

РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ КАЗЕННОЕ
ПРЕДПРИЯТИЕ
«ЦЕНТР СУДЕБНЫХ ЭКСПЕРТИЗ
МИНИСТЕРСТВА ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН»

“Қазақстан Республикасы Әділет Министірлігінің
Сот сараптамалары орталығы”
БАҚЫЛАУ ҮЛГІСІ
ҚР ӘМ ССО ғылыми кеңесінің № 1
« 7 » қараша 2016 ж. хаттамасы
реттік номері № 27.1(16)

МЕТОДИКА

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ МЕТОДОМ
ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

(шифр специальности – 27.1)

ПАСПОРТ МЕТОДИКИ

1. Наименование методики	Методика определения уксусной кислоты методом газожидкостной хроматографии
2. Шифр специальности методики	27.1(16)
3. Информация о разработчике методики	Стручинский Д.В. – Кокшетауский филиал «Центр судебной медицины МЮ РК»
4. Сущность методики	Сущность метода заключается в пробоподготовке трупного материала с использованием реакции этерификации уксусной кислоты этанолом в сернокислой среде (образование сложного эфира) непосредственно в биообъекте. Последующее исследование полученного этилацетата производится ГЖХ анализом равновесной парогазовой фазы с использованием капиллярной колонки и детектора ионизации пламени (ДИП). Образующиеся в результате этерификации продукты обладают высокой летучестью, что делает их пригодными для исследования данным методом. Для количественного определения используется метод внутреннего стандарта
4.1. Объекты исследования	Биологические ткани внутренних органов, объекты не биологического происхождения (остатки жидкостей, одежда и т.п.)
4.2. Методы исследования	Газовая хроматография
4.3. Краткое поэтапное описание методики	1. Обнаружение ацетат ионов 2. Количественное определение
5. Дата одобрения методики Ученым Советом Центра судебной медицины МЮ РК	Протокол № 1 от 07.11.2016г.
6. Информация о составителях паспорта методики	Жуматаева Г.С. - судебно-медицинский эксперт высшей категории РГКП «Центр судебной медицины МЮ РК»

СОДЕРЖАНИЕ

1. Введение	4
2. Область применения	4
3. Термины и обозначения	5
4. Основная часть	5
5. Заключение	7
6. Список использованных источников	7
7. Приложение	9

1. Введение.

По числу отравлений уксусная кислота занимает одно из первых мест наряду с этиловым спиртом и его суррогатами, окисью углерода, лекарственными препаратами, что связано главным образом с широким применением её в быту в виде уксусной эссенции и уксуса. Зачастую она используется с суицидной целью.

Уксусная кислота при отравлении местно действует слабее, чем неорганические кислоты (ожоги кожи вызываются растворами уксусной кислоты с концентрацией 30% и выше), но резко проявляется её резорбтивное действие (некрозы, геморрагии в печени, гемолиз).

При вскрытии трупов при отравлении уксусной кислотой от полостей тела обычно ощущается характерный запах. Так же наблюдаются ожоги и кровоизлияния в ротовой полости, пищеводе и желудке. Смертельной дозой считается 15 граммов.

Исследование уксусной кислоты методом перегонки с водяным паром достаточно трудоёмко и позволяет получить в дистилляте около 50% содержащейся в водных растворах кислоты и не более 0,3-0,4% уксусной кислоты, содержащейся в не загнившем биологическом материале. [1]

Объектами исследования являются желудок с содержимым, глотка, пищевод, печень, почка. [2]

Предлагается методика химико-токсикологического анализа уксусной кислоты методом газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ).

Прямой ГЖХ анализ уксусной кислоты затруднителен из-за наличия в ней кислотного центра. Поэтому было применено исследование уксусной кислоты после этерификации. Сущность метода заключается в пробоподготовке трупного материала с использованием реакции этерификации уксусной кислоты этанолом в сернокислой среде (образование сложного эфира) непосредственно в биообъекте. Последующее исследование полученного этилацетата производится ГЖХ анализом равновесной парогазовой фазы с использованием капиллярной колонки и детектора ионизации пламени (ДИП). Образующиеся в результате этерификации продукты обладают высокой летучестью, что делает их пригодными для исследования данным методом. Для количественного определения используется метод внутреннего стандарта.

Преимущества методики.

