

DOI: <https://doi.org/10.34883/PI.2021.10.4.004>
УДК 615.214.2:573

Вергун О.М.¹⁻³, Лишай А.В.^{3,4}, Гриншпан Д.Д.^{4,5}, Камышников В.С.⁶

¹ Государственный комитет судебных экспертиз Республики Беларусь, Минск, Беларусь

² Городская клиническая больница скорой медицинской помощи, Минск, Беларусь

³ Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

⁴ Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

⁵ Научно-исследовательский институт физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь

⁶ Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

Viarhun O.¹⁻³, Lishai N.^{3,4}, Hrynshpan D.^{4,5}, Kamishnikov V.⁶

¹ State Forensic Examination Committee of the Republic of Belarus, Minsk, Belarus

² City Clinical Hospital of Emergency Care, Minsk, Belarus

³ Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

⁴ Belarusian State University, Minsk, Belarus

⁵ Research Institute for Physical Chemical Problems of the Belarusian State University, Minsk, Belarus

⁶ Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

Оптимизация процедуры исследования содержания азалептина в биологических объектах методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

Optimization of the Procedure for the Study of Azaleptin Content in Biological Objects by Gas Chromatography with Mass Spectrometric Detection

Резюме

Цель. Создание на основе совершенствования (применительно к использованию в судебно-медицинской практике) процедуры подготовки проб биологического материала аналитически более надежного, чем существующие, метода обнаружения и количественного определения азалептина по технологии газовой хроматографии с масс-селективным детектированием.

Материал, реагентное и приборное обеспечение технологии исследования. Внутренние органы, волосы; азалептин (таблетки Борисовского завода медицинских препаратов, содержащие по 0,25 мг азалептина); метанол, изопропанол, хлороформ, этиловый эфир уксусной кислоты (этилацетат), гидроксид аммония (250 г/л квалификации х. ч.); наборы реагентов VetexQ (ИнтерЛабСервис, Россия) для экстракции токсических веществ из внутренних органов трупа по методу QuEChERS (США); газовый хроматограф Agilent 6890N Network GC System с масс-селективным детектором Agilent 5975C VL VSD (Agilent, США); сканирующий электронный микроскоп (СЭМ) LEO-1420 (Нидерланды); лазерный анализатор дисперсности MasterSizer 3000 (Malvern Panalytical, Великобритания).

Результаты. Разработаны методы подготовки проб тканей внутренних органов и других биологических объектов – волос (ногтей) с использованием в качестве сорбентов углей марки ОУ-А и АС.

Установлено, что для получения чистых извлечений из биологического материала в наибольшей мере подходит уголь марки АС, содержащий большое количество мезопор, способных сорбировать молекулы.

Показано, что использование активированного угля марки ОУ-А и экспериментального образца угля марки АС для очистки проб от соединений, дающих ложноположительные результаты при определении азалептина, возможно при их модификации с помощью Na-САЦ.

Экстракция азалептина из крови и мочи возможна благодаря модификации сорбционно-десорбционных свойств активированных углей под действием 8% (80 г/л) Na-САЦ.

Выводы:

1. Разработаны методы подготовки проб тканей внутренних органов и других биологических объектов (волос, ногтей) на основе использования сорбционных свойств модифицированных углей.
2. Для получения более чистых извлечений из исследуемого биологического материала наиболее подходящим оказался уголь марки АС, содержащий большое количество мезопор, способных сорбировать молекулы.
3. Установлено, что использование активированного угля марки ОУ-А и экспериментального образца угля АС в качестве сорбента для очистки проб, полученных из биологических образцов, возможно в случае осуществления их модификации с помощью Na-САЦ.
4. При экстракции азалептина из биологических образцов оптимальные сорбционно-десорбционные свойства активированных углей проявляются при введении 8% Na-САЦ.
5. Использование усовершенствованной в ходе выполнения работы процедуры подготовки проб биологического материала к исследованию позволило повысить точность и надежность выполнения газохроматографического определения азалептина в пробах биологических объектов.

Ключевые слова: судебная химическая экспертиза, биологический материал (волосы, ногти), сорбенты, модифицированные угли, газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием.

Abstract

Purpose. Creation, based on the improvement (as applied to the use in forensic practice), of a procedure for preparing samples of biological material that is analytically more reliable than the existing ones, a method for the detection and quantitative determination of azaleptin using gas chromatography technology with mass selective detection.

