



УДК 340.67:615.214.2.099.074:543.544

## Денситометрический анализ опиатов в судебно-химической экспертизе

Кормишин В.А.<sup>1,2</sup>, Воронин А.В.<sup>1</sup>, Воронина Т.В.<sup>3</sup>, Шаталаев И.Ф.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Самары

<sup>2</sup>ГУЗ «Ульяновское областное бюро судебно-медицинской экспертизы», Ульяновск,

<sup>3</sup>ГУЗ «Самарское областное бюро судебно-медицинской экспертизы», Самара

Поступила в редакцию 23.01.2012 г.

### Аннотация

В данной статье приведена методика денситометрического анализа и оптимизация предварительного исследования в химико-токсикологическом анализе морфина и кодеина. Установлен предел обнаружения 5 мкг в пробе методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) с применением более доступного и экономичного технического оснащения для последующей денситометрии.

**Ключевые слова:** морфин, кодеин, денситометрия, тонкослойная хроматография, ТСХ-менеджер

In this article is described the technique working out the densitometric analysis and optimisation of preliminary research in the chemical-toxicological analysis of morfin and codein. The limit of detection of 5 mkg in test by a method thin layer chromatography (TLC) with application of more accessible and economic hardware for the subsequent densitometric is established.

**Keywords:** Morfin, codein, densitometric analysis, thin layer chromatography, TLC - manager

### Введение

Широкое применение тонкослойной хроматографии (ТСХ) в судебно-химической экспертизе связано с высокой производительностью, простотой, достаточной специфичностью. Денситометрия обеспечивает ТСХ возможность количественного определения анализируемых веществ и документирования результатов. Высокая стоимость специализированного аналитического оборудования, в частности сканирующих денситометров и программного обеспечения, большинству лабораторий экспертных учреждений не позволяет использовать в полном объеме возможности ТСХ [2].

Цель настоящей работы – определение аналитических характеристик и возможностей количественного определения методики судебно-химического исследования биологического материала на морфин и кодеин методом ТСХ с применением компьютерной программы для обработки изображений «ТСХ-менеджер».

## Эксперимент

В данной работе были использованы методы: жидкость-жидкостной экстракции, тонкослойной хроматографии, денситометрии (с использованием компьютерной программы для обработки изображений «ТСХ-менеджер», разработчик Плахотний Игорь Николаевич г. Днепропетровск; принцип обработки таких графических файлов данной программой близок к работе двухлучевого денситометра), регрессионный и дисперсионный статистический анализы. Были использованы следующие материалы: стандартный раствор морфина и кодеина, модельные пробы мочи, содержащие определенные концентрации препаратов, образцы мочи не содержащие наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ, экспертные образцы мочи, пластины для ТСХ «Сорбфил ПТСХ-П-А», системы растворителей для ТСХ.

Для исследования была выбрана методика анализа опиатов методом ТСХ, используемая в практике судебно-химических отделений Самарского и Ульяновского областного бюро судебно-медицинской экспертизы. Условия хроматографического анализа: пластинки «Сорбфил ПТСХ-П-А», хроматографическая система 1) – этилацетат - этанол - аммиак (17:2:1)[6], 2) – толуол – ацетон – этанол - аммиак (45:45:7:3)[1]; объем наносимой пробы – 100 мкл; проявление – обработка реактивами Драгендорфа и Марки [3].

## Обсуждение результатов

Основной проблемой ТСХ-анализа опиатов с визуальной регистрацией является невозможность сохранения результатов – «пятна» (зоны на хроматограмме, соответствующие морфину и кодеину) после проявления реактивом Драгендорфа обесцвечиваются в течение 3-5 мин; и как следствие невозможность выполнения повторных измерений величины  $R_f$  и оценки количественного параметра – площади «пятна». Кроме того, фоновая составляющая хроматограммы выступает в роли значимого фактора, способствующего повышению величины предела обнаружения опиатов, т.е. снижению чувствительности анализа.

Пластинки после хроматографирования фотографировали с помощью цифрового фотоаппарата в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм, а после проявления и высушивания сканировали на планшетном сканере или фотографировали при дневном свете, полученные файлы формата jpeg обрабатывали с помощью программы «ТСХ-менеджер», версия 3.12 (разработчик Плахотний Игорь Николаевич). Таким образом, сама хроматографическая пластинка утрачивала значение носителя аналитической информации, ее замещал электронный образ.

