

ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОЧИСТКИ КОСТЕЙ ОТ МЯГКИХ ТКАНЕЙ С ЦЕЛЬЮ ИССЛЕДОВАНИЯ ХАРАКТЕРА КРАЕВ ПЕРЕЛОМОВ

Колесник О. А., Фашченко А. В.

Резюме. Работа посвящена экспресс-методу очистки костей от мягких тканей с целью исследования характера краев переломов, длительность которого составляет всего 20 минут. Для мацерации предложено использовать химическое соединение – раствор едкого калия (гидроксида калия, KOH), что является альтернативой мацерации костей в проточной теплой воде, выдержке их в термостате в течение нескольких суток и механической мацерации. Предложенная методика требует минимум времени и усилий эксперта, является простой, удобной и экономически выгодной.

Ключевые слова: кости, перелом, мацерация, очистка от мягких тканей, раствор едкого калия, KOH, химическая мацерация.

EXPRESS METHOD OF BONES CLEANING FROM SOFT TISSUES AIMED TO EXAMINE TYPE OF FRACTURE EDGES

Kolesnik O. A., Fashchenko A. V.

Summary. The paper is devoted to the express method of bones cleaning from soft tissues aimed to examine type of fracture edges; its duration is only 20 minutes. For maceration is proposed to use chemical compound – solution of potassium hydroxide (potassium hydrate, KOH), that is the alternative of bones maceration in running warm water, their holding in thermostat during several days and mechanical maceration. Suggested method requires minimum of time and efforts of specialist, is simple, convenient and cost-efficient.

Key words: bones, fracture, maceration, cleaning from soft tissues, solution of potassium hydroxide, KOH, chemical maceration.

УДК 615.07 - 615.099 /340.67

ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДУ ТВЕРДОФАЗНОЇ ЕКСТРАКЦІЇ ПРИ ДІАГНОСТИЦІ СМЕРТЕЛЬНИХ ОТРУЄНЬ ПЕСТИЦИДАМИ МЕТОДОМ ГХ-МС

©Шевчук М. М.^{1,2}, Тарнавська Я. Г.¹, Ковалишин В. М.¹, Галькевич І. Й.²

Львівське обласне бюро судово-медичної експертизи¹
Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького²

Резюме: В роботі показано вплив підготовки проби на результат визначення карбофурану методом ГХ-МС в біологічному матеріалі при смертельних отруєннях. Показано, що застосування методу твердофазної екстракції дозволяє підвищити чутливість визначень до 15 разів, порівнюючи із очисткою проб в тонкому шарі сорбенту.

Ключові слова: карбофуран, ГХ-МС, підготовка проби, твердофазна екстракція.

ВСТУП. В практичній роботі токсикологічних відділень бюро судово-медичної експертизи для підтвердження наявності отрути в трупному матеріалі застосовуються хроматографічні методи аналізу, серед яких вагоме місце займає газова хроматографія (ГХ) та вискоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ). Оснащення приладів мас-детекторами дозволяє з вищою достовірністю виявляти токсичні компоненти та значно прискорювати час виконання судово-хімічної експертизи. Сучасні хроматографи оснащені програмним забезпеченням та бібліотекою мас-спектрів, що спрощує проведення ідентифікації отруйних сполук і тому ГХ-МС та ВЕРХ-МС є одними із оптимальних методів виявлення та кількісного визначення різних речовин в біологічних об'єктах [4, 9].

По своїй суті судово-токсикологічне дослідження включає етапи ізолювання, очистки проби, концентрування та підтвердження наявності отруйної сполуки хімічними та фізико-хімічними методами аналізу. Проте при застосуванні ГХ-МС чи ВЕРХ-МС експерти зустрічаються з проблемами, які зумовлені впливом компонентів біологічної проби на мас-спектрометричне визначення досліджуваних речовин. При настоюванні трупних органів з ізолюючими розчинами у витяжки потрапляють білки, пігменти, ферменти, жирові компоненти, жовчні кислоти та інші супутні речовини. Після концентрування отруйних сполук рідинною екстракцією супутні домішки потрапляють в органічні екстракти і впливають на результат визначення [3].

