

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РФ

Московская Медицинская Академия им. И.М.Сеченова

"Утверждаю"

Председатель Секции по наркологии
Ученого совета Минздрава РФ
член-корреспондент РАМН, профессор
Н.Н.Иванец

"23"



2003 г.

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

Пособие для врачей клинической лабораторной диагностики

М., 2003 г.

АННОТАЦИЯ

Цель настоящего пособия предоставить специалистам комплексную методику хроматографического и хромато-масс-спектрометрического анализа по определению алкоголя, некоторых летучих ядов и нелетучих низкомолекулярных токсичных веществ (компонентов антифризов) в биологических объектах и биологических жидкостях организма человека. Методика основана на новом принципе хроматографического определения летучих веществ - **Парофазном Анализе Без Термостатирования** анализируемых проб.

Пособие предназначено для врачей-наркологов, врачей клинической лабораторной диагностики, врачей судебно-медицинской экспертизы.

Пособие подготовлено в ММА им. Сеченова Минздрава РФ ст.н.с С.А.Савчуком, ст.н.с А.Н. Ведениным под руководством проф. Б.Н.Изотова

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время создается сеть лабораторий аналитической токсикологии, задачей которых является 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 все лаборатории должны иметь однотипное газо-хроматографическое и хромато-масс-спектрометрическое оборудование, что создает хорошие предпосылки для унификации методик анализа, создания общего банка аналитической информации, возможности оперативного обмена результатами анализа в виде компьютерных файлов для подтверждения правильности идентификации в базовой лаборатории. Планируется также постоянно обновлять методики выполнения измерений, которые региональные лаборатории будут получать в виде компьютерных файлов по электронной почте. На базе унифицированных методик будет разработан типовой курс обучения врачей клинической лабораторной диагностики и экспертов-химиков бюро судебно-медицинской экспертизы.

Предлагаемая к рассмотрению методика является первой из ряда методик, разрабатываемых для системы лабораторий аналитической токсикологии и наиболее полно учитывает

конкретные возможности аналитического оборудования. Это прежде всего метод **Фиксации Времен Удерживания (ФВУ)**, который позволяет унифицировать методики анализа, и новый вариант парофазного анализа - **Анализ Равновесной Паровой Фазы Без Термостатирования**, который позволяет получать результаты с повышенной воспроизводимостью и надежностью за счет минимизации вероятности получения ложноположительных результатов.

1. ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ МЕТОДА

ПОКАЗАНИЯ:

- диагностика факта употребления алкоголя и степени опьянения
- диагностика отравления летучими токсичными веществами, растворителями, антифризами

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ: отсутствуют

2. ОПИСАНИЕ МЕТОДА

Настоящая методика устанавливает газохроматографический метод с пламенно-ионизационным (ГХ-ДИП) и масс-селективным (ГХ-МС) обнаружением и количественным определением технических жидкостей (спиртов, компонентов летучих растворителей, антифризов, моторных топлив) в крови, моче, слюне, биологических объектах. Диагностика факта употребления алкоголя, алкогольного опьянения или отравления летучими токсичными веществами (растворителями) производится хроматографическим или хромато-масс-спектрометрическим методом путем анализа равновесной паровой фазы при температуре окружающей среды, диагностика отравлений нелетучими низкомолекулярными веществами (гликоли, компоненты антифризов) производится прямым вводом биожидкости в хроматограф после соответствующей пробоподготовки.

Метод газовой хроматографии основан на принципах разделения веществ на хроматографической колонке, внутренняя поверхность которой покрыта слоем неподвижной фазы - вязкотекучей жидкости. Процесс хроматографического разделения основан на различном сродстве веществ - компонентов пробы к неподвижной фазе. Компоненты анализируемой пробы перемещаются по колонке в потоке газа-носителя гелия или азота, аналитическим параметром является время выхода вещества из колонки (время хроматографического удерживания). При выходе из хроматографической колонки вещества (в виде узких зон) попадают

в детектирующую систему и формируют аналитический сигнал - хроматографический пик. В неселективном пламенно-ионизационном детекторе молекулы вещества сгорают в водородно-воздушном пламени, ионизируются, при этом повышается электрическая проводимость пламени, которая регистрируется как аналитический сигнал. В селективном квадрупольном масс-спектрометрическом детекторе (способном идентифицировать несколько веществ, элюирующихся одним хроматографическим пиком) молекулы вещества попадают в вакуумную камеру, ионизируются электронами с энергией 70 эВ. Образовавшиеся ионы фокусируются системой электромагнитных линз и направляются в анализатор - квадрупольный фильтр масс, где под действием электромагнитного поля происходит их разделение и регистрация по отношению массы к заряду (m/z). Набор ионов, образующихся при ионизации детектируемого вещества, регистрируется в виде масс-спектра - структурной характеристики присущей только этому веществу. По сравнению с УФ и ИК спектрами масс-спектр является наиболее характеристическим структурным параметром. Хромато-масс-спектрометрические приборы оснащаются библиотеками масс-спектров, содержащих до 500 тыс. масс-спектров. Идентификация компонентов исследуемой пробы может выполняться по совпадению библиотечного и полученного при анализе масс-спектра (обзорный анализ неизвестной пробы) или при совпадении масс-спектра и времени хроматографического удерживания определяемого вещества и вещества сравнения - компонента градуировочной смеси (направленный анализ). Масс-спектрометрическое детектирование выполняется в режиме полного сканирования (SCAN), при этом регистрируются масс-спектры, по которым проводится идентификация по библиотеке масс-спектров. Для более чувствительного анализа используют режим селективной регистрации по выбранным ионам (SIM, Селективный Ионный Мониторинг) при этом идентификация вещества выполняется по времени удерживания и отношению интенсивностей регистрируемых ионов.