Material, reagent and instrumentation of the research technology. Internal organs, hair; azaleptin (tablets of the Borisov Plant of Medical Preparations containing 0.25 mg of azaleptin); methanol, isopropanol, chloroform, ethyl acetate (ethyl acetate), ammonium hydroxide (250 g / l, chemically pure grade; VetexQ reagent kits (Interlab, Russia) for the extraction of toxic substances from the internal organs of a corpse using the QuEChERS method (USA Gas chromatograph Agilent 6890N Network GC System with mass selective detector Agilent 5975C VL VSD (Agilent, USA) Scanning electron microscope (SEM) LEO-1420 (Netherlands) Laser dispersion analyzer MasterSizer 3000 (Malvern Panalytical, UK).

Results. Methods have been developed for the preparation of samples of tissues of internal organs and other biological objects - hair (nails) using OU-A and AS coals as sorbents. It has been established that coal of the AC grade, containing a large number of mesopores capable of absorbing molecules, is most suitable for obtaining pure extracts from biological material. It has been shown that the use of OU-A grade activated carbon and an experimental sample of AC grade coal for purification of

samples from compounds that give false positive results in the determination of azaleptin is possible when they are modified with Na-SAC. Extraction of azaleptin from blood and urine is possible due to the modification of the sorption-desorption properties of activated carbons under the action of 8% (80 g / l) Na-SAC.

Conclusions:

1. Methods have been developed for the preparation of samples of tissues of internal organs and other biological objects (hair, nails) based on the use of the sorption properties of modified coals.
2. To obtain purer extracts from the biological material under study, the most suitable was the AC grade coal containing a large number of mesopores capable of absorbing molecules.
3. It has been established that the use of OU-A activated carbon and an experimental sample of AC coal as a sorbent for cleaning samples obtained from biological samples is possible in cases of their modification using Na-SAC.
4. When extracting azaleptin from biological samples, the optimal sorption-desorption properties of activated carbons are manifested with the introduction of 8% Na-SAC.
5. The use of the procedure for preparing samples of biological material for research, improved during the execution of the work, made it possible to increase the accuracy and reliability of the gas chromatographic determination of azaleptin in samples of biological objects.

Keywords: forensic chemical expertise, biological material (hair, nails), sorbents, modified carbons, solid-phase and solid-liquid extraction, gas chromatography with mass-selective detection.

■ ВВЕДЕНИЕ

Азалептин ($C_{18}H_{19}ClN_4$) (син. – клозапин, лепонекс) – нейролептик с молекулярной массой 326,823 D, синтезированный в начале 60-х гг. XX в. По химической структуре он является трициклическим соединением, имеющим элементы сходства с трициклическими антидепрессантами и частично с бензодиазепиновыми транквилизаторами [6]. Биодоступность азалептина составляет 60–70%, период полувыведения из организма – от 6 до 26 ч, объем распределения – 1,6 л/кг. Период полувыведения азалептина из плазмы более короткий – от 12 до 16 ч. Пороговая концентрация азалептина в крови составляет $0,12 \pm 0,06$ мг/л, пороговая критическая – $1,01 \pm 0,7$ мг/л; а концентрация азалептина выше $3,5 \pm 1$ мг/л является смертельной [8]. Связывание азалептина с белками плазмы крови составляет около 95%, поэтому выделение его из биологического материала требует определенных условий [1, 6, 7]. Из организма человека выделяются преимущественно продукты его метаболизма в результате биотрансформации. Из-за побочных эффектов азалептин был запрещен к применению в некоторых странах, однако этот запрет в дальнейшем был снят, поскольку лекарственное средство оказалось эффективным в практике лечения психических заболеваний с менее выраженными побочными эффектами, характерными для употребления антипсихотиков [4].

В практике химико-токсикологического анализа отравление азалептином – явление нередкое. В случае превышения порога терапевтических концентраций в крови азалептин становится кардиотоксичным, поэтому при средней и тяжелой степени отравления препаратом ставится вопрос о проведении гемодиализа [2, 3]. В публикациях

различных авторов уделяется немалое внимание вопросам смерти, связанной с приемом азалептина. Большинство исследований посвящено анализу наступления смерти у пациентов с психическими заболеваниями, которые в ряде случаев принимали этот препарат в токсических дозах с целью суицида; при этом в качестве причин смерти рассматриваются в основном случаи миокардита и внезапной сердечной недостаточности [4, 5]. Вместе с тем, если судить по научным публикациям, другим причинам острого отравления азалептином не уделено должного внимания, в том числе с целью получения наркотического эффекта или криминальных отравлений. Недостаточно освещены многие вопросы интерпретации результатов химико-токсикологического или судебно-химического исследования. Сведения о токсических и смертельных отравлениях разнятся, а количественное содержание азалептина в крови не всегда соответствует состоянию пациента – отчасти за счет депонирования этого лекарственного средства в тканях и постепенного высвобождения его в кровь.

