

ГЛАВА V. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ, ЕГО ЭФИРОВ И НЕКОТОРЫХ ИХ МЕТАБОЛИТОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ

5.1. Введение в проблему определения этиленгликоля

При необходимости проведения химико-токсикологического исследования на ЭГ возникают определенные аналитические трудности, связанные со свойствами данного соединения.

Обладая высокой температурой кипения (197,6°C) и являясь высоко полярным соединением, ЭГ не может быть извлечен из биологических объектов по общепринятым методикам изолирования летучих и нелетучих ядов, используемым в химико-токсикологическом анализе, т.к. практически не перегоняется с водяным паром и не экстрагируется несмешивающимися с водой органическими растворителями.

Проведенными нами исследованиями установлено, что и оригинальные методики изолирования ЭГ, принятые в отечественной практике, обеспечивают невысокий процент его выхода (по методике Н.В. Лапкиной и А.В. Назаренко – 4%, по методике Ф.Н. Кахановского и В.С. Бубона – 20%). Обе методики приводят не к повышению концентрации ЭГ в отгоне (извлечении) по сравнению с исходной – в объектах исследования, а к ее снижению: перегонкой с бензолом – в 25 раз, высаливанием – в 2 раза, что приводит к низкой чувствительности его последующего определения.

Химические реакции идентификации ЭГ по продуктам его окисления не специфичны и утратили свое значение при анализе биологического материала. А определение ЭГ в отгоне, полученном по методике Н.В. Лапкиной и А.В. Назаренко - по реакции его окисления до щавелевой кислоты, вообще не имеет смысла, так как щавелевая кислота прибавляется к объекту исследования и частично перегоняется с водяным паром.

В то же время требования к специфичности методики определения ЭГ еще более возросли, поскольку нами установлено влияние лекарственной терапии на результаты определения этого вещества недостаточно специфичными методами. Ближайший гомолог ЭГ - ПГ, обладающий схожими с ним химическими свойствами ($t_{\text{кип.}} 189,0^{\circ}\text{C}$), но низкой токсичностью, используется в качестве растворителя лекарственных препаратов. Поэтому в случае проведения лекарственной терапии препаратами, содержащими в своем составе ПГ (и некоторые другие), и использовании недостаточно специфичных методик возможен ошибочный результат исследования - ложная идентификация ЭГ.

В настоящее время в мировой практике наиболее специфичным методом определения ЭГ в биологических объектах считается газовая хроматография, позволяющая сочетать качественное и количественное определение вещества.

В определении ЭГ методом газовой хроматографии существуют два подхода: путем анализа нативного соединения или его производных.

Метод прямого газохроматографического определения более прост и удобен в выполнении; к тому же не требует использования дорогостоящих импортных реактивов (для дериватизации ЭГ). Основная же его сложность состоит в подборе соответствующей насадки для хроматографической колонки: вследствие высокой полярности и низкой летучести ЭГ проявляет адсорбционные свойства, которые при анализе разбавленных растворов приводят к резкому ухудшению его хроматографических характеристик. Так, например, на рисунке 5.1. показано искажение хроматографического пика ЭГ на колонке с тенаксом GC, наблюдавшееся нами после ее двухмесячной эксплуатации.

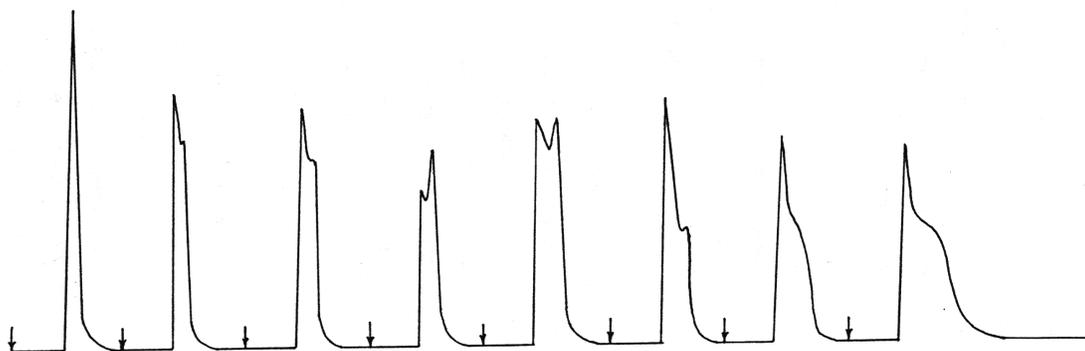


Рис. 5.1. Искажение пика этиленгликоля на тенаксе GC спустя два месяца эксплуатации колонки.

Нами изучено хроматографическое поведение ЭГ на колонках с рядом неполярных пористых полимеров, так как именно этот класс адсорбентов, по литературным данным, наиболее приемлем для анализа этого соединения. При сравнительном исследовании колонок с порипаками P и Q-S, тенаксом GC и сепароном BD (Табл. 5.1.) установлено, что наилучшие результаты наблюдаются при использовании сепарона BD и порипака Q-S (Рис. 5.2.), причем предпочтительнее первая насадка, так как пики гликолей на ней более узкие и симметричные. На основании экспериментального изучения установлено, что обе колонки позволяют разделить ЭГ, ПГ и 30 токсикологически важных соединений из группы растворителей, в том числе, некоторые другие гликоли и их эфиры (Табл. 5.2.), то есть - универсальны и дают хорошо воспроизводимые результаты в процессе их интенсивной эксплуатации в течение 1,0 - 1,5 года.

Таблица 5.1

Основные характеристики изученных насадок

Адсорбент	Матрица	T _{макс.} , °C	Размер зерен	
			Меш	мкм

Порапак Р	Стирол-дивинилбензол	250	100-200	100
Порапак Q-S	Этилстирол-дивинилбензол, силанизированный	250	80-100	
Сепарон ВD	Бутилметакрилат-дивинилбензол	230		
Тенакс GC	Поли-(2,6-дифенил-п-фениленоксид)	375	60-80	

Идентификация ЭГ осуществлялась по абсолютному времени удерживания. Предел обнаружения - 0,2 мкг ЭГ в 2 мкл водного раствора.

Количественное определение ЭГ проводилось методом внутреннего стандарта, в качестве которого использовался ПГ. Чувствительность определения: 1 мкг ЭГ в 2 мкл водного раствора. Диапазон линейности: концентрации ЭГ в интервале 50 - 5000 мг% (8 – 800 ммоль/л).

С целью повышения надежности газохроматографической идентификации ЭГ при проведении судебно-химического исследования разработаны условия его определения методами тонкослойной хроматографии, ИК-спектроскопии, хромато-масс-спектрометрии.

Вначале проводится газохроматографическое экспресс-определение ЭГ в моче и плазме крови. При его отрицательном результате делается вывод о не обнаружении ЭГ в исследуемых объектах, и на этом этапе исследование на ЭГ заканчивается. Граница обнаружения - содержание ЭГ в моче и плазме крови в концентрации 10 мг% (1,6 ммоль/л), граница количественного определения - 50 мг% (8 ммоль/л).