Для приготовления растворов стандартных образцов использовали метанольные растворы морфина и кодеина концентрации 1,0 мг/мл (фирма «Radian»). Модельные растворы мочи готовили путем добавления расчетного количества вышеуказанных растворов в образцы мочи, не содержащие наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ, затем добавляли 25% раствор гидроксида аммония до pH 9 и 10 [5] для морфина и кодеина соответственно, затем проводили двукратную экстракцию смесью хлороформ : н-бутанол ( 9:1) [4], органическую фазу фильтровали через безводный сульфат натрия, затем упаривали в токе воздуха под вакуумом, сухой остаток растворяли в смеси хлороформ -96,5% этанол (1:1).

При исследовании растворов стандартных образцов морфина и кодеина в диапазоне концентраций 10,0-250,0 мкг/мл проводили по 10 параллельных определений. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. Аналитические характеристики методики идентификации опиатов методом тонкослойной хроматографии

Проявление	Эффективность растровых манипуляций		Предел обнаружения, мкг		Значение $R_f$			
	Морфин	Кодеин	Морфин	Кодеин	Морфин		Кодеин	
					1	2	1	2
Реактив Драгендорфа	++	++	5.0	5.0	0.31±0.05	0.28±0.04	0.34±0.02	0.31±0.03
Реактив Марки	-	-	10.0	10.0	0.26±0.03	0.23±0.04	0.31±0.04	0.28±0.04
УФ 254 нм	++	++	5.0	5.0	0.31±0.05	0.28±0.04	0.34±0.02	0.31±0.03

1 – хроматографическая система: этилацетат – метанол – аммиак 17:2:1.

2 – хроматографическая система: толуол – ацетон – этанол – аммиак 45:45:7:3.

При проявлении хроматограмм реактивом Драгендорфа значение предела обнаружения достигает величины 5,0 мкг, аналогичный показатель в случае использования реактива Марки составляет 10,0 мкг. Необходимо отметить, что существенный вклад в уменьшение величины предела обнаружения в ряде случаев, особенно при проявлении реактивом Драгендорфа, вносят растровые манипуляции с электронным образом хроматограммы – изменение резкости, интенсивности изображения, изменение параметров яркости и контрастности, возможность просмотра хроматограммы в негативе. Указанные манипуляции позволяют сделать почти незаметное для человеческого глаза «пятно» анализируемого вещества четко детектируемым. Незначительное различие в величине  $R_f$  обусловлено способом нанесения проявляющего реагента: реактив Драгендорфа наносится путем распыления, реактив Марки – капельно. На основании полученных результатов окно поиска  $R_f$  для морфина и кодеина было задано на уровне 0,1 и 0,08 соответственно.

Градуировочная зависимость «площадь пятна ( $Y$ ) – количество опиата, мкг ( $X$ )», построенная в диапазоне концентраций морфина и кодеина 50,0-250,0 мкг/мл, описывается уравнением полиномиальной регрессии (второй степени). Однако для установления данной зависимости необходимо использовать более трех растворов стандартного образца опиатов различных концентраций (калибраторов), что в условиях повседневной аналитической практики приведет к снижению производительности анализа. Для упрощения задачи нами было предложено применение линейной регрессии, при этом количество калибраторов было уменьшено до двух. Вышеуказанные зависимости были определены для вариантов анализа с применением в качестве источника электронного образа хроматограммы планшетного сканера и цифрового фотоаппарата (табл. 2).

Таблица 2. Градуировочные характеристики количественного денситометрического определения опиатов

Вещество	Источник электронного образа	Полиномиальная регрессия	Линейная регрессия
Морфин	Сканер	$Y = 0.013 \cdot X^2 + 20.00 \cdot X - 569.27$	$Y = 23.86 \cdot X - 730.05$
	Фотоаппарат	$Y = 0.021 \cdot X^2 + 17.60 \cdot X - 362.18$	$Y = 23.83 \cdot X - 627.53$
Кодеин	Сканер	$Y = 0.0013 \cdot X^2 + 1.106 \cdot X + 7.56$	$Y = 1.55 \cdot X - 23.77$
	Фотоаппарат	$Y = 0.0015 \cdot X^2 + 5.83 \cdot X + 15.74$	$Y = 6.37 \cdot X - 27.68$

Результаты контроля правильности методики определения опиатов с применением контрольных растворов морфина и кодеина (приготовленных независимо от калибраторов) представлены в табл. 3.

