

К ВОПРОСУ ОЦЕНКИ НОВООБРАЗОВАНИЯ ЭТАНОЛА В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

*Н.Д. Бородулина, С.С. Катаев,
Государственное казенное учреждение здравоохранения
особого типа Пермского края «Пермское краевое бюро
судебно-медицинской экспертизы»
(начальник – канд. мед. наук А.М. Онянов), г. Пермь*

В последние годы вопрос оценки новообразования этанола в биологическом материале является достаточно актуальной проблемой. Одни из самых громких случаев последних лет – дела так называемых пьяных мальчиков – свидетельствуют о необходимости решения этого вопроса в рамках судебно-химического исследования. Известно [4, 7], что в материале от трупа этанол может определяться вследствие его посмертного образования. Проблема новообразования в отобранных для исследования образцах, как правило, связана с особенностями забора объектов, их хранения и доставки в лабораторные подразделения бюро судебно-медицинской экспертизы. Таким образом, наряду с разработкой методов определения в объектах маркеров прижизненного употребления этанола (например, его метаболита этилглюкуроида) представляют интерес способы выявления его новообразования.

Процесс новообразования этанола в биологическом материале происходит вследствие спиртового брожения глюкозы при благоприятной температуре и присутствии микроорганизмов [1]. На процесс влияет множество факторов, в том числе тип и количество микроорганизмов, влажность и доступ воздуха [6]. Помимо этанола в крови и органах трупа под действием микробов образуются другие низкомолекулярные летучие соединения, в том числе алифатические спирты (бутан-1-ол, пропан-1-ол, пропан-2-ол, пентан-2-ол) [3]. Установлено [2], что пропан-1-ол образуется в больших количествах, чем другие летучие соединения, и определяется во всех пробах, где наблюдается новообразование

этанол. При этом характерно соотношение этанол/пропан-1-ол в крови менее 20 [5].

В связи с этим нами предложен метод оценки новообразования этанола в биологическом материале, основанный на определении концентраций этанола и пропан-1-ола и их соотношения в исследуемом объекте.

Материалы и методы

Оборудование. Газовый хроматограф «Кристалл 5000.2» (СКБ Хроматэк) с детектором по теплопроводности, колонка металлическая длиной 1,5 м и диаметром 3 мм, сорбент «Chromaton-N» с нанесенной неподвижной жидкой фазой 10% динонилфталата. Газовый хроматограф «Кристалл 5000.2» (СКБ Хроматэк) с двумя пламенно-ионизационными детекторами, колонка кварцевая капиллярная «Optima-Wax» длиной 30 м и диаметром 0,32 мм. Термоблок ПЭ-4030 (ОАО «Экрос», Россия).

Материалы. Используемые реактивы и растворители марки «х.ч.». Для исследования на наличие этилглюкуронида в моче использовали планшет с двумя иммунохроматографическими тест-полосками: «ИХА-экстра-фактор» для выявления каннабиноидов и этилглюкуронида.

Пробоподготовка. Для количественного определения этанола во флаконе смешивали 0,5 мл 50% раствора трихлоруксусной кислоты, 1 мл исследуемого объекта, 1 мл 4,0 г/л раствора пропан-1-ола (внутренний стандарт). После фиксации пробки к горловине флакона содержимое его перемешивали, вводили 0,3 мл 30% раствора нитрита натрия. Отбирали 0,5 мл равновесной газовой фазы и вводили в испаритель хроматографа. Калибровочный график построен методом внутреннего стандарта с использованием водного раствора пропан-1-ола (4,0 г/л в пробе) и водных растворов этанола в концентрациях: 0,15 г/л, 0,3 г/л, 1,0 г/л, 3,0 г/л, 6,0 г/л, 8,0 г/л.

Для количественного определения пропан-1-ола во флакон вносили 1 мл исследуемого объекта и 0,5 мл раствора внутреннего стандарта (4,0 г/л 2-метилпропан-2-ола), выдерживали в термоблоке 10 минут при температуре 80°C. 1 мл равновесной

газовой фазы вводили в испаритель хроматографа. Калибровочный график построен методом внутреннего стандарта с использованием водного раствора 2-метилпропан-2-ола (4,0 г/л в пробе) и водных растворов пропан-1-ола в концентрациях: 0,01 г/л, 0,02 г/л, 0,04 г/л, 0,08 г/л, 0,16 г/л, 0,2 г/л, 0,4 г/л.