При подозрении на острое смертельное отравление в судебно-медицинской практике возникают спорные ситуации в решении вопросов о том, наступила ли смерть человека от отравления или вследствие других причин [4]. Примером этому могут служить материалы одного из уголовных дел. В лесу был обнаружен труп женщины, пролежавший год в сумке в лесу. Труп оказался без головы, с выраженными признаками мумификации, что затруднило идентификацию личности. Подозреваемый в преступлении первоначально дал показания о применении азалептина с целью притупления сознания жертвы, затем нанес ей ранения в область сердца отверткой и после смерти жертвы расчленил труп. Впоследствии от своих показаний отказался. Вопрос, поставленный перед экспертом, заключался в том, чтобы установить, была ли смерть жертвы спланированной; доказательством этого послужило наличие азалептина во внутренних органах трупа и отсутствие его в лобковых волосах. Процедура обнаружения азалептина в мумифицированных органах трупа не всегда оказывается удачной, тогда как установление наличия азалептина в волосах (ногтях) позволяет судить о длительном применении самой жертвой этого лекарственного средства. На основании выполненной судебно-химической экспертизы судебными органами был сделан вывод об однократном применении азалептина и планировании убийства.

Определение количественного содержания токсиканта в крови может дать истинное представление о тяжести химической травмы, однако существуют случаи, когда осуществить это оказывается невозможным: в таких ситуациях следует выбрать объекты, результаты исследования которых позволят сделать достоверные выводы. Что касается исследования азалептина, то при интерпретации результатов необходимо учитывать близость друг к другу терапевтических и токсических концентраций. Грань между ними еще более стирается в случае низкой избирательности определения искомого анализа вследствие мешающего его исследованию влияния ряда других веществ биологической матрицы, способных давать ложноположительный результат. В связи с этим представлялось целесообразным уделить внимание методам изолирования не только из внутренних органов трупа, но и из других его органических

объектов с последующей очисткой образцов от соэкстрактивных веществ. В этом отношении большие перспективы открывает использование активированных углей с различными модификационными добавками для повышения эффективности проведения пробоподготовки.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка надежной, обеспечивающей высокую точность исследования лабораторной технологии подготовки проб биологического материала (ткань внутренних органов трупа, волосы (ногти)) для обнаружения азалептина методом газовой хроматографии / масс-спектрометрии (ГХ/МС), основанным на использовании в процессе пробоподготовки активированных углей с различными модификационными добавками.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования явились: внутренние органы, волосы человеческого организма; стандартные и модельные (на матрице – донорской крови) растворы азалептина концентрации 0,3 и 0,8 мг/л; таблетки азалептина (клозапина) по 25,0 мг в каждой (ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов», Республика Беларусь).

Объекты исследования – сорбенты: активированный уголь марки ОУ-А (ГОСТ 4453–74) и экспериментальный мезопористый активированный уголь, полученный из гидролизного лигнина путем карбонизации и химической активации (АС). Изучаемые активированные угли (ОУ-А и АС) были дополнительно модифицированы различным количеством сульфата ацетата целлюлозы в виде натриевой соли (Na-САЦ): 0,2; 0,4; 0,8; 0,12; 0,16 г полимера на 1 г угля; наборы VetexQ (ИнтерЛабСервис, Россия) для экстракции токсических веществ из внутренних органов трупа по методу «Кетчерс» (QuEChERS, США).

