

ЛЕКЦИЯ.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПИРТОВ.

В последние годы наблюдается значительный рост числа интоксикаций, обусловленных употреблением спиртных напитков и суррогатов алкоголя. Это связано с резким повышением уровня алкоголизации населения, ростом количества некачественных спиртных напитков и употреблением с целью опьянения технических спиртосодержащих жидкостей. Смертельные отравления алкоголем и его суррогатами прочно занимают первое место и почти в 3 раза превышают по количеству летальных исходов следующие за ними интоксикации наркотиками.

Из всех спиртов, имеющих токсикологическое значение, только этиловый подлежит обязательному количественному определению при химико-токсикологических исследованиях. Это обусловлено следующими причинами: чрезвычайно широкое распространение и особое токсикологическое значение этанола, возможность естественного образования этанола в организме при брожении и гниении сахаристых веществ в желудке, при бактериальном распаде белковых веществ, при метаболическом превращении высших спиртов.

Наиболее важными объектами для экспертизы служат кровь и моча, реже ткани мозга, легких, печени, почек, редко – глубокие мышцы бедра. Желудок не может быть взят в качестве объекта исследования, так как возможно образование спирта естественным путем при брожении углеводов или при гнилостных процессах его содержимого.

В судебно-химической практике для количественного определения этанола используют методы, основанные на окислении его до ацетальдегида и образовании сложного эфира с азотистой кислотой – этилнитрита. Известно много методов, в том числе химических, но в настоящее время наибольшее значение приобрели наиболее чувствительные и точные современные методы – биохимический и инструментальный (метод ГЖХ).

Метод биохимический (энзимный, ферментативный) был разработан в 1951 году Бюхером и Родецки и применяется, в основном, в зарубежных лабораториях. Метод основан на реакции окисления этанола до ацетальдегида под действием фермента алкогольдегидрогеназы (АДГ). Акцептором водорода в реакции служит дифосфопиридин-нуклеотид (ДПН), восстановленная форма которого обладает характерным поглощением при длине волны 366 нм. Измеряя оптическую плотность продукта реакции, можно рассчитать содержание этанола в исследуемом объекте, так как количество восстановленной формы ДПН, то есть его оптическая плотность, пропорциональны количеству этанола. Расчет ведут по калибровочному графику, построенному по растворам этанола с известной концентрацией.

Метод чувствителен (0,1-0,2%) на уровне естественного содержания этанола в организме, специфичен, позволяет проводить серийные анализы, однако требует специального оборудования и особо чистых ферментов (АДГ и ДПН), в связи с чем в нашей стране не нашел применения.

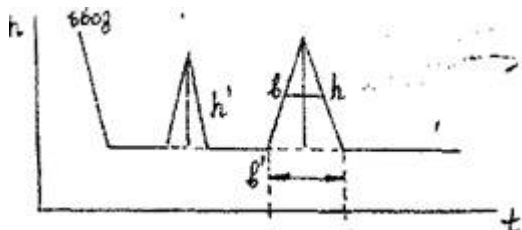
Метод газожидкостной хроматографии (ГЖХ) основан на переводе этанола в более летучее соединение – этиловый эфир азотистой кислоты (этилнитрит).

Теоретические основы метода ГЖХ изложены Мартином и Синджем в 1941 году, а для аналитических целей он предложен в 1952 году Мартином и Джеймсом. В химико-токсикологическом анализе метод применяется с 1968 года, когда он был предложен В.Ф. Пономаревым для определения одноатомных спиртов $C_1 - C_5$. В настоящее время эта методика расширена для определения алкилгалогенидов и других «летучих» ядов.

Газожидкостная хроматография является одним из видов распределительной хроматографии, где в качестве подвижной фазы используется газ, а неподвижной – жидкость, нанесенная в виде тонкой пленки на гранулы твердого носителя, которым заполняется колонка. Разделение компонентов смеси основано на различии коэффициентов

распределения этих компонентов между подвижной и неподвижной фазами, что приводит к различной скорости передвижения компонентов по колонке.

Графическим отображением процесса разделения является хроматограмма, представляющая собой ряд хроматографических пиков, каждый из которых соответствует одному из разделяемых веществ. На хроматограмме отмечают ввод пробы. Первый пик – это пик несорбируемого компонента (воздух, растворитель), последующие пики – пики анализируемых веществ. В первую очередь появляются пики веществ с малой сорбируемостью неподвижной жидкой фазой, то есть с малым коэффициентом распределения.



Достоинствами метода ГЖХ являются:

- ✓ Высокая разделяющая способность, что позволяет анализировать сложные многокомпонентные смеси. Это удобно в случаях комбинированных отравлений суррогатами алкоголя.
- ✓ Универсальность метода. Анализировать можно любые соединения при условии их летучести и термостабильности.
- ✓ Возможность качественного и количественного определения в одной пробе.
- ✓ Высокая чувствительность ($10^{-5} - 10^{-9}$ мг/мл, то есть на уровне естественного содержания этанола в организме).
- ✓ Возможность выполнения анализа в малом объеме образца (0,5-2 мл биожидкости).
- ✓ Точность метода (ошибка не превышает 1-2%).
- ✓ Экспрессность (время определения 3-5 минут) и возможность проведения, в связи с этим, серийных анализов.
- ✓ Простота и легкость выполнения.
- ✓ Доказательность и объективность. Результат в виде хроматограммы может быть приложен к акту судебно-химического исследования.

Количественное определение разделенных компонентов смеси проводится по высоте или площади хроматографических пиков. Высоту используют в случае узких и симметричных пиков, а площадь – когда пик широкий и асимметричный. Расчет ведут по калибровочному графику зависимости концентрации от высоты или площади пиков.

Возможны два варианта количественного определения: метод абсолютной калибровки и метод с использованием внутреннего стандарта. Более стабильные результаты дает метод внутреннего стандарта. При этом наряду с исследуемым веществом вводится вещество-стандарт в известном количестве, а при расчете учитывается соотношение высот (или площадей) соответствующих им пиков. Несмотря на колебания в работе прибора, соотношение высот пиков исследуемого вещества и внутреннего стандарта остается постоянным, что позволяет получать стабильные результаты.

Прибор для определения спиртов и других «летучих» ядов состоит из следующих блоков: баллон с газом-носителем (азот, гелий, аргон), устройство ввода пробы, хроматографическая колонка (разделение веществ), детектор (регистрация сигналов веществ), самописец (хроматограмма).

При судебно-химической оценке результатов определения этанола следует учитывать также падение количества алкоголя в крови за 1 час, составляющее 0,1-0,15‰, поскольку между моментом происшествия и моментом смерти проходит обычно некоторый период времени, в течение которого протекают процессы метаболизма и выделения спирта из организма.