Оценку концентрации проводили по формуле:

$$20 > \frac{C(\text{этанол})}{C(\text{пропанол})}$$

где С – концентрация спирта в крови, г/л.

При соотношении найденных концентраций менее 20 делали вывод о новообразовании этилового спирта в биоматериале.

Условия хроматографического разделения. Для исследования на этанол: детектор по теплопроводности, температура детектора 100°C; температура колонки и испарителя 60°C, расход газа-носителя (гелий) – 60 мл/мин.

Для исследования на пропан-1-ол: детектор пламенно-ионизационный. Скорость газа-носителя (азот) – 2 мл/мин. Температуры испарителя и детектора 210 и 240°C соответственно, температура колонки – программируемая: 2 мин. при начальной температуре 50°C, затем прогрев со скоростью 10°C/мин до 120°C, далее прогрев со скоростью 30°C/мин до 210°C. Ввод пробы с делением потока газа-носителя 20:1. Скорость потока воздуха 500 мл/мин, водорода 50 мл/мин, поддув газа носителя в детектор 20 мл/мин.

Регистрацию хроматограмм и количественное определение проводили с помощью программы Хроматэк Аналитик (СКБ Хроматэк).

Результаты и обсуждение

В таблице 1 приводятся 6 случаев исследования на предмет новообразования этанола, проведенных в судебно-химическом отделении ГКУЗОТ «ПКБСМЭ» по вышеописанной методике. Выводы относительно наличия новообразования этанола делали на основании сравнения его концентраций в крови и моче, соотношения концентраций этанола и пропан-1-ола, в некоторых

случаях – результатов теста на наличие этилглюкуронида в моче. Следует отметить, что во всех приведенных случаях объекты для исследования поступили из отдаленных филиалов бюро, что позволяет включить условия, длительность хранения и транспортировки в число факторов, способствующих новообразованию этанола.

Таблица 1

Определение новообразования этанола в биологических жидкостях от трупов – случаи из практики

Случай (труп)	Концентрация этанола в пробе, г/л	Соотношение концентраций этанола и пропан-1-ола	Примечание
1. Менее года, жен.	Кровь – 0,08	Кровь – 8,9	Новообразование этанола в крови
2. 8 лет, жен.	Кровь – 1,1 Моча – 0,0	Пропан-1-ол не обнаружен	Контаминация
3. 14 лет, муж.	Кровь – 0,98 Моча – 1,2	Кровь – 980 Моча – 1200	Новообразование не выявлено, в моче обнаружен этилглюкуронид
4. 40 лет, муж.	Кровь – 0,89	Кровь – 38,7	Новообразование не выявлено
5. 18 лет, муж.	Кровь – 0,87 Моча – 0,0	Кровь – 9,6	Новообразование этанола в крови
6. 59 лет, жен.	Кровь – 0,51	Пропан-1-ол не обнаружен	Невозможно интерпретировать результат

Среди результатов отмечаются два случая новообразования этанола в крови (1 и 5). Случай 1 – для исследования на алкоголь поступили кровь и почка новорожденного ребенка. В крови был обнаружен этанол в концентрации 0,28 г/л, в почке – 1,1 г/л. Ввиду недостаточного количества объектов на предмет новообразования этанола исследовалась кровь из архива после биохимического

мического исследования – результаты представлены в таблице 1. Случай 5 – мальчик поступил в лечебное учреждение, где в скором времени скончался. Следует отметить, что при исследовании крови, забранной у мальчика в лечебном учреждении незадолго до смерти, этанол не обнаружен. Этот результат и отсутствие этанола в моче от трупа позволили предположить наличие этанола в крови, как следствие, новообразования, что было подтверждено найденным соотношением этанол/пропан-1-ол (менее 20).

В случае 3 в моче наряду с кровью определяется этанол, а также присутствует его метаболит – этилглюкуронид, что в совокупности с соотношением концентраций этанола и пропан-1-ола указывает на прижизненное употребление алкоголя.

