

УДК 340.67:615.214.2.099.074:543.544

ДЕНСИТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭФЕДРИНА В СУДЕБНО-ХИМИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

© 2012 В.А. Кормишин², А.В. Воронин¹, И.Ф. Шаталаев¹¹ Самарский государственный медицинский университет² Ульяновское областное бюро судебно-медицинской экспертизы, г. Ульяновск

Поступила в редакцию 04.10.2012

Определены аналитические характеристики методики анализа эфедрина методом тонкослойной хроматографии с применением денситометрии. Предел обнаружения эфедрина составляет 1,0 мкг в пробе. Показана возможность количественного определения эфедрина в модельных образцах в диапазоне концентраций 10,0-250,0 мкг/мл.

Ключевые слова: *эфедрин, денситометрия, тонкослойная хроматография*

Тонкослойная хроматография (ТСХ) является одним из основных методов, используемых в рамках химико-токсикологического анализа в качестве метода предварительного исследования. Широкое применение ТСХ связано с высокой производительностью, простотой, достаточной специфичностью метода. Денситометрия, в свою очередь, обеспечивает ТСХ возможность количественного определения анализируемых веществ и документирования результатов. Однако высокая стоимость специализированного аналитического оборудования, в частности, сканирующих денситометров и программного обеспечения, большинству лабораторий экспертных учреждений не позволяет использовать в полном объеме возможности ТСХ [4]. Эфедрин является прекурсором наркотических средств и психотропных веществ и входит в состав ряда лекарственных средств безрецептурного отпуска [6]. По этой причине он широко используется в немедицинских целях, в том числе, для изготовления наркотических средств – эфедрон, метамфетамин (первитин). Также эфедрин является метаболитом вышеуказанных наркотических средств и при судебно-химическом исследовании биологических жидкостей трупа служит маркером, свидетельствующем об их употреблении. В настоящей работе исследуются аналитические характеристики и возможности количественного определения методики химико-токсикологического анализа эфедрина в биологических жидкостях методом ТСХ с применением программы для денситометрии «ТСХ-менеджер»

Кормишин Василий Алексеевич, врач-судмедэксперт судебно-химического отделения. E-mail: kormishinva@inbox.ru

Воронин Александр Васильевич, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры химии фармацевтического факультета. E-mail: dimtmi2000@mail.ru

Шаталаев Иван Федорович, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой химии фармацевтического факультета. E-mail: cyric@proezd.net

(версия 3.12, разработчик Плахотный И.Н., г. Днепропетровск). Принцип обработки графических файлов данной программой аналогичен работе двухлучевого денситометра [8].

Цель работы: определение некоторых аналитических характеристик и возможностей количественного определения методики судебно-химического исследования биологических жидкостей на эфедрин методом ТСХ с применением компьютерной денситометрии.

Материалы и методы. Материалы исследования: стандартный раствор эфедрина в метаноле концентрации 1,0 мг/мл (фирма «АВВОТ»), модельные образцы мочи, содержащие определенные концентрации эфедрина, образцы мочи, не содержащие наркотических средств и психотропных веществ. Для приготовления растворов стандартных образцов использовали метанольный раствор эфедрина концентрации 1,0 мг/мл. Модельные образцы мочи готовили путем добавления расчетного количества вышеуказанного раствора в образцы мочи, не содержащие наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ. В работе были использованы методы ТСХ, денситометрии (с использованием компьютерной программы для обработки изображений «ТСХ-менеджер»), регрессионный статистический анализ.

Условия хроматографического анализа: пластины для ТСХ «Сорбфил ПТСХ-П-А», системы растворителей для ТСХ – этилацетат-метанол-25% раствор аммиака (17:2:1) [1]; метанол-25% раствор аммиака (100:1,5) [3]. Объем пробы, наносимой на пластинку – 100 мкл; проявление – обработка 0,5% раствором нингидрина в ацетоне с последующим нагреванием в токе воздуха при 80⁰С в течение 15 мин [7].