При положительном результате производится изолирование яда из объектов исследования и дальнейшее доказательство его наличия дополнительными методами (тонкослойной хроматографии и ИК-спектроскопии). Метод хромато-масс-спектрометрии применяется в

затруднительных случаях идентификации данного соединения вышеуказанными методами. Граница количественного определения ЭГ при

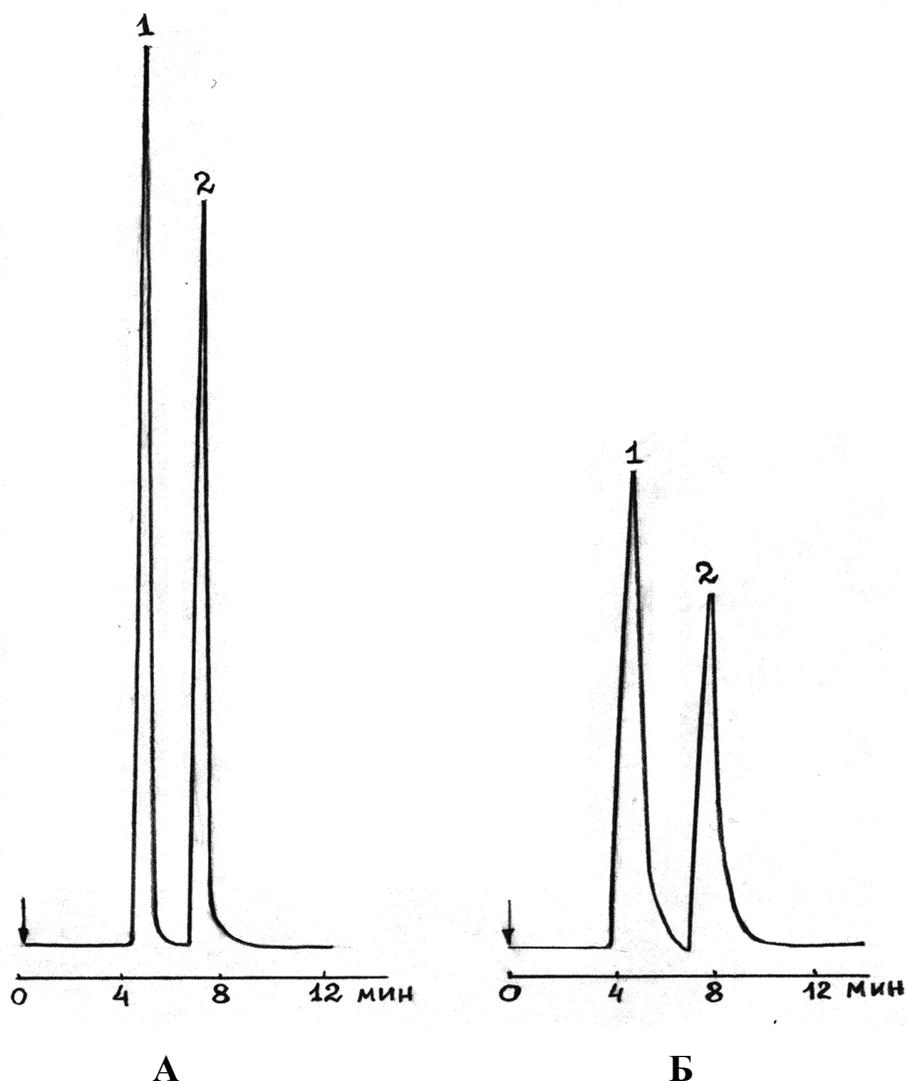


Рис. 54.2. Хроматограмма разделения смеси этиленгликоля (1) и 1,2-пропиленгликоля (2) в водном растворе на колонках с сепароном ВД (а) и порапакком Q-S (б).

проведении стадии изолирования: 1 мг в 10 мл крови, 0,5 мг в 20 мл мочи, 2 мг в 20 г печени. В среднем извлекается из крови 62% ЭГ при содержании его в пробе в концентрации 25 - 200 мг% (4 - 32 ммоль/л) с относительной ошибкой 2,3 - 4,2 %; из мочи - 73 % (при концентрации ЭГ 25 - 200 мг%) с ошибкой 3,1 -

6,0%; из печени – 42 % (при концентрации ЭГ 50 - 400 мг%) с ошибкой 8,8 - 14%.

Учитывая данные токсикокинетики ЭГ и его распределения по органам, в случае не обнаружения ЭГ в моче (в ее отсутствии - в мочевом пузыре) и крови исследовать внутренние органы не целесообразно, т.к. результат определения будет заведомо отрицательным.

Предлагаемые методики позволяют изолировать из биологического материала другие токсикологически важные гликоли: этилкарбитол и диэтиленгликоль.

Разработанные методики позволяют определить ЭГ в присутствии других гликолей, в том числе и ПГ. Гнилостно разложившийся биоматериал не пригоден для проведения исследований.

Таблица 5.2.

Времена удерживания (мин) важнейших растворителей (водные растворы) на Serapon VD, колонка 0,3x120 см, температура колонки 180 °С, скорость газа-носителя - 45 мл/мин

NN п/п	Растворитель	Температура кипения (°С)	Время удерживания (мин)
1.	Метанол	67,7	0,50
2.	Этанол	78,4	0,82
3.	Ацетон	56,2	1,27
4.	Хлористый метилен	40,0	1,27
5.	Изопропанол	82,5	1,33
6.	Эфир диэтиловый	36,5	1,53
7.	Пропанол	97,8	1,67
8.	Хлороформ	61,2	2,33
9.	Этилацетат	77,2	2,50
10.	Гексан	68,8	2,67
11.	Дихлорэтан	83,5	3,17
12.	Четыреххлористый углерод	76,8	3,17

13.	Изобутанол	107,5	3,17
14.	Бензол	80,1	3,50
15.	Метилцеллозольв	124,6	3,67
16.	Трихлорэтилен	87,2	3,67
17.	Бутанол	117,4	4,00
18.	Этиленгликоль	197,6	5,17
19.	Этилцеллозольв	134,8	6,33
20.	Толуол	110,6	7,33
21.	Изоамиловый спирт	119,9	7,33
22.	1,2-Пропиленгликоль	189,0	8,00
23.	Амиловый спирт	138,0	8,33
24.	Бутилацетат	125,0	11,67
25.	м-Ксилол	139,7	14,26
26.	о-Ксилол	144,4	15,56
27.	Тетрагидрофурфуриловый спирт	177,5	20,00
28.	Фенол	188,7	28,00
29.	Диэтиленгликоль	244,8	41,67
30.	Этилкарбитол	201,9	55,00

5.2. Экспресс-определение этиленгликоля в моче и плазме крови методом газовой хроматографии

Условия газохроматографического определения: газовый хроматограф с пламенно-ионизационным детектором, колонка стеклянная, длиной 1,2 м, внутренним диаметром 3 мм, насадка - Separon BD (100 мкм) или Porapak Q-S (80 - 100 мкм), газ-носитель - гелий со скоростью 45 мл/мин, температура колонки при использовании сепарона 180°C, порпака 200°C, температура испарителя 220°C, скорость движения диаграммной ленты 3 мм/мин.