1) Значительно сокращается время анализа за счет исключения стадии перегонки;

2) За счёт ввода в хроматограф пробы в виде парогазовой фазы исключается засорение колонки нелетучими компонентами (как в случае ввода жидкой пробы), к чему особенно чувствительна капиллярная колонка.

2. Область применения.

Описанные процедуры используются при производстве химико-токсикологических экспертиз (исследований) при направленном

исследовании на уксусную кислоту и ацетаты, а также в случаях смерти от воздействия «едких ядов».

3. Термины и обозначения.

Перегонка - испарение жидкости с последующим охлаждением и конденсацией паров. Различают дистилляцию с конденсацией пара в жидкость (при которой получаемый дистиллят имеет усреднённый состав вследствие перемешивания) и дистилляцию с конденсацией пара в твёрдую фазу (при которой в конденсате возникает распределение концентрации компонентов). Продуктом дистилляции является дистиллят или остаток (или и то, и другое) --- в зависимости от дистиллируемого вещества и целей процесса.

«Едкий яд» — вещество, обладающее резко выраженным местным деструктивным действием (напр., кислоты, щелочи);

ДИП - детектор ионизации пламени;

ГЖХ — Газо-жидкостная хроматография;

Время удерживания - один из основных параметров хроматографического разделения - зависит от многих факторов, в том числе и от активности адсорбента, состава подвижной фазы, способа элюирования. Поэтому абсолютные значения времени удерживания данных компонентов зависят от методики, выбранной для их определения, из-за чего публикация данных по временам удерживания соединений обычно сопровождается подробной информацией об условиях их получения. Для целей идентификации необходимо точное воспроизведение условий определения, при использовании опубликованных в литературе данных по удерживанию разделяемых компонентов. Более надежна (в связи с большими трудностями и малой надежностью точного воспроизведения условий) идентификация на основании данных по удерживанию модельных соединений, полученных на той же аппаратуре, на которой определяли время удерживания неизвестных компонентов образца.

4. Процедуры.

4.1. Условия газохроматографического исследования.

Газовый хроматограф «КристалЛюкс 4000М», детектор ДИП, колонка капиллярная кварцевая фирмы «Zebron» (США) длиной 30 м, диаметром 0,32 мм, неподвижная жидкая фаза ZB -1, толщина слоя 0,5 мкм. Температура колонки - 60°C, детектора - 150°C, испарителя -120°C. Расходы газов: газа-носителя гелия 25 мл/мин; сброс -30 мл/мин; поддув -15 мл/мин; воздуха -250 мл/мин; водорода - 30 мл/мин. Время анализа -5 мин. Возможно использование других хроматографов с аналогичными характеристиками, а так же колонок других производителей, обеспечивающих достаточное разделение исследуемых компонентов.

4.2. Предварительный ГЖХ анализ.

Для того, чтобы убедиться в отсутствии в исследуемом объекте этилацетата, следует провести предварительный ГЖХ анализ парогазовой фазы по следующей методике.

2,0 грамма измельчённого объекта помещают в пенициллиновый флакон, закрывают резиновой пробкой, которую герметично фиксируют к горловине. Флакон помещают на водяную баню при 60°C на 10 мин. Отбирают предварительно нагретым и проверенным на отсутствие фонового газовыделения шприцем 0,2 мл парогазовой фазы и вводят в испаритель хроматографа. Исследование проводят в течении 5 мин при описанных выше условиях. При наличии в объекте этилацетата наблюдают появление пика со временем удерживания $t_R = 2,98$ мин. В этом случае описываемая методика не может быть использована. Этанол, при его наличии в объекте, не влияет на результат качественного и количественного определения.

4.3. Качественное определение.

2,0 грамма измельченного объекта помещают в пенициллиновый флакон, добавляют 2,4 мл этанола, 0,1 мл концентрированной серной кислоты, оставляют на 1 час при встряхивании. Добавляют 1,4 мл концентрированной серной кислоты, флакон закрывают резиновой пробкой, которую герметично фиксируют к горловине, встряхивают 3 мин. Флакон помещают на водяную баню при 60°C на 10 мин. Отбирают предварительно нагретым и проверенным на отсутствие фонового газовыделения шприцем 0,2 мл парогазовой фазы и вводят в испаритель хроматографа. Исследование проводят в течении 5 мин при описанных выше условиях. При наличии уксусной кислоты наблюдают появление пиков этанола с временем удерживания $t_R = 2,29$ мин и этилацетата с $t_R = 2,98$ мин. При её отсутствии наблюдают только пик этанола с $t_R = 2,29$ мин.

