



УДК 543.544.943.3.068.7:547.551.53

Применение хроматографических методов для определения производных 3-(трифторметил)-анилина в биологическом материале

Шорманов В.К.¹, Андреева Ю.В.¹, Сухомлинов Ю.А.¹, Омельченко В.А.²¹ГОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Курск²ЭКЦ УМВД России по Орловской области, Орел

Поступила в редакцию 10.11.2015 г.

Изучены особенности хроматографического поведения производных 3-(трифторметил)-анилина в тонких слоях и колонках гидроксированных сорбентов в зависимости от полярности подвижных фаз. Определены параметры, характеризующие условия определения исследуемых веществ методами ТСХ, колоночной хроматографии низкого давления и ВЭЖХ. Разработана методика химико-токсикологического исследования производных 3-(трифторметил)-анилина с применением хроматографических методов анализа.

Ключевые слова: производные 3-(трифторметил)-анилина, ТСХ, колоночная хроматография, ВЭЖХ, химико-токсикологическое исследование.

The use of chromatographic methods for the determination of 3-(trifluoromethyl)-aniline in biological material

Shormanov V.K.¹, Andreeva Y.V.¹, Suhomlinov Y.A.¹, Omelchenko V.A.²¹Kursk State Medical University²Forensic science center UMVD of Russia across the Oryol region, Oryol

Peculiarities of chromatographic behaviour of the derivatives of 3-(trifluoromethyl)-aniline in thin layers and columns of hydroxylated sorbents depending on the polarity of the mobile phases have been studied. Parameters, characterizing the conditions of defining the investigated substances using the TLC methods, column chromatography of low pressure and high pressure liquid chromatography (HPLS) have been determined. Methods for chemico-toxicological investigation of the derivatives of 3-(trifluoromethyl)-aniline with application of chromatographic analysis methods have been developed.

Keywords: derivatives of 3-(trifluoromethyl)-aniline, TLC, column chromatography, HPLS, chemical-toxicological investigation.

Введение

Производные 3-(трифторметил)-анилина являются биологически активными веществами, которые обладают цитостатическим действием.

Один из производных 3-(трифторметил)-анилина – флутамид - широко применяется в медицине в качестве противоопухолевого средства для лечения рака предстательной железы и гирсутизма у женщин [1, 2].

Многие соединения данной группы обладают токсическими свойствами по отношению к теплокровным организмам [3, 4, 5]. Известны случаи отравления людей флутамидом вследствие его метаболизма, в том числе с летальным исходом [6]. Вопросы химико-токсикологического анализа производных 3-(трифторметил)-анилина до настоящего времени остаются недостаточно изученными [7]. Для флутамида и других производных 3-(трифторметил)-анилина отсутствует нормативная документация, регламентирующая особенности их определения в биологических объектах химическими методами при экспертизах случаев отравления.

В практике подобных исследований широкое распространение получили различные виды хроматографии. Например, использование жидкостной колоночной хроматографии низкого давления позволяет очищать биообъекты до необходимой чистоты, тонкослойная хроматография является универсальным экспресс-методом и используется для предварительной идентификации токсичных соединений, а для подтверждающей идентификации и количественного определения отравляющих веществ часто применяют метод ВЭЖХ.

Цель настоящего исследования – изучение особенностей хроматографического определения производных 3-(трифторметил)-анилина в извлечениях из биологического материала.

Эксперимент

Объектами исследования явились производные 3-(трифторметил)-анилина: флутамид - 2-метил-N-(4-нитро-3-(трифторметил)фенил)-пропанамид (Фл) (LGC Standards, содержание вещества $\geq 99\%$), 4-нитро-3-(трифторметил)-анилина (4-А-3-ТФМФА) (LGC Standards, содержание вещества $\geq 99\%$), 2-метил-N-(4-амино-3-(трифторметил)фенил)пропанамид (4-А-3-ТФМФА) (PCO, содержание вещества $\geq 97\%$) и N-(4-ацетамино-3-(трифторметил)фенил)ацетамид (N-4-АА-3-ТФМФАА) (PCO, содержание вещества $\geq 99\%$). Внутренним стандартом являлся анилин (Ан) (ГОСТ 5819-78, содержание вещества $\geq 99,5\%$).

