2,5 часа приема 0,5 л пива.

слайд №21

В результате установлено содержание алкоголя в моче на уровне 0,18‰.

Слой №118: "после пива 2,5 ч 1/1"

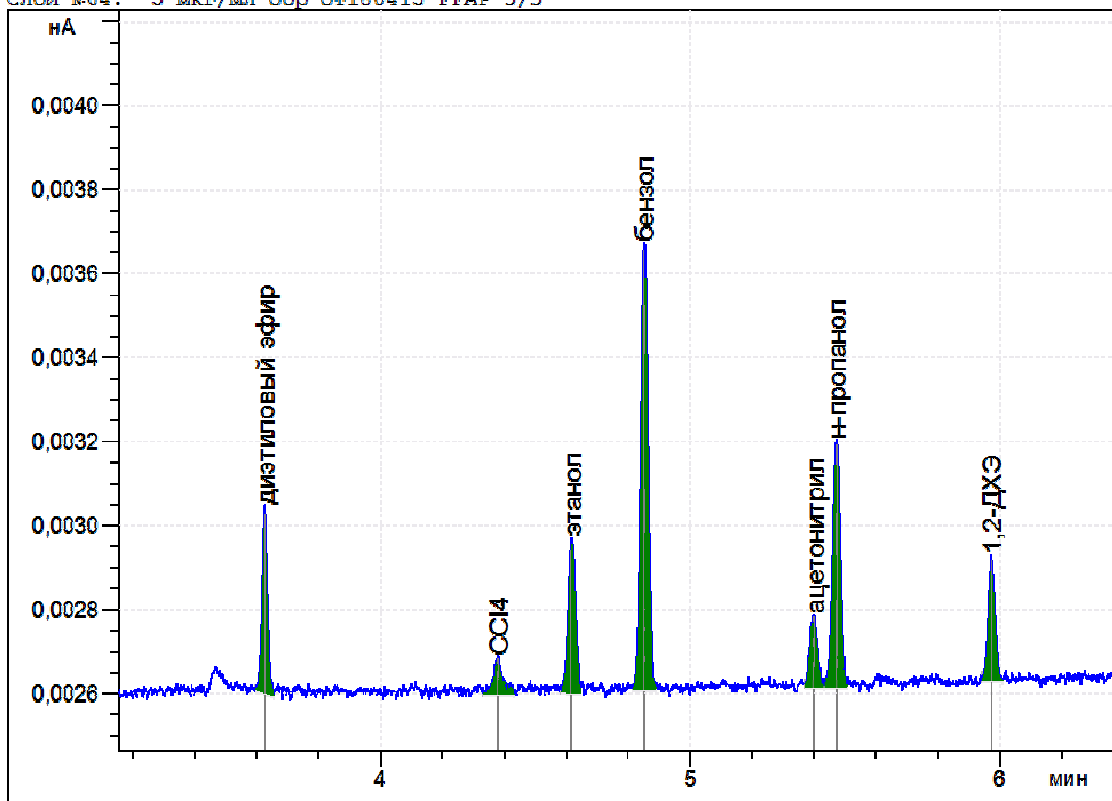


Кроме спиртов нами были определены и другие летучие компоненты из модельных растворов.

слайды №22-23.

Метрологические и другие характеристики по определению данных компонентов пока ещё анализируются. Результаты будут получены в ближайшее время.

Слой №64: "5 мкг/мл обр от180415 FFAP 3/3"



ВЫВОДЫ

Преимущества

1. Возможность диагностики не только факта употребления алкоголя, но и отравления летучими токсическими веществами, растворителями, антифризами, что необходимо в случаях, когда клиническая картина опьянения не соответствует низкому содержанию (или отсутствию) этанола.

2. Минимизация вероятности получения ложноположительных результатов за счет автоматизации процесса.

3. Повышенная воспроизводимость за счет отсутствия этапа предварительного получения алкилнитритных производных (отсутствует составляющая погрешности, связанная с неполнотой дериватизации).

4. Отсутствие необходимости работы с токсичными дериватирующими агентами.

5. Возможность унификации аналитической процедуры, создания общего банка аналитической информации, поскольку методика позволяет стандартизировать метод по условиям анализа и получать одинаковые времена (индексы) удерживания в каждой лаборатории.

6. Прямой парофазный метод незаменим для анализа слюны или капиллярной крови, когда лимитирующим фактором является количество образца.

Для возможности более полной оценки работы методики необходимо провести дальнейшую работу, в т.ч. и с участием специалистов существующих токсикологических лабораторий и на уровне межлабораторных тестирований.

Компания Неохром предоставляет современное оборудование в лабораториях, аттестованных по стандарту ISO 17025, г. Запорожье и г. Днепропетровске для тестирования и дальнейшего внедрения в судебно-медицинскую практику данной методики.

Кроме того, мы предлагаем оснащение ваших лабораторий нашим современным газохроматографическим оборудованием с гарантией 7 лет либо модернизацию вашего устаревшего оборудования до NeoCHROM, Class A.

(слайды модернизация)