Пробоподготовку модельных проб мочи осуществляли методом жидкость-жидкостной экстракции: к 2 мл мочи добавляли 25% раствор

аммиака до pH 10-11, затем проводили экстракцию 5 мл смеси хлороформ-н-бутанол (9:1) в течение 5 мин, операцию повторяли дважды [2, 5]. Водный раствор отбрасывали, органическую фазу упаривали в токе воздуха при комнатной температуре. Сухой остаток растворяли в 0,5 мл хлороформа. 100 мкл полученного раствора наносили на линию старта хроматографической пластины, хроматографировали и денситометрировали.

Результаты и их обсуждение. Для исследования была выбрана методика анализа эфедрина методом ТСХ, используемая в практике судебно-химического отделения Ульяновского областного бюро судебно-медицинской экспертизы [7]. Основной проблемой ТСХ-анализа эфедрина с визуальной регистрацией является невозможность сохранения результатов – «пятна» (зоны на хроматограмме, соответствующие эфедрину) после проявления теряют интенсивность окраски в течение 15-20 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 эфедрина, т.е. снижению чувствительности анализа.

Пластинки после хроматографирования, проявления и высушивания сканировали на планшетном сканере и фотографировали с помощью цифрового фотоаппарата, полученные файлы формата .jpeg обрабатывали с помощью программы «ТСХ-менеджер». Таким образом, сама хроматографическая пластинка утрачивала значение носителя аналитической информации, ее замещал электронный образ. При исследовании растворов стандартного образца эфедрина в диапазоне концентраций 10,0-250,0 мкг/мл проводили по 10 параллельных определений. Полученные результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1. Аналитические характеристики методики определения эфедрина методом тонкослойной хроматографии

Хроматографическая система	Эффективность растровых манипуляций	Предел обнаружения, мкг	Величина R_f
этилацетат-метанол-25% раствор аммиака (17:2:1)	+	1,0	0,21 ±0,05
метанол-25% раствор аммиака (100:1,5)	++	1,0	0,36 ±0,03

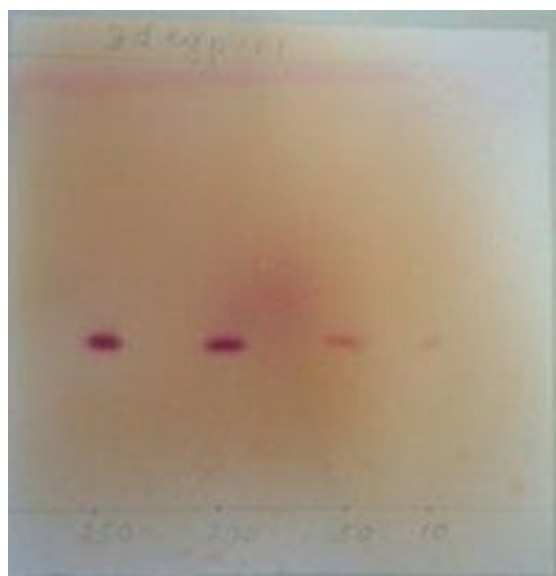
Примечание: «+» - просмотр изображения в негативе; «++» - просмотр изображения в негативе с увеличением резкости изображения

На основании вышеуказанных результатов, интервал поиска R_f для эфедрина в компьютерной программе был задан на уровне 0,1, т.е. в диапазоне $\pm 0,05$ от среднего значения R_f . Значение предела обнаружения составило 1,0 мкг эфедрина в пробе. При исследовании модельных образцов мочи также удалось достичь предела обнаружения около 1,0 мкг в пробе за счет применения растровых манипуляций с электронным образом хроматограммы – изменения резкости, интенсивности изображения, изменения параметров яркости и контрастности, возможности просмотра хроматограммы в негативе. Данные манипуляции позволяют сделать почти незаметное для человеческого глаза «пятно» анализируемого вещества четко детектируемым. На рис. 1 приведены хроматограммы модельных образцов мочи с концентрациями эфедрина 10,0, 50,0, 200,0, 250,0 мкг/мл.