Компоненти біологічної проби, що попадають в дозатор газового хроматографа, також переходять в газоподібний стан, потрапляють в мас-детектор з досліджуваними сполуками і впливають на процес іонізації в мас-спектрометрі. В результаті цього процес іонізації досліджуваної сполуки послаблюється. Одночасно домішки біологічної проби впливають на величину сигналу. Особливо наглядно це спостерігається при аналізі однієї і тієї ж речовини в чистому вигляді та ізольованої з біологічного матеріалу [5,8]. Домішки органічної природи, що містяться в досліджуваних пробах можуть адсорбувати на своїй поверхні сполуки, в результаті чого основна частина досліджуваної речовини стає нелеткою, її перехід в газоподібний стан сповільнюється і це впливає на кількість заряджених іонів, які потрапляють в детектор. Ендогенні компоненти біологічної проби в ряді випадків конкурують з молекулами досліджуваних речовин за заряд на поверхні, а фрагменти білків, ліпіди, ферменти та інші біологічні компоненти теж елюються з хроматографічної колонки і викликають зміну сигналу досліджуваного компонента, що приводить до послаблення сигналу [6,7].

У вітчизняних токсикологічних відділеннях бюро судово-медичної експертизи очистка проб проводиться в основному методом хроматографії в тонких шарах сорбенту (ТШХ) з наступним елююванням компонентів із сорбенту. При елююванні речовини із хроматографічних пластинок в елюати потрапляють компоненти біологічної проби, реагенти, що використовувались для модифікації сорбенту та мікрочастинки сорбенту, які адсорбують своєю поверхнею досліджувані речовини, що приводить до зменшення чутливості мас-спектрометричного визначення [1,2]. Тому мета роботи полягала порівнянні результатів судово-хімічної експертизи однієї і тієї ж біологічної проби методом ГХ-МС із застосуванням двох способів очистки – методами ТШХ та твердофазної екстракції (ТФЕ).

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.

Об'єктом дослідження були внутрішні органи громадянина Д. (печінка, нирки, шлунок та тонкий кишківник), які були направлені у судово-токсикологічне відділення Львівського обласного бюро судово-медичної експертизи на предмет визначення фосфорорганічних пестицидів. Для досліджень було відібрано по 100 г кожного із біологічного матеріалу. Органи подрібнювали, підкисляли 25% розчином сульфатної кислоти до рН 2-3 (за універсальним індикатором) та тричі настоювали з гексаном. Перше настоювання тривало 2 год, наступні два – по 1 год. Гексанові витяжки об'єднували, фільтрували через фільтр, на який вносили безводний сульфат натрію. Для досліджень відбирали об'єм гексанової витяжки, який еквівалентний 25 г біологічного органу. Гексанові розчини випаровували досуха, а сухі залишки розчиняли у 2 мл 96 % етанолу (х.ч.).

Після серії попередніх досліджень, які полягали у скринінгу пестициду методом хроматографії в тонких шарах сорбенту, було встановлено, що в досліджуваних пробах міститься карбофуран.

Підготовка проби методом ТШХ. По 10 мкл етанольних розчинів із кожного органу наносили на хроматографічні пластинки «Сорбфіл» (10 x 10 см). Паралельно наносили 10 мкл етанольного розчину карбофурану (1 мг/мл). Пластинки хроматографували у системі розчинників гексан-ацетон (1:2). Після хроматографування пластинки опромінювали УФ-світлом ($\lambda = 254$ нм). Плями карбофурану та плями досліджуваних проб характеризувались рожево-фіолетовим забарвленням, а після обробки пластинок розчином о-толідину в ацетатній кислоті з наступною обробкою 10 % розчином йодиду калію спостерігались плями синьо-фіолетового кольору із значенням R_f 0,50–0,52. Після цього на чотири пластинки «Сорбфіл» наносили по 0,5 мл спиртових розчинів сухих залишків у вигляді смуги довжиною 4 см та шириною 5 мм і хроматографували у тій же системі розчинників. Фронт системи розчинників 9 см. Із зони, що відповідає досліджуваній сполуці, знімали шар сорбенту та двічі елюювали пестицид метанолом, порціями по 2 мл. Метанольні елюати фільтрували і випаровували розчинник досуха. Сухі залишки розчиняли в 500 мкл метанолу. Ці розчини використовували для дослідження методом ГХ-МС.

Підготовка проби методом твердофазної екстракції. Паралельно проводили очистку методом твердофазної екстракції на катриджах Supel-Selekt HLB (30 mg, Supelco, U.S.A.). Для цього відбирали по 0,5 мл спиртових розчинів сухих залишків, упарювали до об'єму 0,25 мл та розводили водою до 1 мл. Дані розчини пропускали через сорбент. Катриджі перед внесенням проби кондиціонували 1 мл метанолу та 1 мл води. Після завантаження проб, сорбент промивали 2 мл універсального буферного розчину (рН = 6,85), 2 мл води та висушували 2 хв в потоці азоту. Елюювали пестицид 1 мл метанолу. Метанол відповідав кваліфікації Graduate for HPLC (Merck). Дані проби аналізували методом ГХ-МС.