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

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

В отличие от традиционного метода парофазного анализа, для которого используют статический парофазный пробоотборник (стоимость которого составляет до половины от стоимости хроматографа) с необходимостью термостатирования как флакона с исследуемой пробой, так и прогрева всех транспортных коммуникаций для предотвращения сорбции определяемых компонентов, для новой методики Анализа Равновесной Паровой Фазы Без Термостатирования используют стандартный автоинжектор, в котором обычный хроматографический шприц заменяют на газоплотный. Анализ проводят в стандартных флаконах вместимостью 2 мл. Флаконы укупоривают стандартными металлическими крышками с тефлонированной мембраной. Отсутствие системы коммуникаций (от пробоотборника к хроматографу) позволяет вводить пробу в инжектор хроматографа без потерь и получать улучшенные метрологические характеристики. Проверено, что методика анализа Равновесной Паровой Фазы Без Термостатирования работает воспроизводимо в температурном диапазоне помещения лаборатории от +15 до +35⁰ С. Сравнивали чувствительность определения методик анализа равновесной паровой фазы без термостатирования и анализа равновесной паровой фазы с термостатированием. При нагреве виалы с пробой до 80⁰С чувствительность определения (в варианте ГХ-ДИП) по этанолу и 1,2-дихлорэтану увеличивалась в 1,5 раза. Применение хромато-масс-спектрометрического детектирования в сочетании с методикой анализа Равновесной Паровой Фазы Без Термостатирования позволило повысить чувствительность определения по 1,2-дихлорэтану в 340 раз по сравнению с пламенно-ионизационным детектированием. Исследование влияния температурных факторов и оценка метрологических параметров методики анализа Равновесной Паровой Фазы Без Термостатирования даны в статье [1,2,3,4]. Традиционные методы парофазного пробоотбора и многокомпонентного хроматографического анализа описаны в работах [5-9], принципы метода фиксации времен удерживания в сочетании с приемами Образцовой Лабораторной Практики даны в работах [2,15-17].

2.1. ФОРМУЛА МЕТОДА

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

2.2. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МЕТОДА

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

2.2.2. Термины и определения

Газовая Экстракция [7] – извлечение газом летучих веществ из конденсированной фазы

Анализ Равновесной Паровой Фазы (Парофазный анализ, Head Space Analysis) [7] – 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[3] – Парофазный анализ при котором равновесная газовая фаза отбирается в газоплотный шприц при температуре окружающей среды и вводится в хроматограф в автоматическом режиме

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

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

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

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

то для системы конденсированная фаза-газ можно записать:

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

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

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

$$x_L^i \gamma_L^i$$

$$K^i = \frac{p^i}{x^i_G \gamma^i_G}$$

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

$$K^i = \frac{C^i_L}{C^i_G} = \sum a_{ij} \cdot C^j_L \quad (2)$$

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

$$K^i = \frac{x^i_L}{\gamma^i_L} \quad (3)$$

$$x_G^i$$

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

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

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

2.2.4. Влияние экспериментальных факторов на чувствительность и точность количественного парофазного анализа

2.2.4.1. Влияние температуры. Чувствительность и точность парофазного анализа лимитируются прежде всего процессом газовой экстракции, который имеет ряд особенностей. В первую очередь это газообразное состояние экстрагента. В отличие от гетерогенных систем, включающих только конденсированные фазы, константа распределения вещества между конденсированной и газовой фазами очень чувствительна к температуре. Установлено [7], что для большинства органических веществ изменение температуры на 10⁰С приводит к изменению значений коэффициента распределения на 3-8%. При анализе водных растворов повышение температуры на 60⁰С может привести к увеличению чувствительности в 10-20 раз [7]. Другой важный аспект влияния температуры заключается в термостатировании пробы, т.е. позволяет проводить анализ в стандартных условиях, что обеспечивает приемлемую погрешность

определения.

2.2.4.2. Влияние высаливающего агента[8,9].