В случае 2 сравнительно высокая концентрация этанола (учитывается возраст ребенка) в крови при отсутствии его в моче и отсутствие пропан-1-ола не позволяют говорить ни о новообразовании, ни об употреблении алкоголя при жизни. Это один из случаев, когда результаты судебно-химического исследования свидетельствуют о вероятности внешнего загрязнения объекта этанолом (контаминации) при отборе образца.

В двух случаях (4 и 6) в крови обнаружен этанол в достаточно невысокой концентрации, что позволяет поставить вопрос о возможности новообразования. В случае 4 полученное соотношение концентраций спиртов свидетельствует об отсутствии новообразования, в случае 6 пропан-1-ол не обнаружен, в связи с чем следует рассматривать этанол в данных объектах как экзогенный. Однако следует отметить, что исследования образца одного биологического объекта (крови) недостаточно, чтобы с уверенностью исключить контаминацию и однозначно интерпретировать полученные результаты.

Таким образом, наши наблюдения открывают проблематику, связанную с определением этанола в биологических объектах и установлением возможности его новообразования. Для исключения случаев присутствия этанола в отбираемых пробах вследствие контаминации или процессов новообразования рекомендуется придерживаться следующих правил:

1. Следует отбирать не менее двух объектов для исследования на алкоголь (помимо крови это могут быть: моча, стекловидное тело, ликвор, мышца и др.). При этом более предпочтительными считаются моча и стекловидное тело, так как они наименее подвержены процессам брожения.

2. При отборе биологических материалов следует обратить внимание на соблюдение правил, исключающих контаминацию образцов этанолом и другими веществами, значимыми в судебно-химическом отношении (не допускать использование посуды из-под медицинских препаратов, использованных шприцев и т.п.).

3. Для уменьшения вероятности новообразований этанола в объектах необходимо создание условий хранения (холодильные камеры), своевременной доставки образцов на исследование (до 4-х суток), а также допустимость применения консервантов (в частности, фторидов калия и натрия), что приводит к необходимости пересмотра нормативов в части требований Порядка организации и производства судебно-медицинских экспертиз в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации, утвержденного приказом Минздравсоцразвития России от 12.05.2010 г. № 346н в отношении забора биологического материала для исследования на алкоголь.

Заключение

Описан метод определения новообразования этанола в биологических материалах с применением газовой хроматографии. Простота и доступность метода позволяют использовать его для проведения судебно-химических экспертиз при необходимости оценить полученные результаты исследования на этиловый спирт и установить пути его происхождения в биологическом материале. Однако наблюдаются случаи, где на основании проведенных исследований остается невозможным дать интерпретацию результатам. Для решения данной проблемы рекомендуется уделять повышенное внимание соблюдению правил в отношении отбора объектов для исследования на алкоголь.

Литература

1. Галицкий Ф.А. Экспертная оценка образования этанола в биологических объектах. – Акмола, 1997. – 80 с.
2. Boumba V.A., Ziavrou K.S., Vougiouklakis T. Biochemical pathways generating postmortem volatile compounds co-detected during forensic ethanol analyses // *Forensic Science International*. – 2008. – Vol. 174. – P. 133–151.
3. Kugelberg F.C., Jones AW. Interpreting results of ethanol analysis in post-mortem specimens: a review of the literature // *Forensic Science International*. – 2007. – Vol. 165. – P. 10–29.
4. Lewis R.J., Johnson R.D., Angier M.K, Vu N.T. Ethanol formation in unadulterated postmortem tissues // *Forensic Science International*. – 2004. – Vol. 146. – P. 17–24.
5. Nanikawa R., Ameno K., Okamoto S. Medicolegal studies on alcohol detected in dead bodies – alcohol levels in skeletal muscle // *Jap. J. Legal Med.* – 1982. – Vol. 36. – P. 329–334.
6. O’Neal C. L., Poklis A. Postmortem production of ethanol and factors that influence interpretation: A critical review // *Am. J. Forensic Med. Pathol.* – 1996. – Vol. 17. – P. 8–20.
7. Ziavrou K.S., Boumba V.A., Vougiouklakis T. Insights into the Origin of Postmortem Ethanol // *Int J. Toxicol.* – 2005. – Vol. 24. – P. 69–77.