В качестве аналитических методов рассматривались тонкослойная хроматография (ТСХ), жидкостная колоночная хроматография низкого давления (ЖКХНД) и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Исследовались особенности хроматографического поведения производных 3-(трифторметил)-анилина в тонких слоях и колонках сорбентов с гидроксильной поверхностью при использовании моно- и двухкомпонентных подвижных фаз различной полярности. Определение методом ТСХ осуществляли в тонком слое силикагеля СТХ-1А с размером частиц 5-17 мкм (пластины «Сорбфил» марки ПТСХ-АФ-А-УФ со слоем гидроксильного сорбента), используя хроматографические камеры с внутренним объемом около 600 см³, которые предварительно насыщались парами растворителей в течение 30 минут. Анализируемые вещества наносили на пластины в виде 0,04% ацетоновых растворов (объем наносимой пробы составлял 5-10 мкл). Хроматограммы проявляли в УФ-свете. Рассчитывали значения абсолютной (R_f) и относительной (по отношению к анилину) (R_s) хроматографической подвижности. Строили графики зависимости значений хроматографической подвижности анализируемых веществ от процентного содержания полярного компонента в двухкомпонентных подвижных фазах. При определении методом ЖКХНД использовали колонку силикагеля L 40/100 мкм размерами 120×12 мм (общая масса сорбента 10 г).

В колонку вводили по 2 см³ 0.25% растворов анализируемых веществ в элюентах. Элюат собирали в виде отдельных фракций по 2 см³.

Присутствие производных 3-(трифторметил)-анилина во фракциях определяли после испарения из них элюента фотометрическим методом (растворяющая среда – этанол). Учитывая найденные объёмы удерживания (V_R) исследуемых веществ и объём удерживания неударживаемого вещества (V_o), для каждого анализируемого соединения рассчитывали значения времени удерживания (t_R), коэффициента ёмкости (k'), числа теоретических тарелок (N) по формулам 1-3:

$$t_R = V_r / v \quad (1)$$

$$k' = (V_R - V_o) / V_o = (t_R - t_o) / t_o \quad (2)$$

$$N = 16(t_R / \omega)^2 \quad (3)$$

где v - скорость истечения элюента, см³/мин; t_o – время удерживания несорбируемого вещества, мин; ω – ширина пика у основания, мин.

Определение методом ВЭЖХ осуществляли на приборе «Милихром-5-3» (ЗАО «Научприбор», г. Орёл) с УФ – детектором в колонке (100×2 мм) гидроксилорированного сорбента «Силасорб-600» при температуре 20°C. Скорость подачи подвижной фазы составляла 100 мкл/мин. Оптическую плотность производных 3-(трифторметил)-анилина регистрировали при длине волн 300 нм. По известным формулам рассчитывали значения времени (t_R) и объёма удерживания (V_R), коэффициента ёмкости (k'), числа теоретических тарелок (N) и коэффициента разделения (R_s).

Для количественного определения производных 3-(трифторметил)-анилина методом ВЭЖХ строили градуировочные графики, отражавшие прямо пропорциональную зависимость площади пика от количества хроматографируемого вещества и рассчитывали их уравнения.

Обсуждение результатов

Результаты хроматографирования производных 3-(трифторметил)-анилина при использовании однокомпонентных подвижных фаз представлены в табл. 1.

Как свидетельствуют данные табл. 1, при использовании однокомпонентных подвижных фаз не удавалось достичь чёткого разделения производных 3-(трифторметил)-анилина при их совместном присутствии в анализируемой смеси.

В связи с этим была предпринята попытка оптимизации условий хроматографирования с целью оптимизации условий разделения исследуемых соединений путём применения двухкомпонентных элюентов.

Результаты исследования хроматографической подвижности производных 3-(трифторметил)-анилина с применением нескольких групп двухкомпонентных подвижных фаз, одним из которых являлся растворитель с очень низким значением диэлектрической проницаемости (гексан), а вторым - растворитель с достаточно высокой диэлектрической проницаемостью (ацетон, этилацетат, этанол), представлены на рис. 1-4.

Как свидетельствуют полученные данные, для каждой группы подвижных фаз, являющихся смесями двух каких-либо растворителей, наблюдается зависимость хроматографической подвижности производных 3-(трифторметил)-анилина в тонком слое силикагеля от процентного содержания полярного компонента подвижной фазы: с увеличением содержания полярного компонента величины R_f адсорбатов

сначала резко возрастают, а затем, по достижению определённых значений, стабилизируются и в дальнейшем могут несколько снижаться.