2 - 3 мкл мочи или плазмы крови вводят в колонку хроматографа при указанных условиях. Чувствительность прибора устанавливается таким образом, чтобы при хроматографировании метчика - 100 мг% (16 ммоль/л) раствора ЭГ на хроматограмме регистрировался пик высотой не менее 5 см. При таких условиях исследования биожидкостей на хроматограмме фиксируются и

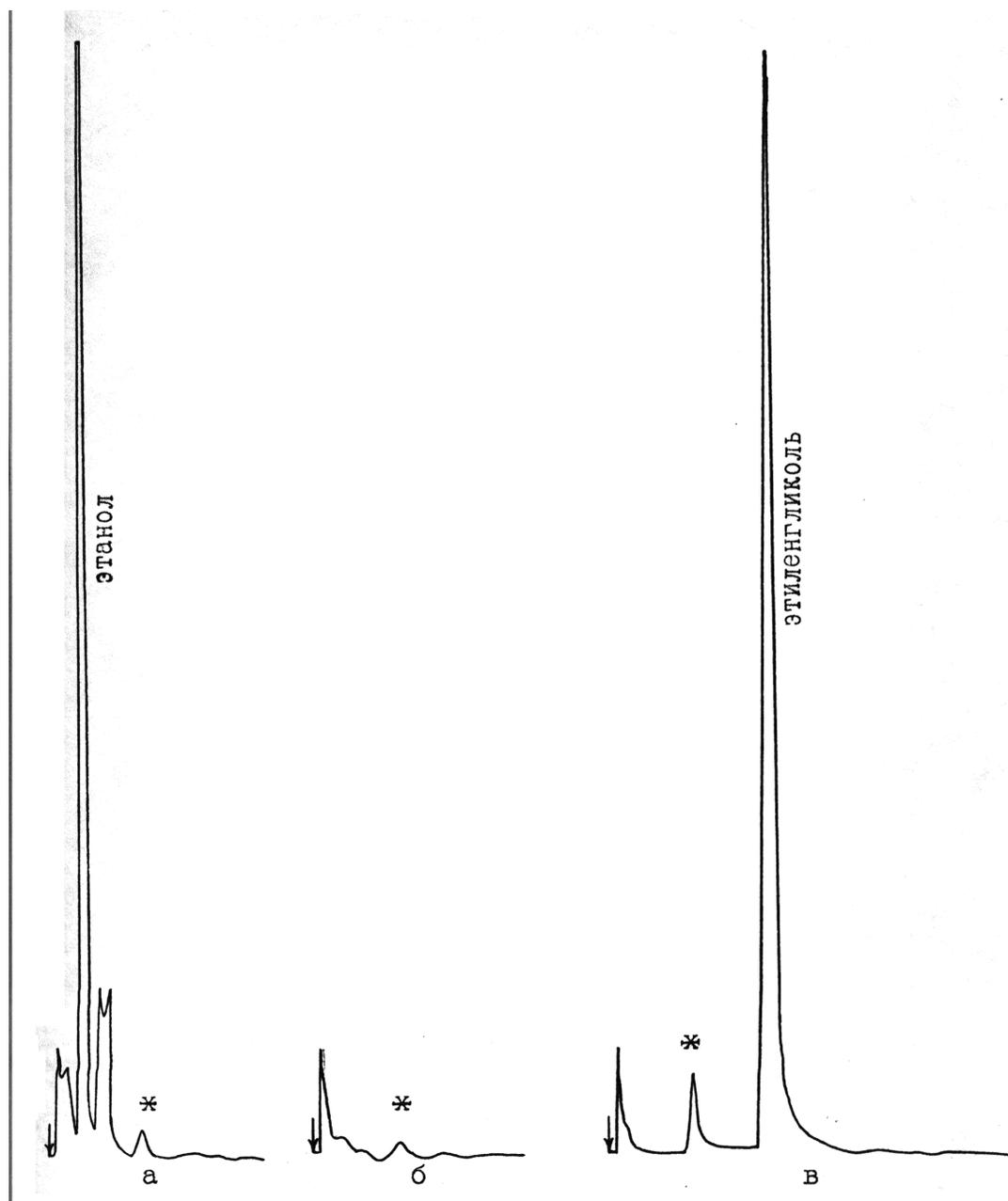
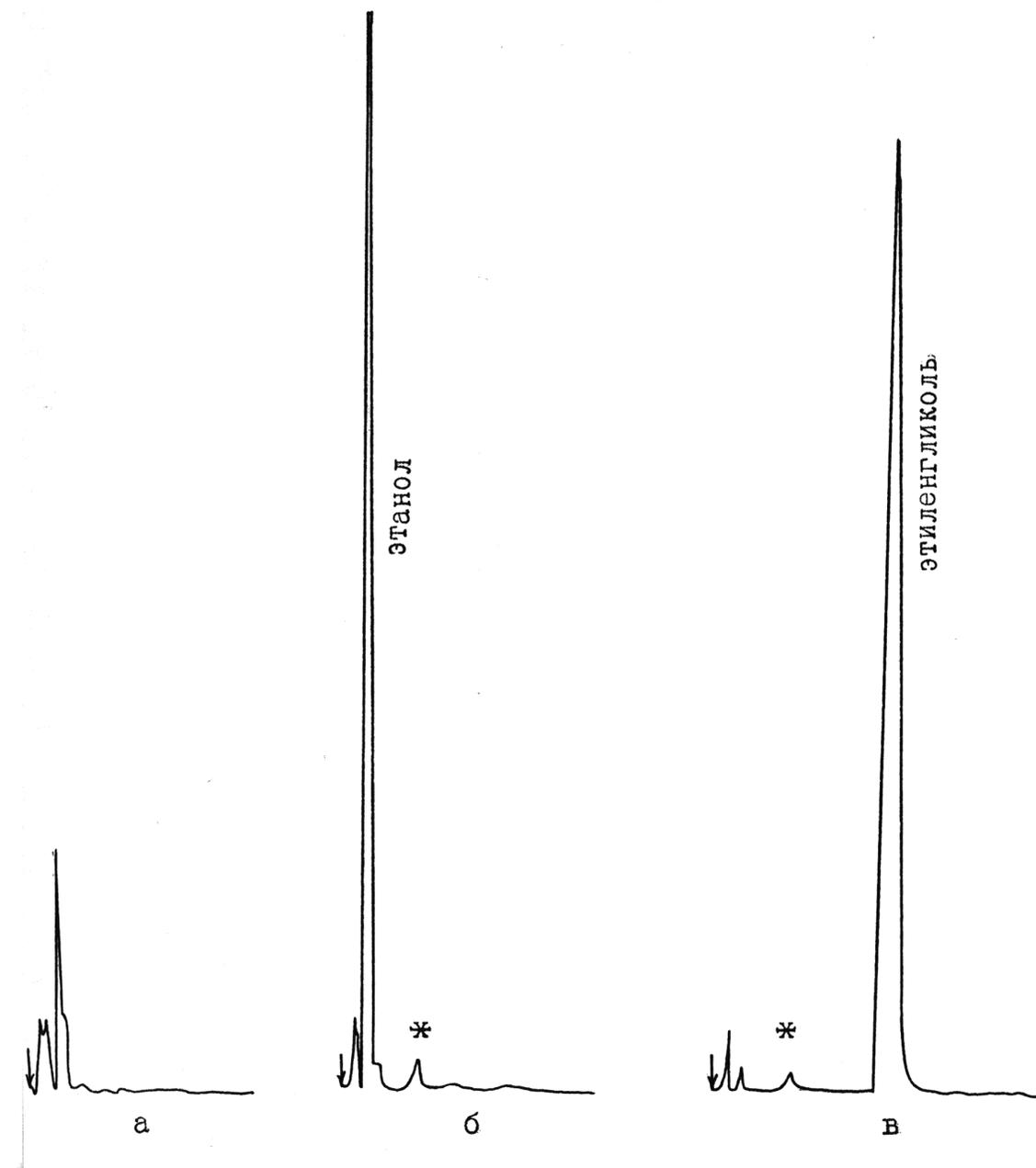


Рис. 5.3. Хроматограммы образцов мочи на колонке с сепароном BD:
- без этиленгликоля: (а) и (б); - с этиленгликолем в концентрации 500 мг%
(в)

*- здесь и на следующей хроматограмме - постоянный фоновый пик, наблюдающийся при анализе биологических объектов.