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, а также хлорид натрия. Процесс высаливания малорастворимых неэлектролитов под действием электролитов при невысоких концентрациях высаливающего агента описывается эмпирическим уравнением Сеченова:

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

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

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

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

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

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

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

2.2.4.5. Метрологические характеристики определения летучих веществ методом Парофазного Анализа без Термостатирования[1]. Исследование проводили с использованием проб слюны с известным введенным содержанием определяемых компонентов: ацетона, метанола и этанола. Определяемые вещества вводили в пробы в концентрациях 0,02%, 0,05%, 0,1%. Согласно методике в пробы вводили внутренний стандарт - пропанол-1, во всех трех пробах его концентрация составляла 0,05%. Результаты анализа и статистическая оценка погрешности определения приведена в отчете GLP (см.приложение 2). Лимитирующей стадией, влияющей на погрешность определения случайная погрешность, связанная с вариацией объема парогазовой пробы, введенной в колонку. Из отчета GLP (см.приложение 2). видно, что значения относительного стандартного квадратичного отклонения ($СКО_{отн}$) при обсчете результатов по методу внутреннего стандарта, не превышали 1,6% при анализе методом парофазного ввода пробы без термостатирования, при этом максимальное значение ($СКО_{отн}$) не должно превышать 5%.

2.2.4.6. Исследование влияния температуры окружающей среды на правильность определения[1]. Исследование влияния температуры окружающей среды на результаты парофазного анализа проводили с использованием образцов мочи с введенным

содержанием компонентов 0,05% об. (см. табл. 3).

Виалы с пробой выдерживали 30 мин при различной температуре: +5⁰С (выдерживали в холодильнике), +15⁰С (в химическом стакане с проточной водопроводной водой), +21⁰С (в помещении лаборатории). Температуру контролировали термометрами, которые помещали в те же условия, что и пробу. Результаты исследований показали, что в диапазоне температур от +5⁰С до +21⁰С погрешность анализа не превышает 1,6-5%.

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

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

2.2.4.7. Исследование влияния температуры пробы на чувствительность анализа[1]. Исследование влияния температуры окружающей среды чувствительность анализа проводили с использованием образцов мочи с введенным содержанием компонентов 0,05% об. (см. табл. 3). Пробы с одинаковым содержанием компонентов анализировали без Термостатирования и с предварительным нагревом до 80⁰С. Виалу с пробой помещали в нагревательное устройство, выдерживали 15 мин и переносили в автоинжектор для анализа. Сравнивали площади пиков соответствующих компонентов при анализе без нагрева и с предварительным нагревом виалы с пробой. Результаты показали, что нагрев пробы позволяет увеличить чувствительность анализа без перегрузки колонки в 8-10 раз. Однако, потери чувствительности варианта газовой экстракции без термостатирования успешно компенсировались чувствительностью используемых хроматографических детекторов. В случаях реальных исследований были получены сопоставимые результаты по идентификации 1,2-дихлорэтана, ацетона, толуола, метилэтил и метилпропилкетонов в крови и моче токсикологических больных при сравнительном ГХ-

ДИП анализе с использованием статического парофазного пробоотборника (с нагревом пробы до 80⁰С) в сравнении с отбором пробы газоплотным шприцем без термостатирования. При использовании масс-спектрометрического детектора чувствительность метода парофазного анализа без термостатирования пробы, оцененная по 1,2-дихлорэтану, увеличивается в 350 раз.

3. МЕТОД АНАЛИЗА

3.1.Сущность метода. Пробу биологической жидкости с введенным внутренним стандартом помещают в стеклянную виалу(флакон), плотно укупоривают крышкой с полимерной мембраной. Анализу подвергают воздушно-паровую фазу из газового пространства ампулы над поверхностью пробы. Отбор равновесной паровой фазы производят путем прокалывания шприцем полимерной мембраны (используют газоплотный хроматографический шприц с тефлоновым уплотнением поршня). Отбор пробы проводят при комнатной температуре (в диапазоне температур от +15 до 35⁰ С) в автоматическом режиме. Паро-газовую пробу анализируют методом хроматографии с пламенно-ионизационным (ГХ-ДИП) или масс-селективным (ГХ-МСД) детектированием и определяют вещества перечисленные в табл.1 и 2.

При выбранных условиях анализа можно также проводить анализ мочи прямым вводом жидкой фракции (после центрифугирования) в испаритель хроматографа. При этом определяют малолетучие компоненты, перечисленных в табл.1 приложения.

В методе ГХ-ДИП обнаружение компонентов технических жидкостей выполняют по временам удерживания стандартных соединений перечисленных в табл. 1, 2 и табл.1 приложения. Для количественного анализа в методе ГХ-ДИП применяют градуировочные смеси, которые готовят согласно п.4.1.

Обнаружение компонентов технических жидкостей в методе ГХ-МСД выполняют по масс-спектрам и временам удерживания компонентов градуировочных смесей, которые готовят согласно п. 4.1. Если в пробе обнаруживают соединения не включенные в перечень определяемых см. таб. 1. 2 и табл.1 приложения, для идентификации используют стандартные библиотеки масс-спектров Pflieger, NIST, Wiley.

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

Многокомпонентный газохроматографический и хромато-масс-спектрометрический анализ биожидкостей методами парофазного анализа и прямого ввода пробы проводят на колонке HP-FFAP см. п. 3.2.1., перечень определяемых веществ приведен в табл.1 и табл.1 Приложения.