Таблица 1. Подвижность производных 3-(трифторметил)-анилина в тонком слое силикагеля СТХ-1А при использовании однокомпонентных подвижных фаз

Подвижная фаза	Ан	Фл		4-Н-3-ТФМА		4-А-3-ТФМФА		N-4-АА-3-ТФМФАА	
	R _f	R _f	R _s	R _f	R _s	R _f	R _s	R _f	R _s
Гексан	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Бензол	0.31	0.14	0.46	0.30	0.96	0.06	0.19	0.00	0.00
Хлороформ	0.63	0.69	1.09	0.58	0.92	0.34	0.55	0.07	0.11
Четыреххлористый углерод	0.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Диэтиловый эфир	0.93	0.92	0.98	0.86	0.92	0.89	0.96	0.13	0.14
1,4-Диоксан	0.78	0.80	1.01	0.76	0.97	0.81	1.03	0.66	0.85
Этанол	0.81	0.80	0.98	0.81	1.00	0.78	0.97	0.70	0.87
Пропанол-1	0.77	0.81	1.04	0.81	1.04	0.81	1.04	0.79	1.02
Пропанол-2	0.68	0.72	1.08	0.71	1.06	0.69	1.04	0.65	0.98
Бутанол-1	0.69	0.78	1.14	0.76	1.10	0.76	1.10	0.63	0.91
Этилацетат	0.77	0.77	1.00	0.77	1.00	0.43	0.55	0.36	0.46
Ацетонитрил	0.81	0.87	1.07	0.84	1.04	0.84	1.04	0.56	0.69
Ацетон	0.83	0.86	1.03	0.83	1.00	0.87	1.04	0.77	0.93
Диметилформаид	0.88	0.88	1.00	0.92	1.04	0.95	1.08	0.92	1.04

Полное разделение всех анализируемых веществ на пластинах «Сорбфил» удаётся добиться, используя подвижную фазу гексан-ацетон (7:3). Параметры хроматографирования производных 4-нитро-3-(трифторметил)-анилина методом ЖКХНД с применением ряда подвижных фаз (гексана, ацетона, а также смесей этих растворителей в различных объёмных соотношениях) представлены в табл. 2.

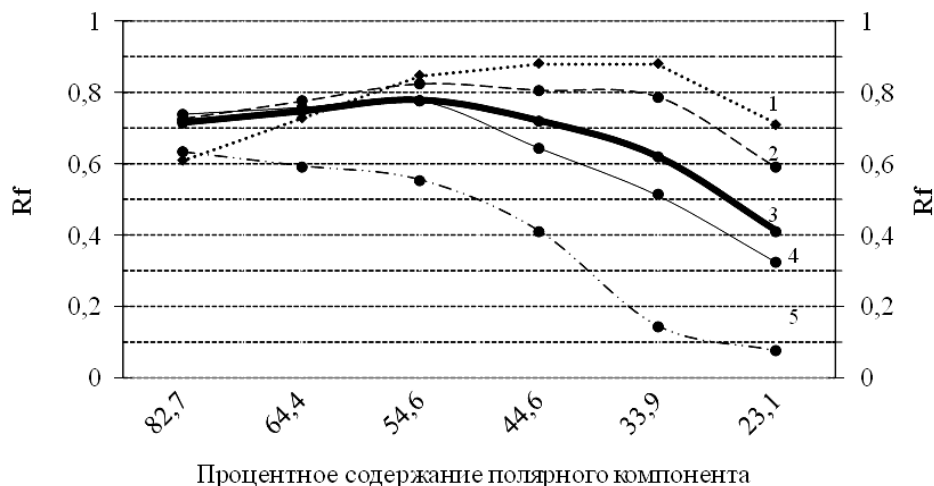


Рис. 1. Определение производных 3-(трифторметил)-анилина методом ТСХ при использовании подвижных фаз ацетон-гексан: 1 – Ан, 2 – Фл, 3 – 4-Н-3-ТФМА, 4 – 4-А-3-ТФМФА, 5 – N-4-АА-3-ТФМФАА