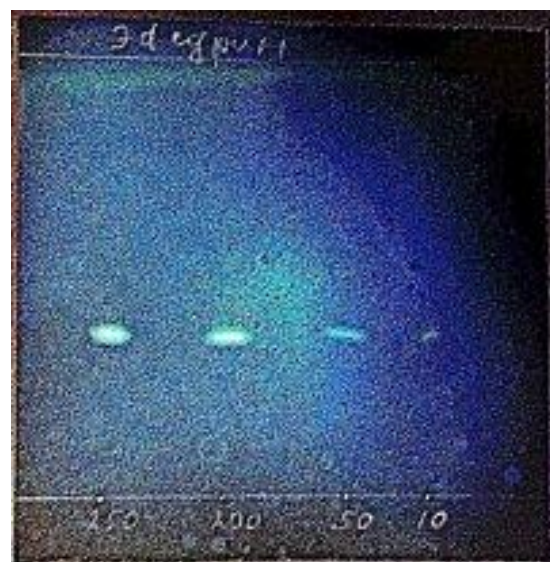
Градуировочная зависимость «площадь пятна (Y) – количество эфедрина, мкг (X)», построенная в диапазоне концентраций 10,0-250,0 мкг/мл, описывается уравнением полиномиальной (квадратичной) регрессии. Однако для

установления данной зависимости необходимо использовать более трех растворов стандартного образца вещества различных концентраций (градуировочных образцов), что в условиях повседневной аналитической практики приведет к снижению производительности анализа. Для упрощения аналитической задачи нами было предложено применение линейной регрессии, количество градуировочных образцов было уменьшено до двух, при этом относительная ошибка определения не превышала 35%, что приемлемо для предварительного этапа анализа. Вышеуказанные зависимости были определены для вариантов анализа с применением в качестве источника электронного образа хроматограммы планшетного сканера и цифрового фотоаппарата (табл. 2).

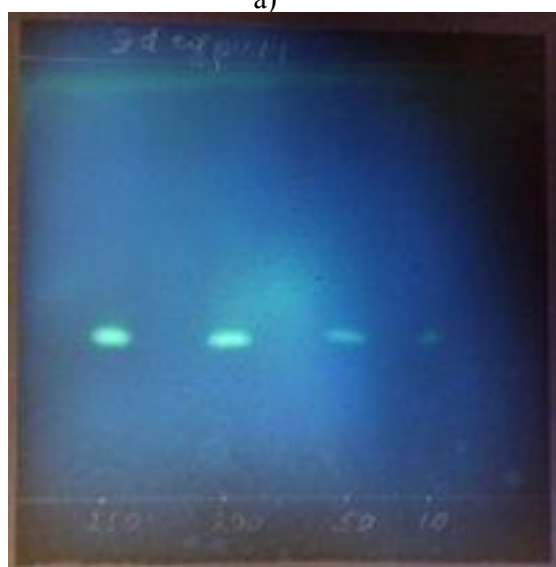
Результаты контроля правильности методики определения эфедрина с применением его контрольных растворов (приготовленных независимо от градуировочных образцов) при использовании различных комбинаций пар градуировочных образцов представлены в табл. 3.



а)



в)



б)

Рис.1. Хроматограммы модельных образцов мочи с концентрацией эфедрина 10,0, 50,0, 200,0, 250,0 мкг/мл:

а – после обработки 0,5% раствором нингидрина в ацетоне без растровых манипуляций; б – просмотр в негативе; в – просмотр в негативе с увеличением резкости изображения

Относительная ошибка определения среднего значения содержания эфедрина в пробе в диапазоне концентраций 10,0-250,0 мкг/мл не превышает соответственно 35% при использовании для получения электронного образа хроматограммы цифрового фотоаппарата, и 7,8% – в случае сканирования хроматографических пластинок, последний вариант является наиболее предпочтительным. Наименьшая величина ошибки достигается при концентрации эфедрина в пробе 100,0 мкг/мл.