Умови хроматографічного аналізу. Аналіз проводили на хроматографі Agilent 6890 N, в комплект до якого входить мас-селективний детектор серії 5978 BMSD Agilent (електронна іонізація). Умови детектування: енергія іонізації 707 В, сканування проводилося в режимі від 40-750 атомних одиниць маси (m/z). При аналізі застосовували капілярну колонку HP-1 Methyl Siloxane, (30 м x 0,25 мм, товщина плівки нерухомої фази 0,25 мкм). Початкова температура колонки 90 °С, витримка 2 хв, з подальшим підвищенням температури із швидкістю 20 °С/хв до 300 °С та витриманням кінцевої температури протягом 10 хв. Температура інжектора 250 °С, температура інтерфейсу 280 °С.

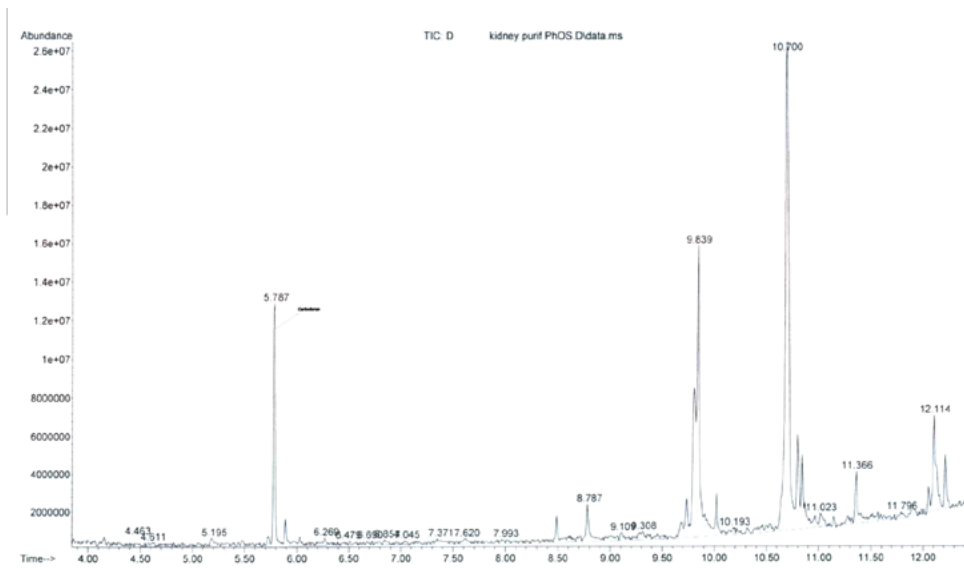
Газ-носієй (гелій) подавався в режимі постійного потоку із швидкістю 1,2 мл/хв, а об'єм введеної проби становив 5 мкл.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.

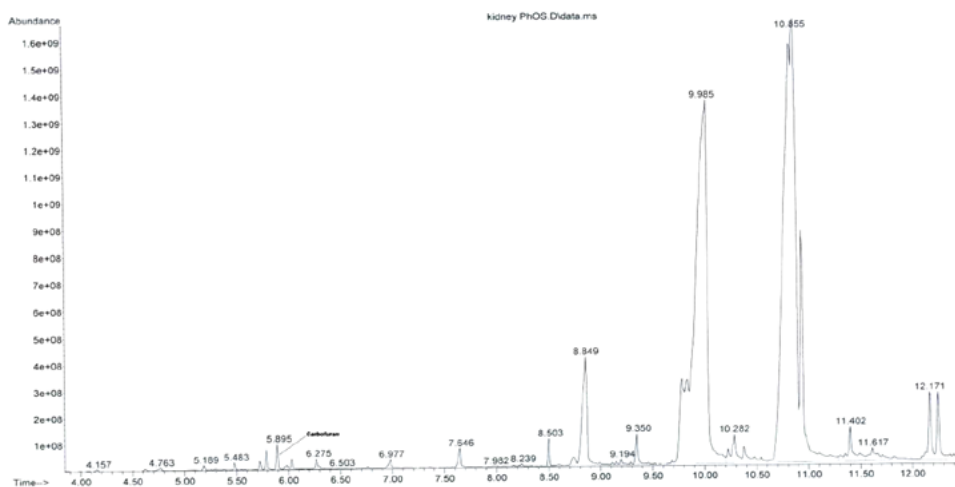
На рисунку 1 наведено характер хроматограм, отриманих при дослідженні проб, вилучених з нирки та очищених методом ТШХ та твердофазної екстракції. Хроматограми проб із інших органів були практично ідентичними. Ідентифікацію пестициду проводили за часом утримування ізольованої з біологічного матеріалу речовини ($t_R = 5,787 \pm 0,108$ хв у всіх досліджуваних пробах біологічних зразків). Шляхом співставлення мас-спектрів пестициду з мас-спектрами стандартів, наведених у бібліотечних даних NISTOS та WILEJ, встановлено, що в досліджуваних зразках біологічного матеріалу міститься карбофуран, пестицид із групи карбаматів:

[(*o*-2,3-дигідро-2,3-диметилбензофураніл-7)метилкарбамат].

Як показують отримані результати, при застосуванні методу твердофазної екстракції вдається досягнути вищого ступеня очистки біологічної проби. Чутливість методики виявлення карбофурану методом ГХ-МС при цьому зросла у 15 разів, порівнюючи з результатами підготовки проби із застосуванням методу ТШХ. Компоненти біологічної проби практично повністю усуваються при очистці методом ТФЕ і дозволяють практично із 90-95% достовірністю виявити карбофуран за мас-спектрами (рис. 2).

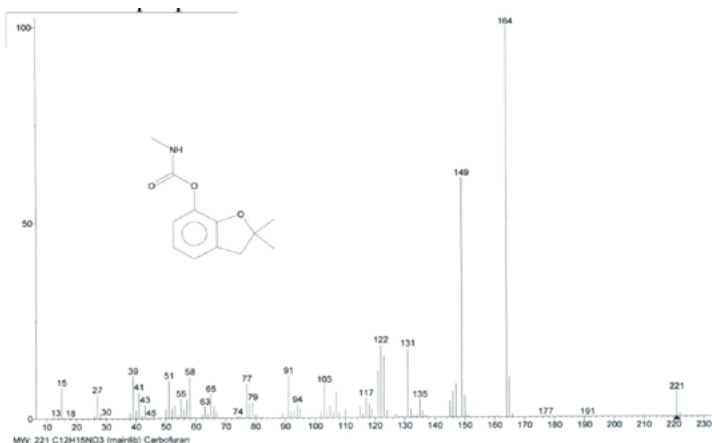


I

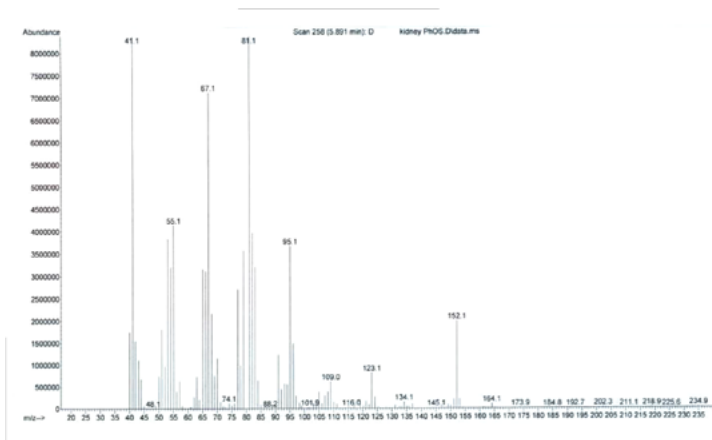


II

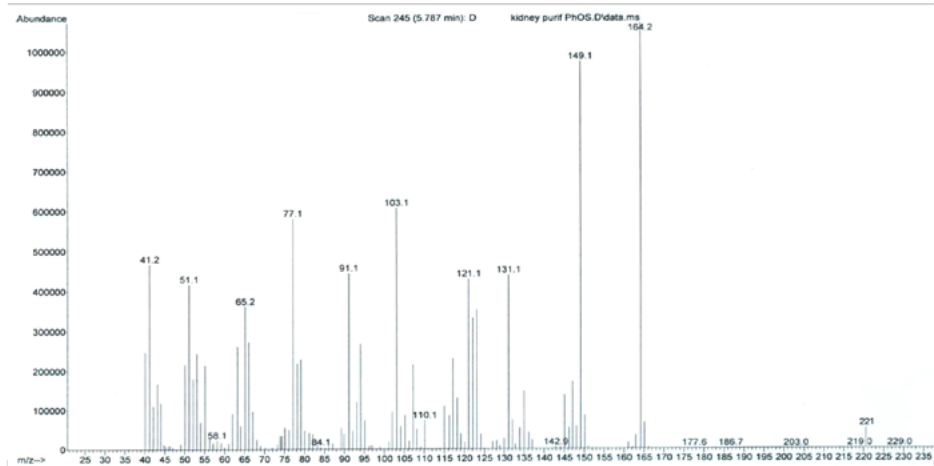
Рис. 1. Хроматограми, отримані при виявленні карбофурану ізольованого з нирок, із застосуванням очистки: I – на катриджах «Supel-Selekt», II – на пластинках «Сорбфіл».