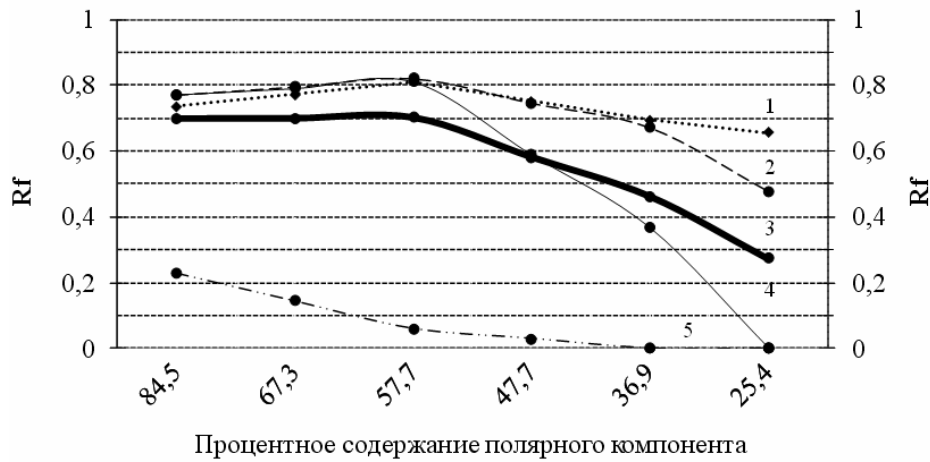


Рис. 2. Определение производных 3-(трифторметил)-анилина методом ТСХ при использовании подвижных фаз этилацетат-гексан: 1 – Ан, 2 – Фл, 3 – 4-Н-3-ТФМА, 4 – 4-А-3-ТФМФА, 5 – N-4-АА-3-ТФМФАА



Рис. 3. Определение производных 3-(трифторметил)-анилина методом ТСХ при использовании подвижных фаз этанол-гексан: 1 – Ан, 2 – Фл, 3 – 4-Н-3-ТФМА, 4 – 4-А-3-ТФМФА, 5 – N-4-АА-3-ТФМФАА



Рис. 4. Определение производных 3-(трифторметил)-анилина методом ТСХ при использовании подвижных фаз диоксан-1,4-гексан: 1 – Ан, 2 – Фл, 3 – 4-Н-3-ТФМА, 4 – 4-А-3-ТФМФА, 5 – N-4-АА-3-ТФМФАА

Таблица 2. Параметры хроматографирования производных 3-(трифторметил)-анилина в колонке силикагеля L 40/100 мкм с использованием различных элюентов

Элюент	V_0 , см ³	v , см ³ / мин	ω , мин	V_R , см ³	k'	t_R , мин	N
Флутамид							
Ацетон	9.3	0.46	1.64	11.30	0.21	24.56	463.20
Гексан-ацетон (8:2)	9.4	0.70	5.14	20.50	1.18	29.28	518.88
Гексан-ацетон (7:3)	9.3	0.65	5.54	19.30	1.07	29.69	459.84
Гексан-ацетон (6:4)	8.9	0.64	4.69	15.00	0.68	23.44	400.00
Гексан-ацетон (4:6)	9.7	0.55	4.54	12.80	0.32	23.27	419.36
Гексан-ацетон (2:8)	9.4	0.50	4.40	11.40	0.21	22.80	429.60
4-(нитро)-3-(трифторметил)-анилин							
Ацетон	9.3	0.46	6.52	11.40	0.22	24.78	231.04
Гексан-ацетон (8:2)	9.4	0.70	4.42	21.60	1.29	30.85	776.80
Гексан-ацетон (7:3)	9.3	0.65	5.69	18.20	0.95	28.00	387.04
Гексан-ацетон (6:4)	8.9	0.64	6.40	14.30	0.60	22.34	194.56
Гексан-ацетон (4:6)	9.7	0.55	7.27	14.50	0.49	26.36	210.24
Гексан-ацетон (2:8)	9.4	0.50	8.40	12.80	0.36	25.60	148.48
2-метил-N-(4-амино-3-(трифторметил)фенил)пропанамид							
Ацетон	9.3	0.46	5.21	11.40	0.22	24.78	360.96
Гексан-ацетон (8:2)	9.4	0.70	5.42	21.30	1.26	30.42	502.72
Гексан-ацетон (7:3)	9.3	0.65	6.28	17.90	0.92	27.53	264.80
Гексан-ацетон (6:4)	8.9	0.64	6.40	13.60	0.52	21.25	176.16
Гексан-ацетон (4:6)	9.7	0.55	7.27	13.10	0.35	23.82	171.52
Гексан-ацетон (2:8)	9.4	0.50	8.60	12.20	0.29	24.40	128.80
N-(4-ацетамино-3-(трифторметил)фенил)ацетамид							
Ацетон	9.3	0.46	5.43	11.40	0.22	24.78	332.64
Гексан-ацетон (8:2)	9.4	0.70	6.42	21.40	1.27	30.57	361.76
Гексан-ацетон (7:3)	9.3	0.65	5.69	18.10	0.94	27.84	382.88
Гексан-ацетон (6:4)	8.9	0.64	7.03	13.90	0.56	21.72	152.64
Гексан-ацетон (4:6)	9.7	0.55	7.45	13.60	0.40	24.72	176.16
Гексан-ацетон (2:8)	9.4	0.50	7.40	12.20	0.30	24.40	173.92