Таблица 2. Градуировочные характеристики количественного денситометрического определения эфедрина

Источник электронного образа	Полиномиальная регрессия	Линейная регрессия
сканер	$Y=0,009 \cdot X^2+73,9 \cdot X+274,4$	$Y=76,9 \cdot X-46,3$
фотоаппарат	$Y=0,025 \cdot X^2+66,5 \cdot X-569,7$	$Y=61,4 \cdot X+477,2$

Таблица 3. Результаты контроля правильности количественного денситометрического определения эфедрина

Градуировочные образцы, мкг/мл	Контрольный раствор, мкг/мл	Относительная ошибка	
		фотоаппарат	сканер
250,0; 100,0	10,0*	35,00	7,80
100,0; 10,0*	250,0	13,00	3,10
250,0; 10,0*	100,0	14,00	0,30

Примечание: * – концентрация стандартного метанольного раствора эфедрина 10,0 мкг/мл при объеме, наносимой на пластинку пробы 100 мкл соответствует пределу обнаружения

Выводы: вышеописанный методический подход в настоящее время внедряется в практику судебно-химического отделения Ульяновского областного бюро судебно-медицинской экспертизы, поскольку является экспрессным, технически доступным и экономически приемлемым вариантом предварительного исследования эфедрина в биологических жидкостях. Анализ проводится сериями с использованием градуировочных образцов – метанольных растворов эфедрина с концентрацией 10,0 и 250,0 мкг/мл. Данная методика может быть применена в клинико-токсикологическом анализе и при процедуре медицинского освидетельствования живых лиц.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Еремин, С.К. Анализ наркотических средств. Под ред. Б.Н. Изотова / С.К. Еремин, Б.Н. Изотов, Н.В. Веселовская. – М.: Мысль, 1993. 270 с.
2. Бабаханян, Р.В. Наркотические средства, психотропные и сильнодействующие вещества / Р.В. Бабаханян и др. – СПб; Реноме, 2008. 276 с.
3. Калетина, Н.И. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов: учебное пособие. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 1016 с.
4. Симонов, Е.А. Наркотики: методы анализа на коже, в ее придатках и выделениях / Е.А. Симонов, Б.Н. Изотов, А.В. Фесенко. – М.: Анахарсис, 2000. 130 с.
5. CLARKE'S Isolation and identification of drugs in pharmaceutical body fluids, and post-mortem material. – London. The pharmaceutical press. 1986. 1023 p.
6. Постановление Правительства РФ N 681 «Об утверждении перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации» от 30 июня 1998 г. 34 с.
7. Методические указания. Химико-токсикологический анализ веществ, вызывающих одурманивание. – М., 1987. 122 с.
8. электронный ресурс: <http://www.garryc2008.narod.ru> / WEB страница Плахотного И.Н. (дата обращения 09. 09 2011)

DENSITOMETRIC EPHEDRINE'S DEFINITION IN JUDICIAL AND CHEMICAL PRACTICE

© 2012 V.A. Kormishin², A.V. Voronin¹, I.F. Shatalayev¹

¹ Samara State Medical University

² Ulyanovsk Regional Bureaus of Forensic Medical Examination, Ulyanovsk

Analytical characteristics of a technique for the ephedrine analysis by a method of thin layer chromatography with densitometry application are defined. The detection limit of ephedrine makes 1,0 mkg in test. Possibility of quantitative ephedrine definition in modeling samples in a range of concentration of 10,0-250,0 mkg/ml is shown.

Key words: *ephedrine, densitometry, thin layer chromatography*

Vasily Kormishin, Judicial Medical Expert at the Judicial Chemical Department. E-mail: kormishinva@inbox.ru

Alexander Voronin, Candidate of Pharmacy, Associate Professor at the Chemistry Department of the Pharmaceutical Faculty. E-mail: dimmu2000@mail.ru

Ivan Shatalayev, Doctor of Biology, Professor, Head of the Chemistry Department at the Pharmaceutical Faculty. E-mail: cyrlic@proezd.net