**Рис. 5.4. Хроматограммы образцов плазмы крови на колонке с сепароном
 ВД:- без этиленгликоля (а) и (б); - с этиленгликолем в концентрации 430
 мг% (в)**

самые низкие токсические концентрации ЭГ, идентификация которого осуществляется по абсолютному времени удерживания, совпадающему с метчиком. В таблице 5.2 приведены времена удерживания 30 важнейших

растворителей на колонке с сепароном VD. Указанные соединения не мешают определению ЭГ. Порядок выхода перечисленных растворителей на порпаке Q-S аналогичен.

Следует отметить, что при исследовании биологических объектов на хроматограммах, как правило, регистрируется фоновый пик со временем удерживания, приблизительно равным половине времени удерживания ЭГ и также не мешающий его определению (Рис. 5.3, 5.4.).

Чувствительность обнаружения ЭГ - концентрация ЭГ в объектах исследования 10 мг% (1,6 ммоль/л). При содержании ЭГ в биологических жидкостях свыше 50 мг% (8 ммоль/л) его количественное определение может проводиться непосредственно в объектах, минуя стадию предварительного изолирования яда (см. раздел 5.4.1. - «Количественное определение»).

При отрицательном результате анализа, т.е., если на хроматограмме при вышеуказанной чувствительности отсутствует пик со временем удерживания ЭГ, делается вывод о не обнаружении ЭГ в исследуемых биологических жидкостях и на этом этапе исследование на ЭГ заканчивается.

5.3. Изолирование этиленгликоля из биологических объектов

5.3.1. Изолирование этиленгликоля из крови

К 10 мл крови прибавляют 15 мл ацетона, смесь тщательно перемешивают стеклянной палочкой и центрифугируют в течение 20 минут при 3000 об/мин. Выделившийся водно-ацетоновый слой декантируют в стаканчик, куда прибавляют 0,5 г активированного угля. Взвесь фильтруют в выпарительную чашку, при этом фильтр промывают несколькими порциями ацетона, которые присоединяют к основному фильтрату. Затем фильтрат упаривают под вентилятором в токе горячего воздуха (температура 60°C) до исчезновения запаха ацетона. Полученное водное извлечение переносят в мерную пробирку, и

после измерения объема (1,0 - 1,5 мл) исследуют хроматографическими и спектральными методами¹.

5.3.2. Изолирование этиленгликоля из мочи

К 10 - 50 мл мочи прибавляют активированный уголь из расчета 0,2 г на 10 мл объекта, полученную взвесь фильтруют через увлажненный фильтр в выпарительную чашку, при этом фильтр промывают несколькими порциями дистиллированной воды (или ацетона - при необходимости проведения исследования на этилкарбитол, диэтиленгликоль), которые присоединяют к основному фильтрату. Фильтрат упаривают на кипящей водяной бане приблизительно до объема 15 мл, затем нагрев бани уменьшают (температура воды 80 - 90°С), и объект продолжают упаривать приблизительно до 1,0 - 1,5 мл (доупаривание можно производить под вентилятором в токе горячего воздуха)².

К остатку прибавляют 15 мл ацетона и, после перемешивания, 10 - 15 г безводного сульфата натрия. Полученную смесь тщательно растирают пестиком и оставляют на 30 минут при периодическом перемешивании. Затем ацетоновое извлечение сливают с осадка и фильтруют в выпарительную чашку, а остаток вновь дважды экстрагируют ацетоном. К объединенному ацетоновому извлечению прибавляют приблизительно 2 мл воды, и ацетон испаряют в токе горячего воздуха до исчезновения его запаха. Полученное водное извлечение переносят в мерную пробирку и после измерения объема (1,0 - 2,0 мл) исследуют хроматографическими и спектральными методами.

¹ при исследовании трупной крови, особенно с признаками начавшихся гнилостных изменений, в ряде случаев на хроматограмме регистрируются фоновые пики, затрудняющие интерпретацию результатов. В этих случаях необходимо провести стадию очистки путем обезвоживания извлечений, как описано в разделе 5.3.2.

² при поступлении на исследование слабо окрашенной мочи - с низким удельным весом, в ряде случаев отпадает необходимость в проведении последующих операций, так как уже на этой стадии извлечение получается чистым и может непосредственно исследоваться хроматографическими и спектральными методами

5.3.3. Изолирование ЭГ из внутренних органов

К 20 г мелко измельченной ткани печени или почки прибавляют 20 мл ацетона, смесь тщательно перемешивают и настаивают в течение 30 минут при периодическом перемешивании. Спустя указанное время ацетоновое извлечение сливают с объекта исследования, а последний вновь настаивают 30 минут с новой порцией ацетона (20 мл). Водно-ацетоновые извлечения фильтруют в стаканчик, куда прибавляют 0,5 г активированного угля. Взвесь фильтруют в выпарительную чашку, при этом фильтр промывают несколькими порциями ацетона, которые присоединяют к основному фильтрату, затем фильтрат упаривают под вентилятором в токе горячего воздуха (температура 60°C) приблизительно до объема 1,0 - 1,5 мл. К остатку прибавляют 15 мл ацетона и, после перемешивания, 10 - 15 г безводного сульфата натрия. Полученную смесь тщательно растирают пестиком и оставляют на 30 минут при периодическом перемешивании. Спустя указанное время ацетоновое извлечение сливают с осадка и фильтруют в маленькую выпарительную чашку через фильтр с 0,5 г активированного угля, а остаток вновь дважды обрабатывают ацетоном. К объединенному ацетоновому извлечению прибавляют приблизительно 2 мл воды, и ацетон испаряют в токе горячего воздуха до исчезновения его запаха. Полученное водное извлечение переносят в мерную пробирку и, после измерения объема (1,0 - 2,0 мл), исследуют методами газовой и тонкослойной хроматографии.

5.3.4. Изолирование этиленгликоля из мочевого пузыря

Мочевой пузырь помещают в выпарительную чашку и заливают ацетоном таким образом, чтобы его слизистая оболочка была погружена в ацетон. Через 30 минут ацетоновой извлечение сливают с объекта, а последний вновь

настаивают с новой порцией ацетона. Объединенное водно-ацетоновое извлечение центрифугируют, надосадочную жидкость смешивают с 0,5 г активированного угля, полученную взвесь фильтруют через увлажненный фильтр в выпарительную чашку и исследуют, как описано в разделе 5.3.3.

5.4. Идентификация и количественное определение этиленгликоля

5.4.1. Газохроматографическое исследование

Качественное определение

По 2 - 3 мкл извлечений из крови, мочи, мочевого пузыря или внутренних органов вводят в колонку газового хроматографа при вышеуказанных условиях. Идентификацию пика ЭГ осуществляют по абсолютному времени удерживания - см. раздел 5.2. «Экспресс-определение этиленгликоля в моче и плазме крови методом газовой хроматографии».