Методы и оборудование: в работе использовался газовый хроматограф с масс-селективным детектированием GC-MS Agilent 7890B (Agilent, США); колонка капиллярная 30 м × 0,25 мм, ΔF=0,25 мкм (фаза HP-5MS UI); термостат колонок: 90 °С; 1,3 мин; 11 град/мин; 315 °С; 8,3 мин; газ-носитель – гелий, 1,5 мл/мин; инжектор Splitless, 280 °С; температура Transfer Line – 300 °С. Условия детектирования: масс-селективный детектор Agilent 5977A (Agilent, США), тип «квадруполь»; интервал сканируемых масс 40–570 m/z; температуры детектора: MS Source – 230 °С, MS Quad – 150 °С; Gain 1,0; при идентификации пиков веществ допускался временной интервал поиска ± 2%. Наряду с газовым хроматографом использовались также сканирующий электронный микроскоп (СЭМ) LEO-1420 (Нидерланды) и лазерный анализатор дисперсности MasterSizer 3000 (Malvern Panalytical, Великобритания), центрифуга Labofuge 200 Termo electron corporation (Германия).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подготовка к исследованию волос (ногтей): для удаления внешних загрязнений биологического материала его образцы сначала отмывали 3 раза 2 моль/л раствором хлористоводородной кислоты, затем 3 раза метанолом (3-й метанольный смыв отдельно сохраняли для осуществления контрольных исследований в случае обнаружения токсичных

веществ внутри волос (ногтей)). Объект высушивали, затем растирали биоматериал в ступке пестиком. Полученный гомогенат тщательно смешивали с 1 мл 6 моль/л хлористоводородной кислоты в течение 6 ч при температуре 80 °С. Надосадочную жидкость отделяли, образец промывали 1 мл дистиллированной воды. Объединенную водную вытяжку подщелачивали раствором гидроксида аммония 250 г/л до pH=10 и экстрагировали 3 раза по 2 мл смеси хлороформ:изопропанол (9:1). Объединенные экстракты упаривали досуха во флаконе до сухого остатка. Сухой остаток реконструировали в 0,5 мл этилацетата, тщательно перемешивали, закрывали крышкой (обкатывали колпачком) с септой. Далее раствор исследовали ГХ/МС-методом (скрининговый метод) и отдельными SIM-методами на целевые вещества. Характеристические ионы и время удерживания азалептина при ГХ/МС-исследовании приведены в табл. 1.

На 2-м этапе исследования по вышеописанной методике готовили модельные образцы: к 30 мг навески волос (ногтей) добавляли стандартные растворы азалептина в концентрации 0,3 мг/л (минимальная терапевтическая) и 0,8 мг/л (максимальная терапевтическая, минимальная токсическая) [8]. Для повышения качества подготовки (очистки) биологических объектов в каждый образец волос до проведения кислотного гидролиза вносили вместе с метанолом по 1 г изучаемых активированных углей. Качество очистки образцов оценивали по площади пиков азалептина при ГХ/МС-исследовании (табл. 2). Уголь ОУ-А – осветляющий активный древесный порошкообразный – был получен из древесины березы под воздействием водяного пара при температурах 800–900 °С (произведен ОАО «Сорбент», г. Пермь, Россия), а экспериментальный активированный уголь АС – из гидролизного лигнина путем карбонизации и химической активации в учреждении БГУ «НИИ физико-химических проблем» (г. Минск, Беларусь). Оба этих угля были дополнительно модифицированы водорастворимым производным целлюлозы (сульфатом, ацетатом) в форме натриевой соли (Na-CAЦ). Для этого использовали водные растворы Na-CAЦ концентрации 16% (массовой). Характеристики поровой структуры и величины удельной поверхности образцов угля (АУ) были определены по данным низкотемпературной адсорбции-десорбции азота (ASAP2020, Micromeritics, США). Дисперсный состав изучаемых углей определяли с помощью лазерного анализатора дисперсности MasterSizer 3000. Формула и количественные характеристики модифицированного угля Na-CAЦ представлены на рис. 1.

Таблица 1
Масс-спектральные характеристики азалептина SIM-метода ГХ/МС

Table 1
Gas Chromatographic and mass spectral characteristics of azaleptin

Лекарственное средство	m/z и интенсивность основных ионов	Время удерживания, мин	Интервал регистрации ионов, мин
Азалептин	243–87%, 245–6%, 256–4%, 192–3%	5,8	2–10

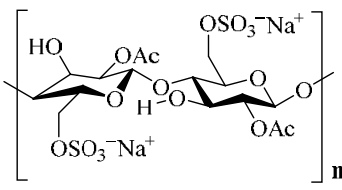
<p>Составное повторяющееся звено Поли-(1β→4)-(2-О-ацетил-6-сульфо-D глюкопираноза)</p>	
<p>Средневязкостная молекулярная масса $\langle M_n \rangle$</p>	<p>36 000</p>
<p>pH 1% водного раствора</p>	<p>6,7±0,1</p>
<p>Содержание сульфатных групп, %</p>	<p>29,0±0,1</p>
<p>Содержание ацетатных групп, %</p>	<p>17,0±0,1</p>

Рис. 1. Характеристики Na-CAЦ

Fig. 1. Characteristics of Na-SAC

Морфологию поверхности образцов исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) LEO-1420 (Нидерланды) (рис. 2).