Экспрессное газохроматографическое определение (время анализа 2,2-5,5 мин) спиртов и некоторых сопутствующих соединений выполняют на укороченной колонке HP-B ALC см. п. 3.2.2., перечень определяемых веществ приведен в табл.2.

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

Погрешность ($СКО_{отн.}$) определения методики Анализа Равновесной Паровой Фазы Без Термостатирования 0,4%.

3.1.1.МАТЕРИАЛЬНО-ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ МЕТОДА

Нормативные ссылки

1.	ГОСТ Р 8.563-96	Методики выполнения измерений
2.	ГОСТ 12.1.005-88 ССБТ.	Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны
3.	ГОСТ 12.1.019-79 ССБТ.	Электробезопасность. Общие требования к номенклатуре видов защиты

4.	ГОСТ 3022-80	Водород технический. Технические условия
5.	ГОСТ 6709-72	Вода дистиллированная. Технические условия
6.	ГОСТ 9293-74	
7.	Азот газообразный и жидкий	Технические условия
8.	ГОСТ 17433-80	Промышленная чистота. Сжатый воздух. Классы загрязненности
9.	ГОСТ 24104-88	Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия
10.	ГОСТ 25366-82	Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры
11.	ГОСТ 24898-90	Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний
12.	ГОСТ 29227-91	Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования
13.	Министерство здравоохранения СССР. Химико-токсикологический анализ веществ, вызывающих одурманивание. Методические указания. Москва - 1989 г.	
14.	Еремин С.К., Изотов Б.Н., Веселовская Н.В. Анализ наркотических средств. М.Мысль 1993.	

Аппаратура, материалы и реактивы. Газовые хроматографы Agilent 6890N или Agilent 6850 с автоинжектором Agilent 7683, позволяющим регулировать погружения иглы хроматографического шприца в виалу. Хроматографы снабжены пламенно-ионизационным детектором или масс-селективным детектором Agilent 5973N и колонками HP-FFAP (19091F-115) 50м;0.32мм;0.50мкм (для ГХ-ДИП) и HP-FFAP (19091F-115E)50м;0.2мм;0.3мкм (для ГХ-МС), и программой ФВУ для контроля и фиксации времен удерживания. **(регистрационное удостоверение МЗ РФ №.....)**

Для экспрессного определения алкоголя в биологических

жидкостях (крови, моче, слюне) применяют капиллярную колонку HP-B ALC (19091S-510) 7м;0,32мм;20 мкм.

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

Азот сжатый в баллоне по ГОСТ 9293 или азот особой чистоты по ГОСТ 9293.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709

Ацетон ч.д.а.

Метанол ч.д.а.

Изопропанол ч.д.а.

Этанол ч.д.а.

Пропанол ч.д.а.

Хлороформ, ч.д.а.

Четыреххлористый углерод ч.д.а.

Хлористый бутил ч.д.а.

1,2-Дихлорэтан ч.д.а.

Изопропанол, ч.д.а.

Ацетонитрил для ВЭЖХ, ч.д.а.

Бензол ч.д.а.

Толуол ч.д.а.

о-Ксилол ч.д.а.

р-Ксилол ч.д.а.

Анилин ч.д.а.

Диметиланилин ч.д.а.

Моноэтиловый эфир этиленгликоля ч.д.а.

Диметиловый эфирэтиленгликоля ч.д.а.

Бутилцеллозольв ч.д.а.

1,4-Диоксан ч.д.а.

Диэтиловый эфир ч.д.а.

Диизопропиловый эфир ч.д.а.

Гексан ч.д.а.

Гептан ч.д.а.

Ацетонитрил ч.д.а.

Автоматические пипетки вместимостью 200-1000 мкл

Микрошприцы хроматографические вместимостью 10 мкл
Hamilton.

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

Пробирка с притертой пробкой вместимостью 15 мл

Виалы стеклянные с пластмассовой завинчивающейся пробкой

(или с металлической пробкой, уплотняемой обжатием в кримпере) и тефлонированной полимерной мембраной вместимостью 2 мл типа Agilent Technologies 518207-14

Картриджи или патроны для твердофазной экстракции AccuBond II SFE, Agilent Technologies p/n188-29 20 с октадецильными группами.

Химическая посуда общего назначения
Весы аналитические 2 класса точности

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

3.1.2. УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ МЕТОДА

3.1.2.1. Требования к рабочему месту

Исследование биологических жидкостей на наличие алкоголя и летучих веществ проводят в условиях химической лаборатории, оснащенной вытяжной вентиляцией. 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.

3.1.2.2. Требования к врачу клинической лабораторной диагностики. Врач клинической лабораторной диагностики проводящий исследования должен пройти курс обучения по методу газохроматографического анализа, иметь навыки по настройке, градуировке и обслуживанию прибора (в объеме операторского тренинга), а также уметь оценить правильность получаемых результатов (выявлять ложноположительные и ложноотрицательные результаты). Все работы по подготовке и анализу пробы должны проводиться в защитных перчатках и халате.

При выполнении измерений с использованием указанного выше оборудования следует соблюдать правила электробезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.019 и инструкциями по эксплуатации приборов.