4.4. Количественное определение.

2,0 измельченного объекта помещают в пенициллиновый флакон, добавляют 2,4 мл этанола, 0,1 мл концентрированной серной кислоты, 1,0 мл 20% раствора н-пропанола, оставляют на 1 час при встряхивании. Добавляют 1,4 мл концентрированной серной кислоты, флакон закрывают резиновой пробкой, которую герметично фиксируют к горловине, встряхивают 3 мин. Флакон помещают на водяную баню при 60°C на 10 мин. Отбирают предварительно нагретым и проверенным на отсутствие фонового газовыделения шприцем 0,2 мл парогазовой фазы и вводят в испаритель хроматографа. Исследуют в течении 5 мин при описанных выше условиях. При наличии уксусной кислоты наблюдают появление пиков этанола со временем удерживания $t_R = 2,29$ мин, н-пропанола с $t_R = 2,63$ мин, этилацетата с $t_R = 2,98$ мин. При отсутствии уксусной кислоты наблюдают появление пиков этанола со временем удерживания $t_R = 2,29$ мин и н-пропанола с $t_R = 2,63$ мин.

Образцы хроматограмм, полученных при проведении анализа, приведены на рисунках № 1-4. См. Приложение 1.

На различных хроматографах величины t_R могут незначительно отличаться ввиду различий в свойствах колонок.

Расчёт концентрации производится по калибровочному графику или с помощью программы «Net Chrom V 2.1.». При построении калибровочного графика по оси абсцисс откладывается отношение площадей уксусной кислоты и внутреннего стандарта, а по оси ординат – концентрация уксусной кислоты. При использовании программы «Net Chrom V 2.1.» метод с количественным расчётом создаётся так же, как при анализе алкоголя. Использование для расчёта площадей, а не высот пиков позволяет получать более точные результаты. Для приготовления стандартов при калибровочной используются водные растворы уксусной кислоты с концентрациями 0,05%, 0,1%, 0,25%, 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,5 %, 5,0%.

Методика подготовки калибровочной пробы аналогична подготовке пробы для количественного определения, где вместо биообъекта берётся 2,0 мл стандартного раствора уксусной кислоты.

4.5. Оценка результатов анализа.

Согласно литературных данных, при отравлениях уксусная кислота была определена в следующих концентрациях.

1. У лиц, которым не оказывалась медицинская помощь: в желудке - 0,5-3,8%, в печени – до 0,2%.

2. У лиц, умерших в первые 4 часа после поступления в больницу: в желудке 0,5-2,3%, в печени – до 0,2-1,5%.

3. У лиц, умерших в больнице более чем через сутки после поступления: в желудке 0,1-0,7%, в печени – до 0,1-0,44%.

При оценке результатов экспертизы следует учитывать естественное содержание уксусной кислоты во внутренних органах, которое составляет 0,1-0,21% (в среднем 0,17%) в желудке и 0,07-0,13% (в среднем 0,11%) в печени. [4]

5. Заключение.

Описанная процедура является сводом методик используемых в химико-токсикологическом исследовании на данную группу веществ и предназначена для идентификации и количественного определения «летучих» веществ в биологических объектах и объектов не биологического происхождения.

6. Список использованных источников

1. Швайкова М.Д. Токсикологическая химия. М. 1975г. с.105.
2. «Правила организации и производства судебно-медицинской экспертизы». Приказ МЗ РК № 875/1 от 20.12.2004г.
3. Кахановский Ф.Н., Бубон В.С. Судебно-медицинская экспертиза. 1983г. №3 с.34-35.
4. Воронкова Л.Г., Царёв В.И. Судебно-медицинская экспертиза. 1989г. №1 с.41-42.