Количественное определение

Количественное определение ЭГ проводится методом внутреннего стандарта, в качестве которого используется ПГ или, при его обнаружении, н-бутанол.

В пенициллиновом флаконе тщательно смешивают равные объемы исследуемого объекта (моча, плазма крови или извлечение из мочи, крови, внутренних органов) и внутреннего стандарта (300 мг% или 3% раствор ПГ в зависимости от содержания ЭГ в объекте исследования).

2 - 3 мкл смеси вводят в колонку газового хроматографа при описанных выше условиях разделения.

Расчет концентрации ЭГ в исследуемом объекте производят по предварительно построенному калибровочному графику зависимости отношения высот пиков ЭГ и ПГ от концентрации ЭГ. При построении калибровочной кривой с использованием в качестве внутреннего стандарта 300

мг% раствора ПГ берут водные растворы ЭГ с концентрацией 100, 200, 300, 400 и 500 мг%; при использовании 3% раствора ПГ - водные растворы ЭГ с концентрацией 1, 2, 3, 4 и 5%. Калибровочные графики имеют вид прямой, начинающейся в точке пересечения координат. Так как указанные концентрации ЭГ укладываются в диапазон линейности (50 - 5000 мг%), то наблюдается наложение кривых.

Калибровочные графики, построенные на водных растворах ЭГ, плазме крови и моче, практически совпадают между собой, что позволяет использовать для количественного определения ЭГ в моче и плазме крови калибровку по его водным растворам.

В случаях проведения количественного определения в извлечениях расчет концентрации ЭГ в крови, моче и внутренних органах осуществляется по формуле:

$$C_{\text{ЭГ}} = \frac{C_{\text{ЭГ}} \times V \times 100}{n \times \%}$$

где:

$C_{\text{ЭГ}}$ - концентрация ЭГ в крови, моче или внутренних органах, мг% (или ммоль/л);

$C_{\text{ЭГ}}$ - концентрация ЭГ в водном извлечении, мг% (или ммоль/л);

V - объем водного извлечения, мл;

n - объем крови или мочи, взятый для определения, мл, или навеска органа, г;

% - усредненный процент выхода ЭГ по методике:

для мочи – 73%, для крови – 62%, для внутренних органов – 42%.

Граница количественного определения - концентрация ЭГ в водном извлечении 50 мг% (8 ммоль/л).

5.4.2. Хроматография в тонком слое сорбента

Несколько микролитров исследуемого извлечения (из крови, мочи, мочевого пузыря или внутренних органов) наносят на пластинку «силуфол»⁶. параллельно с метчиком - приблизительно таким же количеством водного раствора ЭГ: для получения четкого результата исследования желательно в качестве метчика использовать раствор ЭГ той же концентрации, что и в исследуемом извлечении, которую ранее определяют газохроматографически - см. выше. Пластинку хроматографируют в одной из систем растворителей: ацетон; хлороформ-метанол 4:1; изопропанол-хлороформ-25% раствор аммиака 45 : 45 : 10.

Указанные системы растворителей позволяют разделить основные соединения из группы гликолей (Табл. 5.3.).

Таблица 5.3

Значения Rf этиленгликоля и его аналогов в различных системах растворителей на пластинках «силуфол»

NN п/п	Система растворителей	Значение Rf вещества				
		ЭГ	ПГ	ДЭГ	ЭК	Г
1	Ацетон	0,48	0,59	0,40	0,71	0,36
2	Хлороформ – метанол (4:1)	0,25	0,38	0,42	0,67	0,15
3	Изопропанол-хлороформ- 25% раствор аммиака (45:45:10)	0,32	0,48	0,40	0,77	0,15

Примечание ЭГ - этиленгликоль; ПГ - 1,2-пропиленгликоль; ДЭГ - диэтиленгликоль; ЭК - этилкарбитол; Г - глицерин

⁶ при исследовании гликолей использование пластинок "силуфол UV 254", содержащих в составе сорбента люминофор, не имеет преимуществ, т.к. соединения указанной группы не гасят флуоресценции люминофора и, соответственно, не выявляются на хроматограмме при детекции ультрафиолетовым светом

Проявление пластинок осуществляют смесью 1% раствора перманганата калия и 2% раствора карбоната натрия (1:1) или бензидин-периодатным реактивом

Чувствительность определения:

- смесью растворов перманганата калия и карбоната натрия: ЭГ и ПГ - 2 мкг в пятне, глицерина - 1 мкг, диэтиленгликоля - 20 мкг, этилкарбитола - 500 мкг;
- бензидин-периодатным реактивом: ЭГ - 20 мкг, глицерина - 2 мкг, ПГ - 10 мкг. Диэтиленгликоль и этилкарбитол указанным реактивом не проявляются.

Следует учесть, что применяемые для определения ЭГ методом тонкослойной хроматографии детектирующие реактивы достаточно универсальны и проявляют большое число соединений, не относящихся к группе гликолей и их эфиров. Поэтому результаты определения ЭГ методом тонкослойной хроматографии могут оцениваться только в сочетании с данными других методов, особенно газовой хроматографии.

5.4.3. ИК-спектроскопия

Условия анализа: инфракрасный спектрофотометр «Specord M80», диапазон волновых чисел $4000 - 650 \text{ см}^{-1}$, программа управления щелью 12, время интегрирования 0,25 сек, сдвиг точки нуля 100, масштаб шкалы абсцисс 0,5, способ представления ординат - % Т.

0,5 - 1 мл водного извлечения из крови или мочи испаряют в агатовой ступке до объема капли. К полученному концентрату прибавляют небольшое количество порошка бромида калия. После перемешивания влажный порошок осторожно подсушивают под вентилятором до сыпучего состояния,

таблеткируют в пресс-форме (диаметр таблетки 3 мм) и подвергают спектральному исследованию.