Таблица 3. Результаты контроля правильности количественного денситометрического определения опиатов

Калибраторы, мкг/мл	Контрольный раствор, мкг/мл	Вещество	Относительная ошибка определения среднего, %	
			фотоаппарат	Сканер
250.0; 100.0	50.0*	Морфин	16.2	10.4
		Кодеин	10.8	8.6
100.0; 50.0*	250.0	Морфин	11.6	7.0
		Кодеин	19.0	3.5
250.0; 50.0*	100.0	Морфин	6.4	4.1
		Кодеин	11.8	1.6

\* – концентрация 50,0 мкг/мл при объеме, наносимой на пластинку пробы 100 мкл соответствует пределу обнаружения.

Относительная ошибка определения среднего значения содержания морфина и кодеина в пробе в диапазоне концентраций 50,0-250,0 мкг/мл не превышает 16,2% и 19,0% соответственно при использовании для получения электронного образа хроматограммы цифрового фотоаппарата, 10,4% и 8,6% соответственно – в случае сканирования хроматографических пластинок, последний вариант является наиболее предпочтительным (погрешность денситометра отечественного производства составляет от 3 до 10%). Наименьшая величина ошибки достигается при концентрации морфина и кодеина в пробе около 100,0 мкг/мл. Процент выхода вещества из биологической матрицы по данной методике составил 80 и 85% для морфина и кодеина соответственно

### Заключение

Данный метод анализа практически не уступает в точности и экспрессности классической денситометрии на заводском оборудовании. Таким образом, денситометрия электронных образов хроматограмм с применением планшетного сканера, цифровой фотокамеры и программы «ТСХ-менеджер» является экономичным, доступным, современным, экспрессным и объективным вариантом анализа в тонкослойной хроматографии, значительно расширяющим возможности этого классического метода.

### Список литературы.

1. Бабахаян Р.В., Бушуев Е.С., Варданян Ш.А., Афанасьев В.В. Наркотические средства, психотропные и сильнодействующие вещества – СПб; Реноме, 2008 - 276 с.
2. Еремин С.К., Изотов Б.Н., Веселовская Н.В. Анализ наркотических средств /; Под ред. Б.Н. Изотова. – М.: Мысль, 1993. – 270 с.
3. Симонов Е.А., Изотов Б.Н., Фесенко А.В. Наркотики: методы анализа на коже, в ее придатках и выделениях – М.: Анахарсис, 2000. – 130 с.
4. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов: учебное пособие / Под. ред. проф. Н.И. Калетиной.- М.:ГЭОТАР- Медиа,2008.-1016с.:ил.
5. Саломатин Е.М. и др Обнаружение морфина, кодеина и диацетилморфина (героина) при судебно-химических исследованиях трупной крови: пособие для врачей судеб.-мед. Экспертов химиков.-М., 2005.- 35с.
6. CLARKE'S Isolation and identification of drugs in pharmaceutical body fluids, and post –mortem material. London The pharmaceutical press 1986. 1134 с.

---

**Кормишин Василий Алексеевич** - аспирант з/о кафедры химии фармацевтического факультета Самарского государственного университета; Врач-судмедэксперт судебно-химического отделения Ульяновского областного бюро судебно-медицинской экспертизы, Ульяновск

**Воронин Александр Васильевич** - к.ф.н., доцент кафедры химии фармацевтического факультета Самарского государственного медицинского университета, Самара

**Воронина Татьяна Владимировна** - врач-судмедэксперт судебно-химического отделения Самарского областного бюро судебно-медицинской экспертизы, Самара

**Шаталаев Иван Федорович** – д.б.н., профессор, заведующий кафедрой химии фармацевтического факультета Самарского государственного медицинского университета, Самара

**Kormishin Vasily A.** - The correspondence post-graduate student of department of chemistry of pharmaceutical faculty of the Samara state medical university. The judicial-medical expert of judicial-chemical branch of the bureau of a forensic medical examination of Ulyanovsk region. Phone, E-mail: [kormishinva@inbox.ru](mailto:kormishinva@inbox.ru)

**Voronin Aleksander V.** - The candidate Sciences of pharmaceutica, the associate professor of department of chemistry of pharmaceutical faculty of the Samara state medical university, Samara, E-mail: [dimmu2000@mail.ru](mailto:dimmu2000@mail.ru)

**Voronina Tatyana V.** - the judicial-medical expert of judicial-chemical branch of the bureau of a forensic medical examination of Samara region, Samara

**Shatalaev Ivan F.** - The doctor Sciences of biologia, the professor, head of the department of chemistry of pharmaceutical faculty of the Samara state medical university, Samara