5. Стручинский Д.В., Шкиренко В.А., Нурмуканова А.А., Толебаева Ж.К. «Определение летучих ядов методом газожидкостной хроматографии на хроматографе «Кристал люкс 4000М». Материалы Республиканской научно-практической конференции «Актуальные вопросы судебной медицины и экспертной практики». Астана, 2008г.
6. Стручинский Д.В., Ибраева Ж.Б., Нурмуканова А.А. «Судебно-химическое определение уксусной кислоты с использованием хроматографа «Кристал люкс 4000М». Материалы Республиканской научно-практической конференции «Актуальные вопросы судебной медицины и экспертной практики». Выпуск 2. Астана, 2009г.
7. Стручинский Д.В., Нурмуканова А.А. «Количественное определение уксусной кислоты на хроматографе «Кристал люкс 4000М» с использованием программного обеспечения «Net Chrom V 2.1.». Материалы Республиканской научно-практической конференции «Актуальные вопросы судебной медицины и экспертной практики». Выпуск 3. Астана, 2009г.

Образцы хроматограмм, полученных при проведении анализа.

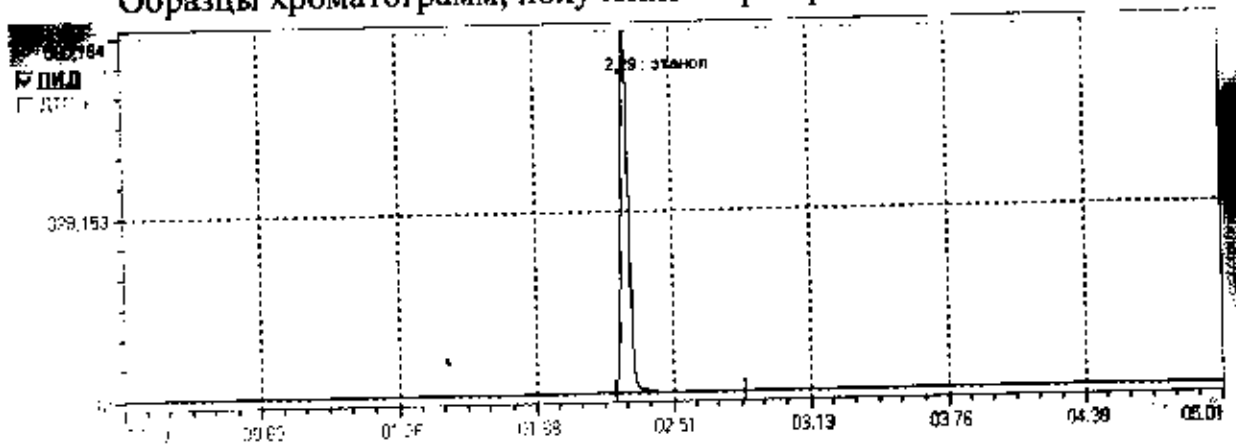


Рис.1. Проба качественная отрицательная.

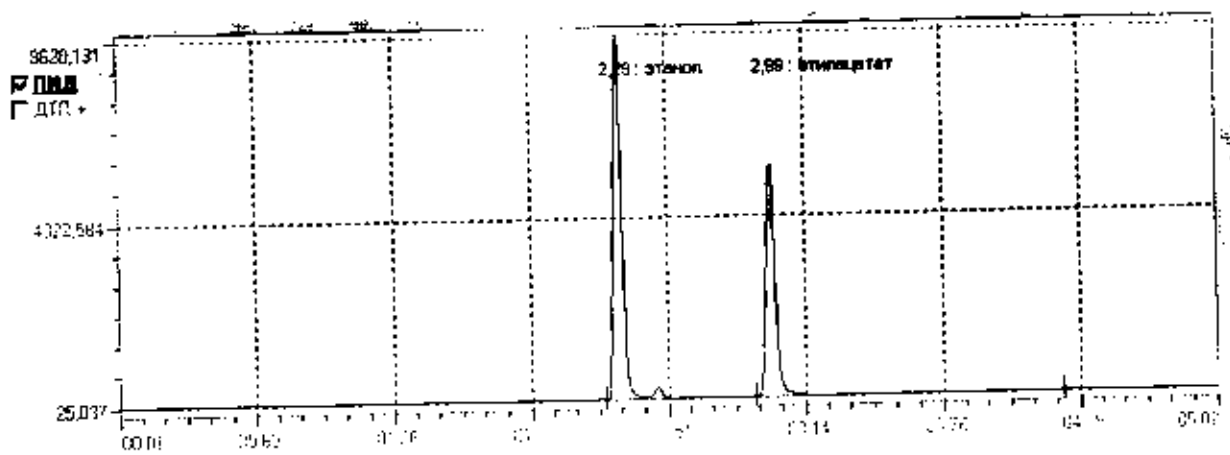


Рис.2.Проба качественная положительная.