Как свидетельствуют полученные данные, в качестве универсальной подвижной фазы, позволяющей достичь хороших результатов элюирования всех исследуемых веществ из колонки силикагеля, может быть применена смесь растворителей гексан-ацетон (7:3). Она позволяет при относительно небольшом для ЖКХНД времени удерживания адсорбатов обеспечить их достаточно селективное элюирование как по отношению друг к другу, так и по отношению к группе гидрофобных соэкстрагирующихся веществ биоматериала, присутствующих в первых 6-8 мл элюата. Для хроматографирования производных 3-(трифторметил)-анилина методом ВЭЖХ применяли подвижную фазу гексан-диоксан-тетрахлорметан (1:1:1). Параметры хроматографирования объектов исследования методом ВЭЖХ в колонке с сорбентом «Силасорб 600» с использованием подвижной фазы гексан-диоксан-тетрахлорметан (1:1:1) представлены в табл. 3.

Как свидетельствуют данные таблицы, выбранная хроматографическая система обеспечивает достаточную эффективность колонки по отношению к объектам исследования и позволяет разделить анализируемые объекты в случае их совместного присутствия в пробе.

Таблица 3. Основные параметры хроматографирования производных 3-(трифторметил)-анилина методом ВЭЖХ (колонка сорбента «Силасорб 600» 100×2 мм, элюент - гексан-диоксан-тетрахлорметан (1:1:1))

Хроматографируемые вещества	t_R , мин	V_R , см ³	k'	N	R_s
Ан	3.93	393	0.33	2.08	2.83
Фл	6.23	623	1.12	17.28	0.34
4-Н-3-ТФМА	6.45	645	1.19	13.60	3.81
4-А-3-ТФМФА	9.66	966	2.28	59.68	5.72
N-4-АА-3-ТФМФАА	13.95	1395	3.74	31.20	

Открываемый минимум производных 3-(трифторметил)-анилина методом ВЭЖХ в предлагаемых условиях составляет 0.01-0.02 мкг в хроматографируемой пробе.

Уравнения градуировочных графиков для количественного определения объектов исследования методом ВЭЖХ имеют следующий вид:

$$S=188.44872C+3.34841 \text{ (для флутамида),}$$

$$S=104.69749C+3.12406 \text{ (для 4-нитро-3-(трифторметил)-анилина),}$$

$$S=1.12213C-0.07952 \text{ (для 2-метил-N-(4-амино-3-(трифторметил)фенил)пропанамид),}$$

$$S=19.42119C+0.13169 \text{ (для N-(4-ацетамино-3-(трифторметил)-фенил)ацетамида).}$$

где S – площадь пика, C – содержание вещества в хроматографируемой пробе, мкг.

Относительная ошибка определения рассматриваемых веществ методом ВЭЖХ в субстанциях не превышает 1.50% ($n=6$; $P=0.95$).

Результаты, полученные при изучении хроматографических свойств производных 3-(трифторметил)-анилина в тонких слоях и колонках сорбентов, явились основой для разработки схем очистки, идентификации и количественного определения объектов исследования в биологическом материале с применением методов ЖКХНД, ТСХ и ВЭЖХ.

Методика определения производных 3-(трифторметил)-анилина в биологическом материале. При разработке методики готовили модельные смеси различных количеств анализируемых веществ (1.25-50.0 мг) с мелкоизмельчённой (размер частиц 0.2-0.5 см) тканью печени, герметично закрывали и выдерживали при комнатной температуре в течение 1.5 часа.