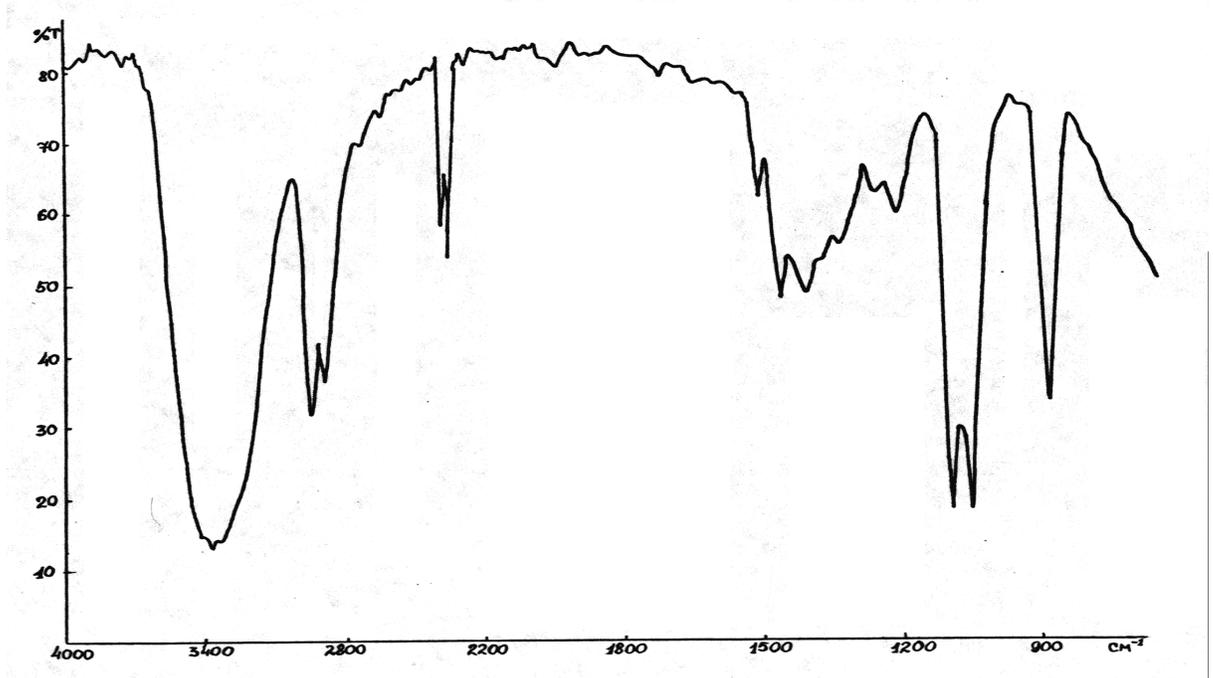


Рис. 5.5. ИК-спектр этиленгликоля (техника «раздавленной капли»)

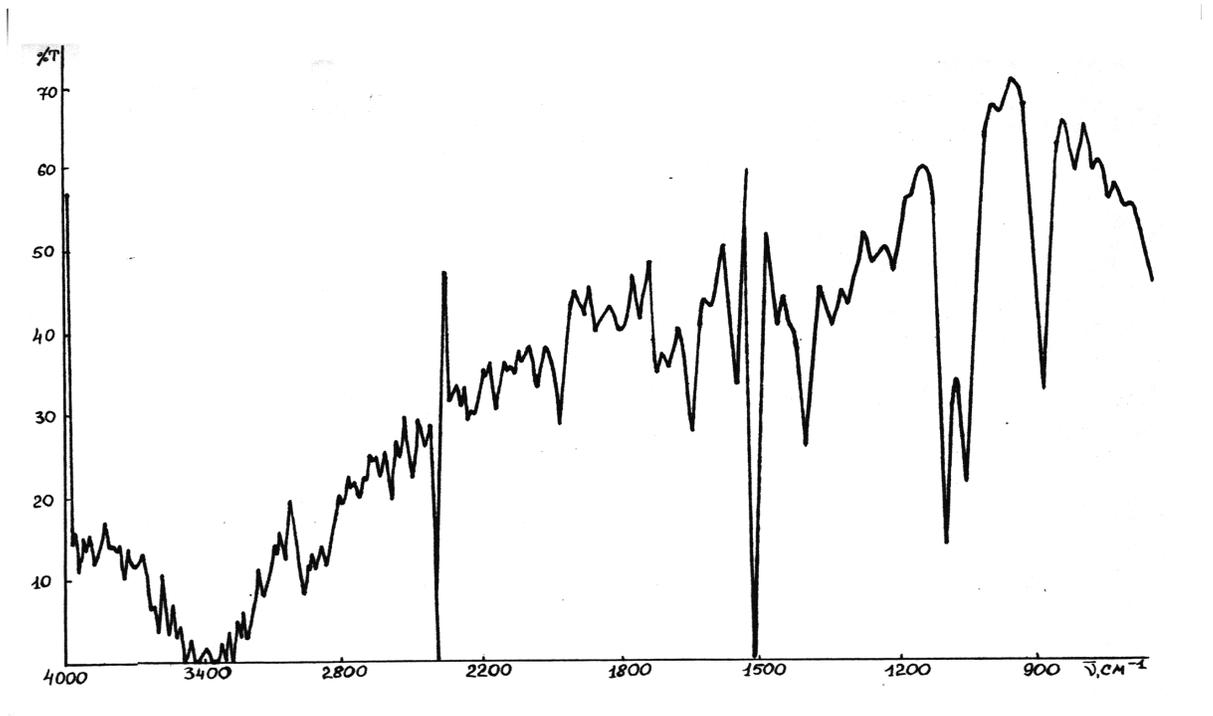


Рис.5.6. ИК-спектр этиленгликоля (модельный опыт)

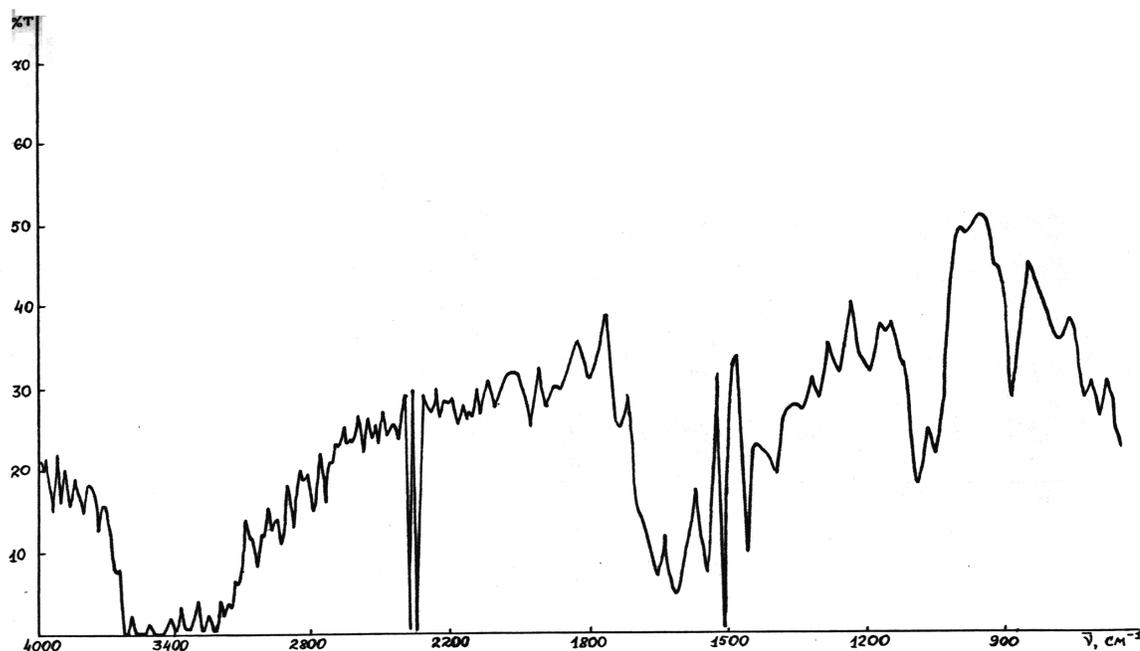


Рис. 5.7. ИК-спектр этиленгликоля, выделенного из крови экспериментально затравленных крыс

Наиболее информативной для идентификации ЭГ, выделенного из биологических объектов, является область «отпечатков пальцев» ($1500 - 650 \text{ см}^{-1}$), в которой у ЭГ наблюдается три полосы поглощения: при 1088 , 1040 и 876 см^{-1} (Рис. 5.5.).