Рис. 2 позволяет убедиться в наличии в углях микропор, а также мезопор, которые обуславливают капиллярно-конденсаторные процессы сорбирования мешающих веществ биологической матрицы при выделении токсиканта.

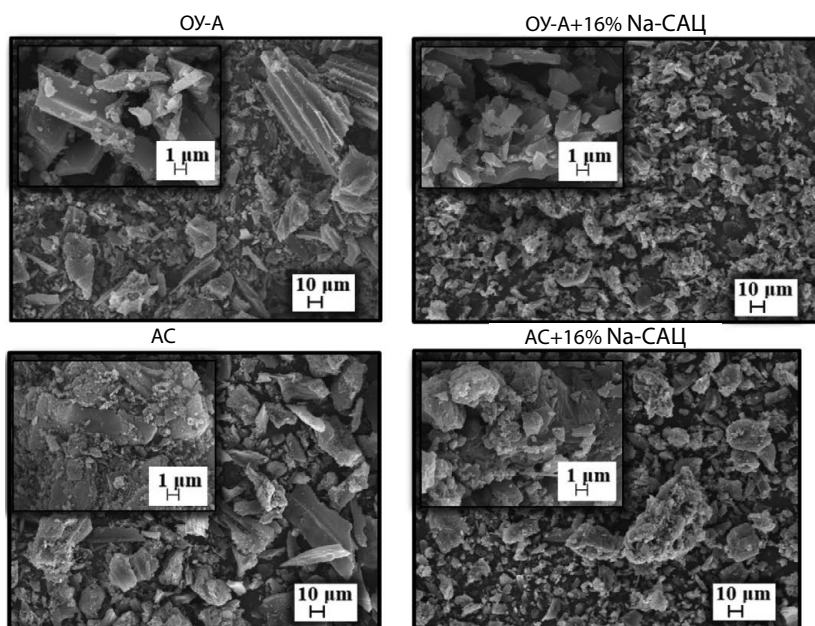


Рис. 2. СЭМ-изображение активированного угля

Fig. 2. SEM image of activated carbon

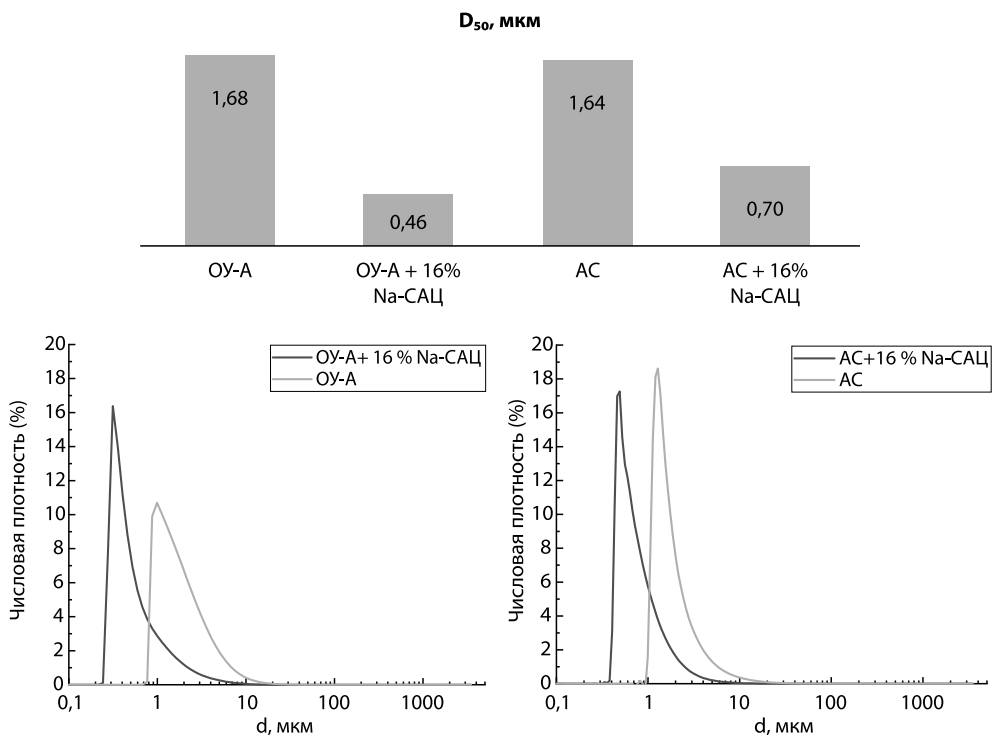


Рис. 3. Распределение по размерам частиц исходных и модифицированных активированных углей

Fig. 3. Particle size distribution of the initial and modified activated carbons

С помощью метода лазерной дифракции было изучено распределение частиц углей по размерам (рис. 3).