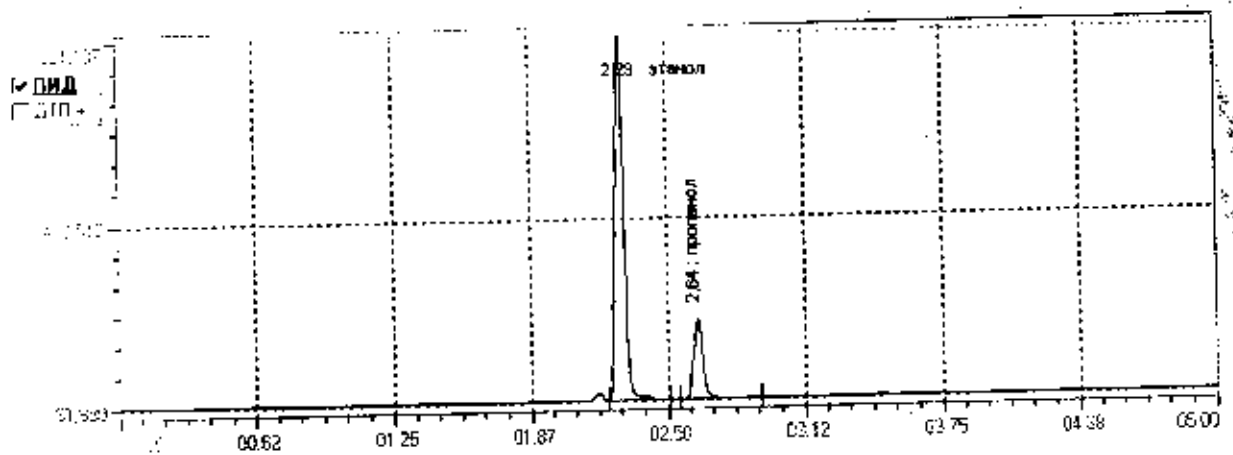


Рис.3. Проба количественная отрицательная.

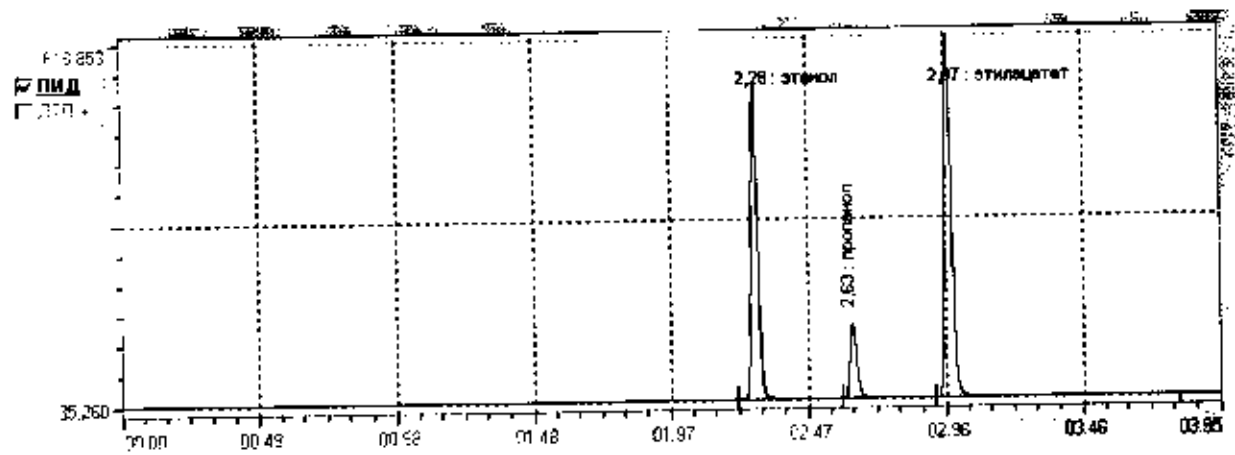


Рис.4. Проба количественная положительная.