Следует отметить, что при исследовании водных извлечений в области $1500-1200 \text{ см}^{-1}$ наблюдается серия полос поглощения, которые меняются от образца к образцу, что, видимо, связано с техникой приготовления проб - влиянием воды (Рис. 5.6, 5.7.).

5.4.4. Хромато-масс-спектрометрия

Условия анализа: хромато-масс-спектрометр «Incos-50», колонка капиллярная, длиной 30 м , внутренним диаметром $0,25 \text{ мм}$, неподвижная жидкая фаза DB-5, температура колонки от 60 до 250°C (скорость подъема

температуры 20 °С/мин), напряжение 1200 V, время сканирования 0,931 сек, энергия электронов 70 эВ.

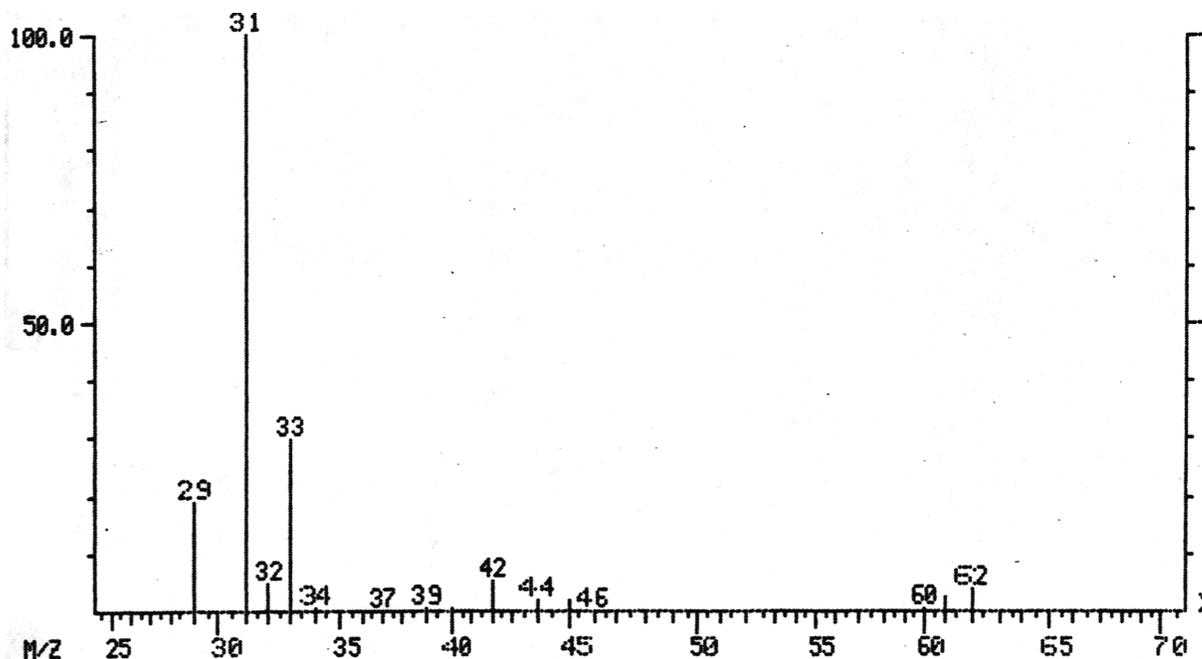


Рис. 5.8. Масс-спектр этиленгликоля, выделенного из мочи

2 мкл ацетонового извлечения из крови, мочи, мочевого пузыря или внутренних органов вводят в колонку хромато-масс-спектрометра при указанных условиях. Идентификацию ЭГ осуществляют по времени удерживания и масс-спектру, в котором у ЭГ наблюдаются следующие основные пики ионов: 31, 33, 29, 42, 32, 62 - молекулярный (Рис. 5.8.).

5.5. Определения целлозольвов и их метаболитов, а также гликолевой кислоты в биологических жидкостях

В отличие от ЭГ, МЦ и ЭЦ обладают достаточной летучестью, что позволяет использовать для их изолирования из биологических объектов основные методы выделения летучих соединений, широко применяемые в

химико-токсикологическом анализе, а именно, перегонку с водяным паром и исследование паро-газовой фазы (кроме того, может быть применен и экспресс-метод определения указанных соединений путем непосредственного ввода плазмы крови и мочи в колонку газового хроматографа по аналогии с ЭГ – см. раздел 5.2).

Так как МЦ и ЭЦ значительно менее полярны чем ЭГ, то указанное свойство снимает ограничение, возникающее при анализе ЭГ, в использовании разнообразных неподвижных жидких фаз различной полярности для их газохроматографического определения (в том числе, с успехом могут использоваться и носители, применяемые для определения ЭГ).

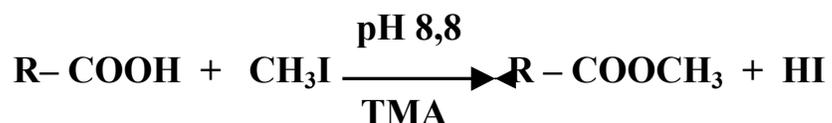
Таким образом, определение МЦ и ЭЦ в биологических объектах не вызывает существенных затруднений и может проводиться по общепринятым методикам изолирования и анализа летучих соединений (растворителей).

Для диагностики отравления ксенобиотиками, метаболизирующимися в организме, наряду с определением самого яда очень перспективным представляется анализ продуктов его биотрансформации, что позволяет более полно оценить эффективность проводимой антидотной и детоксикационной терапии, а также существенно увеличить сроки диагностики отравлений за счет обнаружения продуктов метаболизма, циркулирующих в биологических жидкостях, как правило, дольше самого яда.

Определение в биологических жидкостях метаболитов ЭГ, МЦ и ЭЦ, соответственно, гликолевой, метокси- и этоксиуксусной кислот, ответственных за реализацию токсических эффектов указанных выше соединений, значительно улучшает диагностику отравлений последними.

5.5.1. Совместное определение метилцеллозольва (этилцеллозольва) и метоксиуксусной (этоксиуксусной) кислоты

На основании методики определения алифатических спиртов в крови и моче, предложенной S.T. Cheung, и реакции метилирования кислот (межфазового катализа) нами разработан метод совместного определения МЦ (ЭЦ) и метоксиуксусной (этоксиуксусной) кислоты в биологических жидкостях. Уравнение реакции метилирования кислот приведено ниже:



Реакция основана на метилировании кислоты в водно-метанольной фазе под действием иодистого метила. Реакция протекает в щелочной среде. В качестве катализатора реакции используют тетраметиламмоний (ТМА).

К 0,5 мл плазмы крови (или мочи) добавляют 1,0 мл метанола, содержащего 6,5 мкмоль/л (59 мг%) ЭЦ и 7,8 мкмоль/л (81 мг%) этоксиуксусной кислоты в качестве внутреннего стандарта при определении МЦ и его метаболита. При определении ЭЦ и этоксиуксусной кислоты используют метанол, содержащий 7,9 мкмоль/л (61 мг%) МЦ и 9,8 мкмоль/л (89 мг%) метоксиуксусной кислоты.

После осаждения белков пробу центрифугируют 10 минут со скоростью 3000 об/мин. К 0,5 мл супернатанта добавляют 100 мг ТМА, 0,2 мл 10% раствора аммиака и 0,1 мл иодистого метила. Пробу герметизируют и инкубируют в течение часа при температуре 80°C, а затем производят определение МЦ, ЭЦ и дериватов соответствующих алкоксикислот газохроматографическим методом (Рис. 5.9.).