При выполнении измерений с использованием газовых хроматографов и хромато-масс-спектрометров, следует соблюдать утвержденные Госгортехнадзором СССР “Правила устройства и безопасной эксплуатации сосудов, работающих под давлением” от 27.11.87.

При работе с чистыми веществами и растворителями следует

выполнять требования безопасности, установленные для работ с токсичными, едкими и легковоспламеняющимися веществами по ГОСТ 12.1.005.

3.1.2.3. Требования к тестируемому

Основным требованием к испытываемому является требование отсутствия фальсификации биологической пробы.

3.1.2.4. Отбор и хранение проб

Отбор проб биологических жидкостей производится согласно действующим методическим указаниям (см. п. Нормативные ссылки. [12,13]). 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.

4. ПОДГОТОВКА К ИЗМЕРЕНИЯМ

4.1. 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 и перечисленных в табл.1,2 и табл.1 приложения градуировку проводят водными или водноспиртовыми растворами веществ, концентрация которых выражена в мкг/мл. Результаты определения также выдаются в мкг/мл.

4.1.1. 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.

4.1.1.2. Пропанол-1 может быть использован как внутренний стандарт в методе Фиксации Времени Удерживания (ФВУ) для соединений перечисленных в табл.1 и 2.

4.1.2. 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.

4.1.3. Циклогексанол может быть использован как внутренний стандарт в методе Фиксации Времени Удерживания (ФВУ) для соединений близких по летучести этиленгликолю и диэтиленгликолю и перечисленных в табл.1 Приложения.

4.2. Приготовление градуировочных растворов (смесей)

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

Приготовление раствора А. В мерную колбу (1 класса

точности) вместимостью 100 мл вносят 50 мл дистиллированной воды, по 1мл 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; 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, 5,10,100 и 200 мкл раствора А, при этом концентрация определяемых веществ составит 0,02; 0,05; 0,1; 1,0;2,0 % об., соответственно.

К каждому градуировочному добавляют 5 мкл внутреннего стандарта пропанола-1 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.

4.2.2. Приготовление градуировочных растворов (хлорорганических соединений, ароматических летучих веществ, этиленгликоля, диэтиленгликоля, а также других веществ перечисленных в табл. 1 и 2 и табл.1 приложения (кроме перечисленных в п. 4.2.1.)

4.2.2.1. 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.

4.2.2.2. Приготовление градуировочных растворов концентрациями 50 мкг/мл

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.

4.2.2.3. 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.

Для анализа отбирают 1 мл растворов приготовленных согласно п.4.2.2.1-4.2.2.3, вводят 5 мкл раствора внутреннего стандарта пропанола-1, приготовленного согласно п. 4.1.1 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.4.1.2 при определении этиленгликоля, диэтиленгликоля и веществ близких им по летучести представленных в табл.1 приложения. Концентрация ВС циклогексанола в градуировочной смеси составляет 2,8 мкг/мл.

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

5. ПРОВЕДЕНИЕ ИЗМЕРЕНИЙ

5.1. Хроматографическую систему включают и настраивают в соответствии с инструкцией по эксплуатации и устанавливают параметры хроматографирования и масс-спектрометрического детектирования.

5.2. Подготовка проб к анализу.

При проведении анализа непосредственно после отбора пробы, анализируют аликвотный объем пробы А. Поскольку алкоголь и летучие соединения определяют методом парофазного анализа при комнатной температуре температура в помещении лаборатории должна быть в пределах от +15⁰С до +35⁰С. При повторном анализе в случае когда проба заморожена, проводят размораживание пробы (до полного исчезновения кристаллов льда) при комнатной

температуре или помещая емкость с пробой в воду температурой от +15⁰С до +35⁰С. После размораживания и отбора аликвоты пробу выдерживают при температуре помещения лаборатории в течение 3 мин.

5.2.1. Отбор аликвот проб крови, мочи и слюны и ввод внутреннего стандарта. Пробы крови, мочи и слюны отбирают и хранят согласно п.3.1. Аликвотные объемы мочи и слюны отбирают из пробы А (или Б при повторном анализе) автоматической пипеткой с разовым наконечником. Для парофазного анализа отбирают 1 мл мочи или слюны. К каждой пробе добавляют 5 мкл водного раствора внутреннего стандарта (ВС) пропанола-1, приготовленного по п.4.1.1.1 и подвергают ГХ-ДИП или ГХ-МС анализу и определяют вещества перечисленные в табл.1 и 2. Концентрация ВС пропанола-1 в пробе составляет 0,05% об.

5.2.2. Отбор проб мочи для определения малолетучих соединений (гликолей) и ввод внутреннего стандарта.

Малолетучие соединения этиленгликоль, диэтиленгликоль и близкие им по летучести, перечисленные в табл.1 приложения, анализируют прямым вводом биожидкости в хроматограф. Мочу предварительно центрифугируют, для анализа отбирают надосадочный слой пробы. Для проведения обзорного анализа отбирают аликвотный объем мочи 800 мкл. К 800 мкл мочи добавляют 3 мкл водноэтанольного 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 прямом вводе мочи в хроматограф этанол количественно не определяется.