Полученные данные позволили судить об унимодальном характере распределения для обоих углей. Для модифицированных углей характерен меньший размер частиц. Результаты исследования их сорбционных свойств приведены в табл. 2.

Таблица 2
Интенсивность ионного тока азалептина в образцах модельных растворов с использованием различных углей

Table 2
The intensity of the ion current of azaleptin using various carbons for purification

Сорбент	Площадь пика при концентрации азалептина 0,3 мг/л, мВт	Площадь пика при концентрации азалептина 0,8 мг/л, мВт	Площадь пика при исследовании волос труппа, мВт
Без очистки	10 912	987 122	5145
ОУ-А	6345	634 149	1345
ОУ-А + 16% Na-CALЦ	7387	699 267	3456
АС	11 176	997 342	5149
АС + 16% Na-CALЦ	11 453	998 987	5965

При оценке результатов исследования можно сделать вывод о том, что для получения более чистых извлечений из биологического материала подходит уголь марки АС, содержащий большое количество мезопор, способных сорбировать молекулы. Установлено, что эффективное использование активированного угля марки экспериментального образца АС в качестве сорбента для очистки проб при экстракции азалептина из биологических образцов (волос) возможно в случае их модификации с помощью Na-САЦ.

На 3-м этапе исследования для получения извлечений из тканей органов трупа использован метод QuEChERS, который включает стадию жидкостной экстракции и последующую твердофазную очистку экстракта. Стадия твердофазной очистки в методе QuEChERS выполняется в дисперсионном формате: в соответствующий набор реагентов входят пробирки различного объема (2 и 15 мл) с насыпным сорбентом. Природа сорбента отличается в зависимости от вида исходной матрицы (объекта исследования). Наркотические средства, психотропные и лекарственные вещества при наличии наборов VetexQ Tox для экстракции методом QuEChERS могут быть выделены из тканей органов в соответствии с инструкцией производителя, что позволяет устранить матричный эффект путем удаления из проб полярных органических кислот, а также некоторых сахаров и липидов в низких и средних концентрациях. Метод был апробован на специально подготовленных модельных смесях, в которых затравка клозапином в концентрации 0,8 мг/л соответствовала его максимальной, токсической концентрации.

Подготовку проб осуществляли, придерживаясь схемы процедуры скрининга наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ из биологических образцов (тканей) с помощью наборов VetexQ Tox, представленной в рекомендации организации-производителя (рис. 4).

На 4-м этапе исследовательской работы готовые патроны VetexQ по методу «Кетчерс» были заменены исследуемыми углями ОУ-А и АС. Причем каждый из исследуемых углей (ОУ и АС) был модифицирован различным количеством сульфата ацетата целлюлозы в виде натриевой соли (Na-САЦ) в количестве 0,2; 0,4; 0,8; 0,12; 0,16 г полимера на 1 г угля. Результаты оценивали по проценту сорбирования модельной смеси (с концентрацией азалептина 0,8 мг/л) и в дальнейшем – по доле (в процентах) снятия (десорбции) азалептина с углей.

С целью оценки полученных результатов были построены калибровочные графики содержания азалептина в биологическом материале. Расчет его количественного содержания производился методом абсолютной калибровки. Количественное определение осуществляли с использованием пакета программ G1701DA MSD ChemStation Agilent (США). Расчет концентрации азалептина проводили по формуле:

$$C_x = (Q \cdot 1000) / (a \cdot 1000 - 1000),$$

где C_x – концентрация азалептина в объекте, мг/л;

Q – количество азалептина, полученное из калибровочного графика, мг/л;

a – объем биоматериала, взятого на исследование, мл.