Условия определения: газовый хроматограф с пламенно-ионизационным детектором; колонка стеклянная, длиной 3,3 м, внутренним диаметром 3 мм; насадка - Рогарак-Р, газ-носитель – гелий со скоростью 30 мл/мин, температура колонки – 160°C, испарителя и детектора – 180°C.

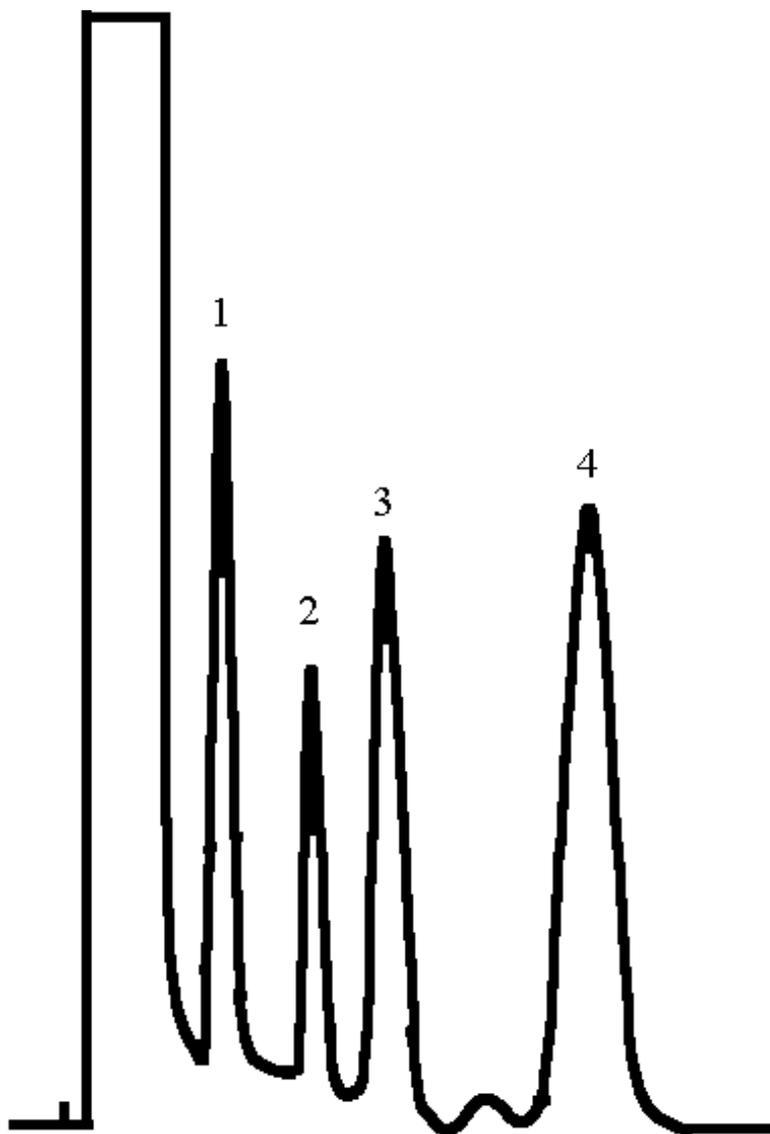


Рис.5.9. Разделение метилцеллозолява, этилцеллозолява и метиловых эфиров метокси- и этоксиуксусной кислоты на Porapak-R
(где: 1 - метилцеллозолев, 2 - этилцеллозолев, 3 - метоксиуксусная кислота
4 - этоксиуксусная кислота)

Идентификацию веществ производят по абсолютному времени удерживания. Расчет концентрации искомого вещества осуществляют по формуле:

$$C = K \frac{H_1}{H_2} \quad (\text{ммоль/л})$$

где:

H_1 - высота (или площадь) пика исследуемого вещества, мм;

H_2 - высота (или площадь) пика стандарта, мм;

K - поправочный коэффициент.

5.5.2. Определение гликолевой кислоты

Определение гликолевой кислоты производится в виде ее метильного производного – см. раздел 5.5.1.

К 0,5 мл плазмы крови (или мочи) добавляют 1,0 мл метанола, содержащего 3,9 мкмоль/л (41 мг%) этоксиуксусной кислоты, используемой в качестве внутреннего стандарта. Пробу центрифугируют 10 минут при 3000 об/мин. К 0,5 мл супернатанта добавляют 100 мг ТМА, 0,2 мл 10% раствора аммиака и 0,1 мл иодистого метила. Пробу герметизируют и инкубируют в течение часа при температуре 80°C, а затем производят определение деривата гликолевой кислоты газохроматографическим методом (Рис. 5.10.).

Условия определения: газовый хроматограф с пламенно-ионизационным детектором; колонка стеклянная, длиной 3,3 м, внутренним диаметром 3 мм; насадка - 10% Carbowax - 20 М на хроматоне N-AW, газ-носитель – гелий со скоростью 30 мл/мин, температура колонки – 100 °С, испарителя и детектора – 180°C. Идентификацию гликолевой кислоты производят по абсолютному времени удерживания. Расчет концентрации определяемого вещества осуществляют по формуле, приведенной в разделе 5.5.1.

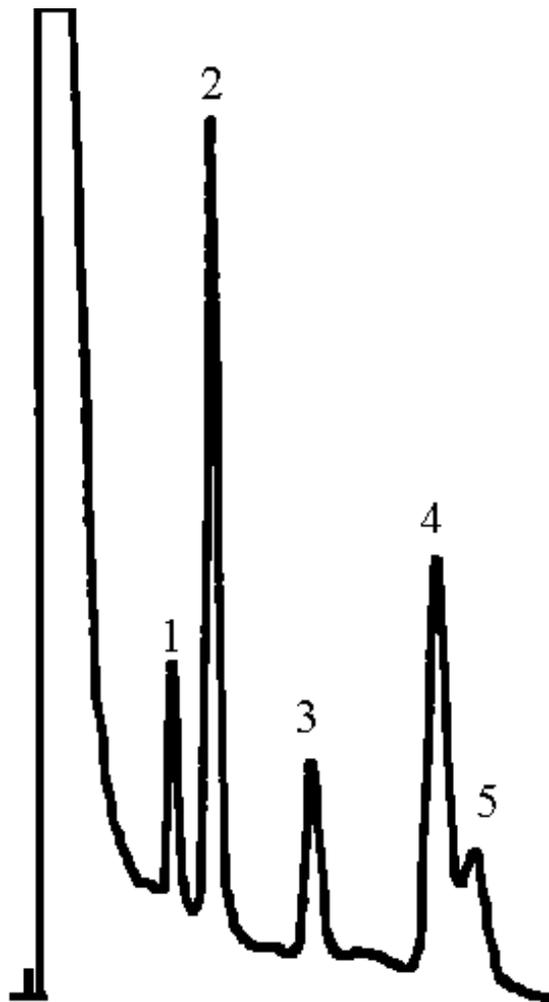


Рис.5.10. Разделение метиловых эфиров кислот на Carbowax-20m
(где: 1 - метоксиуксусная, 2 - этоксиуксусная, 3 - молочная, 4 - гликолевая, 5 - щавелевая)