По истечении указанного времени к 25 г модельной смеси, содержащей определённое количество того или иного анализируемого соединения, прибавляли 50 г ацетона и выдерживали 45 минут при периодическом перемешивании. Извлечение отделяли от частиц биоматериала декантацией, а операцию настаивания повторяли в вышеописанных условиях. Отдельные извлечения объединяли, фильтровали через стеклянный фильтр диаметром 3.6 см предварительно промытым изолирующим агентом. Порции фильтрата и промывной жидкости объединяли и упаривали в токе воздуха при температуре 18-22°C до сухого остатка. Остаток растворяли в 2-3 см³ смеси растворителей гексан-ацетон (7:3) и вносили раствор в колонку силикагеля L 40/100 мкм (120×12 мм). После полного вхождения раствора в слой сорбента хроматографировали, используя элюент гексан-ацетон (7:3). Элюат собирали фракциями по 2 см³. Фракции, содержащие то или иное анализируемое вещество, объединяли, испаряли в токе воздуха при температуре 18-22°C. Остаток растворяли в 5 см³ диоксана (исходный раствор).

Предварительная идентификация методом ТСХ. 0.3 см³ исходного раствора наносили на линию старта хроматографической пластины «Сорбфил». Хроматографировали двукратно в присутствии вещества-свидетеля, используя

подвижную фазу гексан-ацетон (7:3). Хроматограммы проявляли в УФ-свете. Исследуемые вещества идентифицировали по величине R_f .

Подтверждающая идентификация и количественное определение методом ВЭЖХ. 1 см³ исходного раствора вносили в мерную колбу вместимостью 25 см³, туда же прибавляли по 1 см³ тетрахлорметана и гексана, после чего доводили до метки смесью растворителей гексан-диоксан-тетрахлорметан (1:1:1). 2-16 мкл полученного раствора вводили в хроматограф. Хроматографировали, используя подвижную фазу гексан-диоксан-тетрахлорметан (1:1:1). Скорость подачи подвижной фазы - 100 мкл/мин. Оптическую плотность производных 3-(трифторметил)-анилина регистрировали при 300 нм. Вещества идентифицировали на основе характерного значения времени (объёма) удерживания. Количественное содержание того или иного вещества рассчитывали по площади хроматографического пика, используя уравнение градуировочного графика. Результаты определения представлены в табл. 4.

Таблица 4. Результаты определения различных концентраций производных 3-(трифторметил)-анилина в ткани печени (n=5; P=0.95)

Анализируемое вещество	Внесено анализируемого вещества, мг в 25 г биологического объекта	Найдено, %				
		\bar{x}	S	$S_{\bar{x}}$	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\epsilon}$
Фл	1.25	87.67	3.51	1.43	3.68	4.20%
	2.5	88.48	3.01	1.23	3.16	3.58%
	10.0	89.57	2.68	1.09	2.81	3.14%
	25.0	90.02	2.51	1.02	2.63	2.93%
	50.0	90.30	2.34	0.95	2.45	2.72%
4-Н-3-ТФМА	1.25	89.13	3.99	1.62	4.18	4.70%
	2.5	89.88	3.70	1.51	3.88	4.32%
	10.0	90.25	3.49	1.42	3.66	4.06%
	25.0	90.98	3.30	1.35	3.47	3.82%
	50.0	91.23	3.13	1.27	3.28	3.61%
4-А-3-ТФМФА	1.25	87.78	3.38	1.38	3.55	4.05%
	2.5	88.38	3.28	1.34	3.45	3.90%
	10.0	88.83	3.07	1.25	3.22	3.63%
	25.0	89.42	2.72	1.11	2.85	3.20%
	50.0	89.73	2.52	1.03	2.65	2.96%
N-4-АА-3-ТФМФАА	1.25	87.42	3.75	1.53	3.93	4.50%
	2.5	87.88	3.20	1.30	3.36	3.83%
	10.0	88.68	2.53	1.03	2.66	3.00%
	25.0	88.98	2.27	0.92	2.38	2.69%
	50.0	89.65	2.18	0.89	2.28	2.55%

Как свидетельствуют полученные данные, при изменении содержания веществ в биологическом материале в интервале концентраций 1.25-50.0 мг при постоянной массе навески трупной печени (25 г) изменение среднего значения степени извлечения незначительно и не превышает 2.5%. Это позволяет предположить, что анализируемые соединения с веществами биологических тканей не образует достаточно прочных связей.