1. 5 г ($\pm 0,1$ г) гомогенизированного биологического образца помещают в пробирку для экстракции
2. Вводят по 50 мкл внутренних стандартов (для оценки качества экстракции). В конкретном случае: этилморфина (20 мкг/л) и гексенала (20 мкг/л) по 100 мкг/мл
3. Приливают 5 мл ацетонитрила и интенсивно встряхивают 1 мин
4. Добавляют 0,1 мл концентрированной хлористоводородной кислоты
5. Высыпают порцию буферной соли из наборов для экстракции VetexQ Tox, обрабатывают 20 мин в УЗ-ванне и центрифугируют в течение 10 мин при угловой скорости 4000 об/мин центрифуги типа Labofuge 200 Termo electron corporation
6. Аликвоту – 3 мл верхнего слоя переносят в пробирку емкостью 15 мл, содержащую компоненты набора для очистки
7. Смесь встряхивают 5 мин и центрифугируют 10 мин при 2000 об/мин на центрифуге типа Labofuge 200 Termo electron corporation (Германия)
8. 1 мл экстракта переносят в вials, добавляют 20–25 мг K_2CO_3 и 80 мкл йодметана
9. Смесь выдерживают 30 мин при 60 °С и затем упаривают досуха в потоке воздуха при 40–50 °С
10. Сухой остаток реконструируют в 400 мкл безводного этилацетата для последующего анализа
11. Проводят ГХ/МС-анализ наркотических и психотропных веществ кислого и нейтрального характера и их метаболитов в виде метилловых производных
12. 1 мл экстракта переносят в вials и упаривают досуха потоком воздуха при 40–50 °С; к сухому остатку добавляют 50 мкл смеси уксусного ангидрида с пиридином (3:2)
13. Смесь нагревают 20 мин при 80 °С и затем упаривают досуха в потоке воздуха при 40–50 °С
14. Сухой остаток реконструируют в 400 мкл этилацетата для последующего анализа
15. Проводят ГХ/МС-анализ наркотических и психотропных веществ основного и нейтрального характера и их метаболитов в виде ацетилированных производных

Рис. 4. Схема для экстракции токсических веществ из внутренних органов трупа VetexQ по методу «Кетчерс» (ИнтерЛабСервис, Россия)

Fig. 4. Scheme for the extraction of toxic substances from the internal organs of a corpse by the method QuEChERS

Полученные градуировочные графики были линейными в диапазоне концентраций 0,1–1,0 мг/л, при этом значения коэффициентов линейной аппроксимации составляли не менее 0,996. Максимальные внутрисерийные погрешности определения анализируемого вещества не превышали 10,2%. Идентификацию азалептина проводили, сравнивая величины m/z и относительные интенсивности молекулярных ионов, соответствующих анализируемому веществу, с библиотеками масс-спектров (табл. 1).

Подготовку проб модельной смеси проводили по следующему протоколу: исследуемые угли: 1) 6 образцов ОУ-А: без модификации и ОУ-А, модифицированный Na-САЦ в количестве 0,2; 0,4; 0,8; 0,12; 0,16 г

полимера на 1 г угля; 2) 6 образцов АС: без модификации и АС, модифицированный Na-САЦ 0,2; 0,4; 0,8; 0,12; 0,16 г полимера на 1 г угля. Каждую пробу модельной смеси исследовали отдельно, пропуская через патрон самотеком. Далее через патрон пропускали самотеком 3 мл дистиллированной воды. Затем сорбент высушивали при пониженном давлении на протяжении 20 мин. Для осуществления процесса элюирования через патрон пропускали 3 мл смеси растворителей: наиболее эффективной оказалась смесь дихлорметан-изопропанол-гидроксид аммония 25 мг/л (2:1:0,1). Высушивание элюата достигалось удалением органических растворителей в токе холодного воздуха. Сухой остаток растворяли в 500 мкл хлороформа и исследовали методом ГХ/МС. Полученные результаты приведены в табл. 3.

Из данных табл. 3 видно, что лучшие результаты по очистке проб и, как следствие, лучшее сорбирование азалептина из биологических объектов показал активированный уголь марки АС. Объяснить данный факт можно тем, что АС является активированным углем, содержащим большое количество мезопор, которые, в свою очередь, способны очень эффективно сорбировать молекулы таких размеров, как азалептин. На степень связывания может оказывать влияние и то, что ОУ-А является активированным углем с рН в диапазоне 9,0–10,0, а экспериментальный активированный уголь содержит значительное количество кислотных групп, в силу чего его рН находится в диапазоне 3,0–4,0.