При направленном анализе на этиленгликоль и диэтиленгликоль после центрифугирования 3 мл мочи пропускают через патрон для твердофазной экстракции Evidex SPE C₁₈, который выполняет роль фильтра. Патрон предварительно активируют пропусканием 3 мл метанола и 10 мл дистиллированной воды. Для анализа используют мочу пропущенную через патрон, который задерживает компоненты мочи органической и неорганической природы отрицательно влияющие на время жизни колонки. Этиленгликоль и диэтиленгликоль на патроне для твердофазной экстракции не сорбируются. Для анализа отбирают 800 мкл мочи пропущенной через патрон для твердофазной экстракции, вводят внутренний стандарт циклогексанол, добавляют 200 мкл этанола и анализируют прямым вводом в хроматограф.

Примечание: вещества, сорбированные на патроне можно элюировать метанолом после предварительной промывки патрона

дистиллированной водой и анализировать элюат на наличие наркотических или сильнодействующих веществ.

5.3. Условия хроматографического анализа.

5.3.1. Условия хроматографического анализа для колонки HP-FFAP

Температура термостата колонок 60°C (5мин.), 10°C/мин, 190°C (25мин.). Анализ в режиме постоянного давления газа-носителя (Constant Pressure). В качестве газа носителя в методе ГХ-МСД используют гелий, расход газа носителя при 60°C - 1 мл/мин, линейная скорость газа-носителя 28,3-34,0 см/с. Для ГХ-ДИП анализа используют газ-носитель азот, расход газа носителя при 60°C - 1 мл/мин, линейная скорость газа-носителя 19,8-22,2 см/с.

Температура испарителя хроматографа составляет 180°C
Температура пламенно-ионизационного детектора 210°C. Ввод пробы осуществляют в режиме с делением потока (split) 1/3 для парофазного анализа и при делении потока 1/15 при прямом вводе пробы.

Объем вводимой пробы при парофазном анализе 50 мкл, при вводе в хроматограф жидкой пробы ее объем составляет 1 мкл.

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

Времена удерживания определяемых соединений для колонки HP-FFAP 50м;0.32мм;0.50мкм (газ-носитель азот) представленные в табл.1 и 2 получают по методу Фиксации Времен Удерживания (ФВУ). Калибровку по давлению газа-носителя в методе ФВУ выполняют согласно инструкции, прилагаемой к приборам по внутренним стандартам: пропанолу-1 (вещества см. табл.1) и по циклогексанолу (вещества см. табл.1 приложения), времена удерживания которых в выбранных условиях хроматографирования составляют 6.318 мин (пропанол-1) и 12.380 (циклогексанол).

Градуировку приборов для проведения количественного анализа и выполняют по методу внутреннего стандарта согласно инструкции к прибору. Для градуировки используют смеси веществ, приготовленные по п.4.

5.3.1. Условия хроматографического (ГХ-ДИП) анализа для колонки HP-B ALC

Температура термостата колонок 120°C (1мин.), 25°C/мин, 165°C

(1 мин.). Анализ в режиме постоянного давления газа-носителя (Constant Pressure). Газ-носитель – азот, давление которого составляет 7.62 p.s.i., скорость потока при 120°C составляет 3 мл/мин. Температура испарителя хроматографа 180°C, температура пламенно-ионизационного детектора 250°C при расходе поддувочного газа (азот) 20 мл/мин. Расход воздуха и водорода для питания пламенно-ионизационного детектора 300мл/мин и 30 мл/мин, соответственно. Ввод пробы осуществляют в режиме с делением потока (split) 1/10 для парофазного анализа. Объем вводимой пробы при парофазном анализе 50 мкл.

При направленном определении этанола, метанола, изопропанола и ацетона в крови, моче или слюне время анализа составляет 3.8 мин. После каждых 50 анализов необходимо кондиционировать прибор в течение часа при температуре термостата колонок 270°C.

Времена удерживания определяемых соединений для колонки **HP-B ALC**, представленные в табл.2, получают по методу Фиксации Времен Удерживания (**ФВУ**). Калибровку по давлению газа-носителя в методе **ФВУ** выполняют согласно инструкции, прилагаемой к приборам по внутреннему стандарту - пропанолу-1, времена удерживания которого в выбранных условиях хроматографирования составляют 2.137 мин. Градуировку приборов для проведения количественного анализа и выполняют по методу внутреннего стандарта согласно инструкции к прибору. Для градуировки используют смеси веществ, приготовленные по п.4.

5.4. Условия масс-спектрометрического детектирования.

5.4.1. Анализ в режиме сканирования по полному ионному току (SCAN)

Температура аналитического интерфейса (хроматограф/масс-спектрометр) 180°C.

Температура источника ионов 230°C

Температура квадрупольного фильтра масс 150°C

Диапазон масс m/z 29-300 а.е.м.

Напряжение на умножителе: результат, полученный при автоматической настройки по перфторбутиламину в режим LOWMASSTUNE.