На хроматограммах, полученных при определении производных 3-(трифторметил)-анилина методом ВЭЖХ, после их изолирования по разработанной методике из биологического материала, в сравнении с хроматограммами веществ-стандартов, не обнаруживались дополнительные пики или заметное увеличение фонового поглощения. Параметры хроматографирования соединений, извлечённых из печени, совпадали с соответствующими параметрами стандартных веществ. Это позволяет сделать выводы о достаточной эффективности предлагаемой схемы очистки, основой которой является ЖКХНД.

Заключение

Разработанная методика позволяет идентифицировать и определить в модельных смесях с тканью печени 87-91% анализируемых веществ от первоначально внесённого их количества с достаточными для подобного рода исследований воспроизводимостью и правильностью. Открываемый минимум рассматриваемых соединений методами ТСХ и ВЭЖХ составляет соответственно 0,4-0,6 и 0,2-0,4 мг в 100 г биологического материала.

Список литературы

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства 16-е изд. М.: Новая волна. 2012. 1216 с.
2. Generali J.A., Cada D.J. // *Hospital pharmacy*. 2014. Vol. 49. No 6. pp. 517-520.
3. Lazaros G. et al. // *Annals of gastroenterology*. 2001. Vol. 14. No 2. pp. 125-127.
4. Hung H.C., Lin I.H., Shiue K.F., Huang B.C. // *Journal Intern. Med. Taiwan* 2007. Vol. 18. pp. 35-39.
5. Bakdash A. et al. // *Toxichem+Krimtech*. 2006. Vol. 73. No 2. pp. 61-65.
6. Matsuzaki Y., Nagai D., Ichimura E. // *Journal of Gastroenterology*. 2006. Vol. 41. No 3. pp. 231-239.
7. Шорманов В.К., Андреева Ю.В., Омельченко В.А. // *Судебно-медицинская экспертиза*. 2014. Т. 57. № 5. С. 18-20.

References

1. Mashkovskij M.D., *Lekarstvennyye sredstva*. Moscow, Novaja volna Publ., 2012, 1216 p.
2. Generali J.A., Cada D.J., *Hospital pharmacy*, 2014, Vol. 49, No 6, pp. 517-520.
3. Hung H.C., Lin I.H., Shiue K.F., Huang B.C., *Journal Intern. Med. Taiwan*, 2007, Vol. 18, pp. 35-39.
4. Bakdash A. et al., *Toxichem+Krimtech*, 2006, Vol. 73, No 2, pp. 61-65.
5. Matsuzaki Y., Nagai D., Ichimura E., *Journal of Gastroenterology*, 2006, Vol. 41, No 3, pp. 231-239.
6. Shormanov V.K., Andreeva Ju.V., Omel'chenko V.A., *Sudebno-medicinskaja jekspertiza*, 2014, Vol. 57, No 5, pp. 18-20.

Шорманов Владимир Камбулатович – д.фарм.н., профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета, Курск

Shormanov Vladimir K. – Doctor of pharmaceutical science, professor of department of pharmaceutical, toxicological and analytical chemistry, Kursk State Medical University, Kursk, e-mail: R-WLADIMIR@yandex.ru

Андреева Юлия Владимировна – аспирант кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета, Курск

Сухомлинов Юрий Анатольевич – к.фарм.н., доцент кафедры фармакогнозии и ботаники Курского государственного медицинского университета, Курск

Омельченко Владимир Александрович – к.фарм.н., начальник – полковник полиции ЭКЦ УМВД России по Орловской области, Орел

Andreeva Julia V. – Postgraduate student of department of pharmaceutical, toxicological and analytical chemistry, Kursk State Medical University, Kursk, e-mail: dzhulia.andreeva2012@yandex.ru

Suhomlinov Yury A. - Candidate of pharmaceutical science, associate professor of department of pharmacognosy and botany, Kursk State Medical University, Kursk

Omelchenko Vladimir A. - Candidate of pharmaceutical science, chief - colonel of Police Forensic Science Center of the MOI of Russia
Orel, Orel