В результате проведенных исследований установлено, что при модификации активированных углей Na-САЦ наблюдается увеличение адсорбции азалептина пропорционально увеличению содержания полимерной добавки. При этом следует отметить, что оптимальное соотношение показателей сорбции-десорбции характерно для 8% концентрации полимера. Статистическая обработка результатов эксперимента показала, что статистические различия в показателях эффективности сорбирования ОУ-А и АС при введении Na-САЦ снижаются с увеличением относительного содержания полимерного модификатора. При добавлении к углям полимера (из расчета 0,16 г полимера на 1 г угля) различия в проценте сорбирования оказались статистически незначимыми.

Таблица 3
Показатели, характеризующие процессы сорбции и десорбции азалептина на ОУ-А и АС

Table 3
Sorptions and desorption of azaleptin on OU-A and AC

Концентрация Na-САЦ, %	ОУ-А		АС	
	Сорбирование, %	Процент десорбция, %	Процент сорбирование, %	Процент десорбция, %
0	26,54±0,47*	18,25±0,34	27,15±0,53	29,90±0,59
2	29,32±0,64	18,52±0,35	33,93±0,67	30,55±0,60
4	34,18±0,66	24,65±0,46	40,70±0,80	31,20±0,61
8	86,94±1,67	24,04±0,45	93,14±1,83	32,50±0,64
12	93,56±1,93	22,68±0,43	97,64±1,92	31,13±0,61
16	97,38±1,84	24,62±0,46	99,83±1,96	33,07±0,65

Примечания: *n=5; достоверность различий $p < 0,05$; статистическая обработка проводилась с применением U-критерия Манна – Уитни.

■ ВЫВОДЫ

1. Разработаны методы подготовки проб тканей внутренних органов и других биологических объектов (волос, ногтей) на основе использования сорбционных свойств модифицированных углей.
2. Для получения более чистых извлечений из исследуемого биологического материала наиболее подходящим оказался уголь марки АС, содержащий большое количество мезопор, способных сорбировать молекулы.
3. Установлено, что использование активированного угля марки ОУ-А и экспериментального образца угля АС в качестве сорбента для очистки проб, полученных из биологических образцов, возможно в случае осуществления их модификации с помощью Na-САЦ.
4. При экстракции азалептина из биологических образцов оптимальные сорбционно-десорбционные свойства активированных углей проявляются при введении 8% Na-САЦ.
5. Использование усовершенствованной в ходе выполнения работы процедуры подготовки проб биологического материала к исследованию позволило повысить точность и надежность выполнения газохроматографического определения азалептина в пробах биологических объектов.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования – Гриншпан Д.Д., Лишай А.В.; обзор литературы – Лишай А.В.; разработка метода подготовки проб (волос, ногтей), метода ГХ/МС – Вергун О.М.; изучение сорбционных свойств сорбентов – Вергун О.М., Лишай А.В.; редактирование – Камышников В.С.

Authors' contribution: concept and design of the study – Grinshpan D., Lishai A.; literature review – Lishai A.; development of a sample preparation method (hair, nails), GC/MS method – Vergun O.; study of sorption properties of sorbents – Vergun O., Lishai A.; editing – Kamyshnikov V.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Vidal (2005) *The Vidal Handbook. Medicines in Russia*. (in Russian)
2. Romanova O.L., Stepanova E.S., Barseghyan S.S., Sundukov D.V., Chistyakov V.V. (2016) Simultaneous detection of clozapine, norklozapine, clozapine-n-oxide in blood serum and organs. *Pharmacy scientific-practical journal*, no 5, pp. 188–194.
3. Veselkina O.V., Klevno V.A., Krupin N.A., Kashchanov V.U. (2013) Detection of clozapine in a forensic examination of a corpse: circumstances of death, anamnestic information, toxicological data. *Bukovynskiy medical visnik*, vol. 17, no 3 (67), part 1, pp. 30–32.
4. Shigeev S.V., Ivanova N.A., Ivanov S.V. (2013) Clozapine poisoning: theoretical aspects and forensic medical assessment. *Forensic medical examination*, no 6.
5. Mashkovsky M.D. (2005) *Medicines*. Moscow. (in Russian)
6. Ministry of Health of the Republic of Belarus (2015) *On establishing the republican list of narcotic drugs, psychotropic substances and their precursors subject to state control in the Republic of Belarus. Resolution of the Ministry of Health of the Republic of Belarus no 19 of February 11*.
7. Molina D.K. *Handbook of forensic toxicology for medical examiners*, p. 383.

Подана/Submitted: 04.10.2021

Принята/Accepted: 01.12.2021

Контакты/Contacts: vom_v@tut.by