Температура интерфейса масс-спектрометра 180° С (для колонки HP-FFAP)

5.4.2. Анализ в режиме мониторинга по выбранным ионам (SIM)

Характеристичные ионы (не менее трех) для определяемых веществ представлены в табл.1.приложения 1. В качестве характеристичных могут быть выбраны базовый ион масс-спектра и молекулярный ион определяемого соединения. При отсутствии в масс-спектре интенсивного молекулярного иона в качестве дополнительного к базовому для селективного мониторинга выбирают фрагментарный ион наибольшей интенсивности, который выполняет роль подтверждающего.

6. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

6.1. Оперативный контроль качества измерений. Перед анализом исследуемых проб анализируют образец биожидкости с введенным известным содержанием целевых определяемых компонентов. Содержание компонентов выбирают как утроенную предельно определяемую концентрацию. ПРО (пределы определения) целевых компонентов приведены в табл.1 и 2. После анализа образцов биожидкостей с введенным содержанием определяемых веществ анализируют биологическую жидкость заведомо не содержащую целевых компонентов. Анализ контрольных положительных и отрицательных проб позволяет оценить чувствительность и селективность аналитической системы и отсутствие ложноположительных результатов, связанных с перекрестными загрязнениями при подготовке пробы или химической "памятью" системы от предыдущих вводов. Результаты анализа контрольных положительных и отрицательных проб документируются и хранятся в архиве вместе с результатами анализа исследуемых проб. Даты анализа контрольных и исследуемых проб должны совпадать. Анализ контрольных проб проводится ежедневно перед началом анализа исследуемых образцов. При необходимости результаты контрольных анализов представляют вместе с результатами экспертизы в судебные или иные контролирующие органы для подтверждения надежности и правильности результатов экспертизы.

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

Погрешность определения для метода ГХ-МСД не должна превышать 10% и 5% на уровне определяемых концентраций 0,005-

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

Результаты измерения относительного стандартного квадратичного отклонения ($СКО_{отн.}$) результатов сравнительного газохроматографического (ГХ-ПИД) определения летучих веществ в слюне на колонках HP-Blood Alc. HP-FFAP методом анализа равновесной паровой фазы при комнатной температуре и автоматическом вводе пробы дано в табл.3.

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

Таблица 1.

	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.	Диметилвый 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 (ВС 1)	6.320	70 мкг/мл (0,007%)	Внутренний стандарт(ВС) 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.	Стирол	10.373	0,25	

25	Диметил формамид	11.703	2,0	Прямой ввод
26	Циклогексанол (ВС 2)	12.382	2,5	ВС для анализа методом прямого ввода
27	3,5-Диметилпиридин	12.842	2,5	
28	Диметилсульфоксид	15.165	2,0	Прямой ввод
29	Анилин	17.04	2,0	Прямой ввод

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Савчук С.А., Веденин А.Н., Изотов Б.Н. Обнаружение летучих токсичных веществ в биологических жидкостях организма методом газовой хроматографии и хромато-масс-спектрометрии//Наркология 2002 №3 с.37-45.
2. Савчук С.А., Веденин А.Н. Применение программы фиксации времен удерживания при хромато-масс-спектрометрическом определении анализируемых веществ //Рос.хим.ж.(Ж.хим.общества им.Д.И.Менделеева),2003,т.XLVII,№1, с.141
3. J.D. Ramsey, R.J.Flanagan Detection and identification of volatile organic compounds in blood by head space gas chromatography as an aid to the diagnosis of solvent abuse//J. of Chromatograph.1982, V. 240, p.423-444
4. D.R.Gere, R.Trengove, A.Gray Fast gas chromatography separation and detection of blood alcohol compounds for forensic methods// Agilent Technologies application 1999P/N 5968-759E
5. Витенберг А.Г., Иоффе Б.В. Газовая экстракция в хроматографическом анализе. Ленинград, Химия, 1982, 279 с.
6. Хахенберг Х. Шмидт А., Газохроматографический анализ равновесной паровой фазы. Москва, Мир,1979, 160 с.
7. Витенберг А.Г. Статический парофазный газохроматографический анализ. Физико-химические основы и области применения..Рос.хим.ж.(Ж.хим.общества им.Д.И.Менделеева),2003,т.XLVII,№1, с.7-22
8. Михайлов В.А. Журнал физической химии 1962 №2 с.306-313
9. Михайлов В.А. Высаливание - всаливание веществ изх растворов Каунас 1970 г.
10. J.P.Franke, J.Wijsbeek, R.A.de Zeeuw, M.R.Moller, H.Niermeyer Systematic analysis of solvents and other volatile substances by gas chromatography// J.of Analytical Toxicology, 1988, Vol.12, January/February, p.20-24
11. Химико-токсикологический анализ веществ, вызывающих

одурманивание. Министерство здравоохранения СССР, Москва
1989 г., 122 с.