1



2



3

Рис. 2. Мас-спектри карбофурану: 1 – стандартного зразку; 2 – проба, очищена методом ТШХ; 3 – проба, очищена методом ТФЕ.

ВИСНОВКИ

1. Запропоновано спосіб підготовки проби до аналізу методом ГХ-МС при дослідженні отруєння карбофураном із використанням твердофазної екстракції на катриджах “ Supel-Selekt ”.

2. Проведено порівняльну оцінку двох способів очищення проб із біологічного матеріалу на якість судово-токсикологічних експертних досліджень. При застосуванні очистки проби методом ТФЕ чутливість методики ГХ-МС визначення зростає в 15 разів.

Література

1. **Горбачева Н.А.** Применение ТСХ-анализа при судебно-химическом исследовании мочи на опиаты / Н.А. Горбачева, А.М. Орлова А.М. // Судебно-медицинская экспертиза. – 2003. – № 3. – С. 34.
2. **Карташов В.А.** Определение оланзапина в трупной крови и ткани печени / В.А. Карташов, Л.В. Чернова // Судебно-медицинская экспертиза. – 2014. – №4. – С. 40-43.
3. **Cappiello A.** Overcoming Matrix Effects in Liquid Chromatography–Mass Spectrometry / A. Cappiello, G. Famigliani, P. Palma [et. al.] // Anal. Chem. – 2008.– Vol.80, N23.- P. 9343–9348.
4. **Kwon H.** Variability of matrix effects in liquid and gas chromatography-mass spectrometry analysis of pesticide residues after QuEChERS sample preparation of different food crops / H. Kwon, S.J. Lehotay, L. Geis-Asteggiante // J Chromatogr A. - 2012.- Vol.1270.- P. 235-245.
5. **Li Y.** Compensation for matrix effects in the gas chromatography-mass spectrometry analysis of 186 pesticides in tea matrices using analyte protectants/ Y.Li, X.Chen, C.Fan, G.Pang // J Chromatogr A. – 2012.– Vol. 30. – P.131-142.
6. **Matuszewski B.K.** Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS./ B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng // Anal Chem.– 2003.- Vol.75.- N 13.– P. 3019-3030.
7. **Taylor P.J.** Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry / P. J.Taylor // Clin Biochem. – 2005. – Vol. 38.- N 4. – P.328-334.
8. **Trufelli H.** An overview of matrix effects in liquid chromatography–mass spectrometry / H. Trufelli, P. Palma, G. Famigliani [et. al.] // Mass Spectrometry Reviews. – 2011.– Vol. 30.- N 3.– P. 491–509.
9. **Valente N.I.** Analysis of organophosphorus pesticides in whole blood by GC-MS- μ ECD with forensic purposes / N.I. Valente, S. Tarelho, A.L. Castro [et.al.] // J Forensic Leg Med. – 2015.- Vol. 33.– P.28-34.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ СМЕРТЕЛЬНЫХ ОТРАВЛЕНИЙ ПЕСТИЦИДАМИ МЕТОДОМ ГХ–МС

Шевчук Н.Н., Тарнавская Я.Г., Ковалишин В.М., Галькевич И.И.

Резюме. В работе показано влияние подготовки пробы на результат определения карбофурана методом ГХ-МС в биологическом материале при смертельных отравлениях. Показано, что применение метода твердофазной экстракции позволяет увеличить чувствительность определения до 15 раз, в сравнении из очисткой проб в тонком слое сорбента.

Ключевые слова: карбофуран, ГХ–МС, подготовка пробы, твердофазная экстракция.

USING SOLID PHASE EXTRACTION FOR DETERMINATION OF PESTICIDES BY GC-MS METHOD IN POSTMORTEM CASES

Shevchuk N.N., Tarnavska J.G., Kovalyshyn V.M., Halkevych I.Y.

Abstract: The paper presents results of preparing the samples for GC-MS determination of carbofuran in biological tissue in postmortem cases. Results shown, that the using of solid phase extraction method increases the sensitivity of detection of up to 15 times, in comparison of the samples purified in a thin layer of sorbent.

Key words: carbofuran, GC-MS, preparation samples, solid phase extraction.