12. Газохроматографический анализ алкоголя в крови с
использованием метода парофазного пробоотбора при комнатной
температуре Department of Justice Forensic Services Lab (Sacramento,
CA) Agilent Technologies application

13. Савчук С.А., Бродский Е.С., Формановский
А.А. **Газохроматографическое и хромато-масс-
спектрометрическое определение гликолей в питьевой воде и
спиртных напитках** // Журн. Аналит. Химии. 1999. Т.54. №8. С.836

14. Савчук С.А., Власов В.Н., Апполонова С.А., Арбузов В.Н.,
Веденин А.Н., Мезинов А.Б., Григорьян Б.Р. Применение
хроматографии и спектрометрии для идентификации подлинности
спиртных напитков Журн.. Аналитической химии, 2001, т. 56, № 3,
с. 246-264

15. A.Reese, H.Prest Retention time locked GC-MS analysis of
phenols//Agilent Technologies application, September 28, 2001, 5988-
3934EN

16. C.Kai Meng Identification and Quantitation of Pesticides in the parts-
per-trillion range using retention time locking and GC/MS. Agilent
Technologies application, November 14,2001, 5988-4392EN

17. Ludwig Huber Good Laboratory practice and current good
manufacturing practice. Agilent Technologies Deutschland GmbH,
Hewlett-Packard-Strasse 8, 76337 Waldbornn, Germany 03/00,
Publication No 5968-6193E p.116

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Компоненты технических жидкостей определяемые в моче методом прямого ввода
Таблица 1

Условия метода ГХ-ДИП-ФВУ

Колонка HPFFAP 25 м x 0,32мм; 0,52 мм.

Программа 45 С(2 мин); 10град/мин;190 С

внутренний стандарт - циклогексанол, RT 11.52 мин газ-носитель азот , анализ в режиме Постоянного Давления (Constiant Pressure) 6,0p.s.i.

	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-ДИП)
1.	Ацетальдегид	44,0	1.96	44(81),29(100)	2,7
2.	Диметилацеталь формальдегида	76	2.09	75(44),45(100)	2,8
3.	Метилформиат	60	2.23	61(100),60(75),45(47)	
4.	Ацетон	58	2.60	58(7,7),43(100)	2,6
5.	Этилформиат	74,8	2.67	74(1,1),56(0,5),45(33),31(100)	1,8
6.	Метилацетат	74,8	2.67	75(8),74(8),47(3),44(13),43(100)	1,7
7.	Акролеин		2.94		
8.	н-Масляный альдегид	72,11	3.13	73(20),72(25,7),57(31),43(100)	2,8
9.	Этилацетат	88,1	3.25	89(4,7),88(1,2),73(1,2),70(4,2),61(9,5),45(12),43(100)	2,0
10.	Метанол / изопропилацетат		3.35		2,3
11.	Метилэтилкетон	72,1	3.41	73(17),72(14),57(7,6),43(100)	1,5
12.	Изо-валериановый альдегид	86,1	3.61	87(5,2),69(19,3),58(36,1),41(100)	1,6
13.	Пропилацетат	102,1	3.68	89(7,3),59(3,7),57(5,6),55(2,3),47(16),44(13),43(40),42(100)	1,8
14.	Диметиловый эфир этиленгликоля	90	3.70	91(5,4),69(5,0),58(22),45(100)	3,4
15.	Этанол		3.87		
16.	4-метил-пентанон-2 (Метилизобутилкетон)	100,16	4.92	101(12),85(12),58(18),43(100)	1,2
17.	Втор-бутанол	74,1	5.18	75(1,3),73(1,8),63(1,6),59(12,9),57(26,4),47(35)	1,4
18.	Пропанол-1	60	5.44	61(8,5),59(28,8),57(4,1),49(4,9),47(54,8),45(97),43(100),42(60)	1,4
19.	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.	Метилкапронат	130	7.98	131(81),99(19,8),87(16,2),74(51),59(25),43(100)	1,2
29.	Лимонен	136	8.04	136(6,2),121(8),107(11),93(37),79(32),67(71),53(21),45(100)	
30.	Пиридин	79,1	8.11	80(100),79(66),52(57)	1,7
31.	Изоамиловый спирт	88	8.35	87(0,89),71(38,2),55(77),45(22,7),41(100)	1,2
32.	Моноэтиловый эфир этиленгликоля	90	8.59	91(39),73(62),59(48),45(100),43(50)	2,7
33.	н-Амиловый спирт	88,15	8.97	87(0,2),70(24,7),55(81,1),41(100)	1,4
34.	Гексанол	102,2	10.61	85(20,9),69(34,5),56(100),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)	
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.	Этилдеканат	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,	14.99	127(1),97(18),83(31),69(1,9

		3		58),56(69),55(69),41(100)	
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.	Этилдодеканонат	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-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(100)	9,7
69.	Фенол, 2-МеО, 4-Et-	152	20.96		
70.	Фенол	94,1	20.37	94(100),66(47)	1,3
71.	Коричный альдегид	132,2	21.62	131(100),103(48),78(37),63(13),51(43)	2,2
72.	Фенол, 2-МеО, 4-Pr-	166	22.71		
73.	Тимол	150?	24.39		0,8
74.	o-Ванилин	152,5	24.82	153(11),152(100),151(96),137(61),123(16),109(26),81(30)	
75.	Этилгексадеканонат	284	26.09		

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

R10