

УДК 340.67:615.214.2.099.074:543.544

ДЕНСИТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЭФЕДРИНА И ВЕРАПАМИЛА В СУДЕБНО-ХИМИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЕ

© 2013 В.А. Кормишин¹, А.В. Воронин, И.Ф. Шаталаев²

Определены аналитические характеристики методики анализа эфедрина и верапамила методом тонкослойной хроматографии с применением денситометрии. Пределы обнаружения эфедрина и верапамила составили 10,0 мкг/мл. Показана возможность количественного определения эфедрина и верапамила в модельных растворах в диапазоне концентраций 10,0–250,0 мкг/мл.

Ключевые слова: эфедрин, верапамил, денситометрия, тонкослойная хроматография.

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 [1]. В данной работе использовалось более доступное оборудование: планшетный сканер и цифровая фотокамера для получения изображения в цифровом формате и компьютерная программа для денситометрии "ТСХ-менеджер" (версия 3,12, разработчик И.Н. Плахотный, г. Днепропетровск). Принцип обработки графических файлов данной программой аналогичен работе двухлучевого денситометра [2].

Цель настоящей работы — определение аналитических характеристик и возможностей количественного определения эфедрина и верапамила в биологических жидкостях методом ТСХ с применением компьютерной денситометрии при судебно-химических исследованиях.

¹Кормишин Василий Алексеевич (kormishinva@inbox.ru), кафедра химии фармацевтического факультета Самарского государственного медицинского университета, 443099, Российская Федерация, г. Самара, ул. Чапаевская, 89; врач-судмедэксперт судебно-химического отделения Ульяновского областного бюро судебно-медицинской экспертизы, 432064, Российская Федерация, г. Ульяновск, пр. Врача Сурова, 4.

²Воронин Александр Васильевич (dimmu2000@mail.ru), Шаталаев Иван Федорович (syuric@proezd.net), кафедра химии фармацевтического факультета Самарского государственного медицинского университета, 443099, Российская Федерация, г. Самара, ул. Чапаевская, 89.

Материалы и методы исследования

Материалы исследования: стандартные образцы эфедрина и верапамила (раствор эфедрина в метаноле концентрации 1,0 мг/мл (производитель фирма "АВВОТТ"), раствор верапамила в метаноле концентрации 1,0 мг/мл (производитель "Киевмедпрепарат")), модельные растворы мочи, содержащие определенные концентрации эфедрина и верапамила.

Модельные растворы эфедрина и верапамила в метаноле готовили путем разведения вышеуказанных стандартных образцов метанолом квалификации "ХЧ" с погрешностью 3 %. Модельные растворы мочи готовили путем добавления расчетного количества стандартных образцов к образцам мочи, не содержащим эфедрин, верапамил и другие наркотические средства, психотропные вещества с погрешностью 3 %.

В работе были использованы методы тонкослойной хроматографии, 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) [3]; метанол — 25 % раствор аммиака (100 : 1,5) [4]; элюирование в двух системах растворителей с различным R_f значительно снижает вероятность получения ложноположительного результата. Пробу объемом 100 мкл наносили многократно микрошприцем в точку диаметром 5 мм, подсушивая пластинку феном. Погрешность дозирования микрошприцем составляет 1 %. Проявление — обработка реактивом Драгендорфа для верапамила [3], обработка 0,5 % раствором нингидрина в ацетоне с последующим нагреванием в токе воздуха при 80 °С в течение 15 мин для эфедрина [5].

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 [3; 6]. 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 и верапамила методом ТСХ, используемая в практике судебно-химического отделения Ульяновского областного бюро судебно-медицинской экспертизы [7].

Основной проблемой ТСХ-анализа эфедрина и верапамила с визуальной регистрацией является невозможность сохранения результатов — "пятна" (зоны на хроматограмме, соответствующие веществам) после проявления теряют интенсивность окраски в течение 15–20 мин, и, как следствие, наблюдается 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 и верапамила, т. е. снижению чувствительности анализа.

Пластинки после хроматографирования, проявления и высушивания сканировали на планшетном сканере или 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 модельных растворов аналитов в метаноле 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 и верапамила методом тонкослойной хроматографии

Аналит	Эффективность растровых манипуляций	Предел обнаружения, мкг/мл	Величина Rf	
			этилацетат-метанол-25 % раствор аммиака (17 : 2 : 1)	метанол-25 % раствор аммиака (100 : 1,5)
Эфедрин	+	10,0	0,21 ± 0,05	0,36 ± 0,03
Верапамил	++	10,0	0,73 ± 0,02	0,75 ± 0,03

Примечание. "+" – просмотр изображения в негативе; "++" – просмотр изображения в негативе с увеличением резкости изображения

На основании вышеуказанных результатов интервал поиска Rf для эфедрина и верапамила в компьютерной программе был задан на уровне 0,1 и 0,06 соответственно, т. е. в диапазоне ± 0,05 и ± 0,03 от среднего значения Rf.

Значения пределов обнаружения для эфедрина и верапамила при исследовании модельных растворов аналитов в метаноле составили 10,0 мкг/мл (что соответствует 1 мкг в пробе). Повышение пределов обнаружения в модельных растворах мочи обусловлено потерями при пробоподготовке, а также присутствием соэкстрактивных веществ в пробе, что создает дополнительный фон на пластинке.

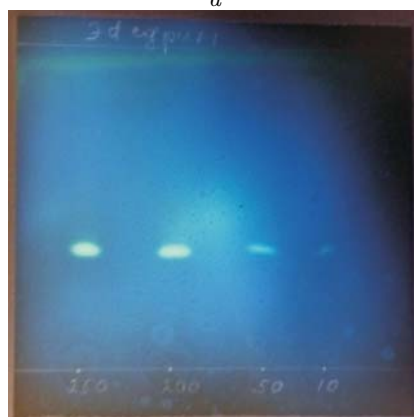
При исследовании модельных растворов мочи удалось достигнуть пределов обнаружения около 30,0 мкг/мл эфедрина и около 50,0 мкг/мл верапамила в пробе за счет применения растровых манипуляций с электронным образом хроматограммы – изменения резкости, интенсивности изображения, параметров яркости и контрастности, возможности просмотра хроматограммы в негативе. Данные манипуляции позволяют сделать почти незаметное для человеческого глаза "пятно" анализируемого вещества четко детектируемым. На рисунке приведены хроматограммы модельных растворов мочи с концентрациями эфедрина 10,0; 50,0; 200,0; 250,0 мкг/мл.

Градуировочные зависимости "площадь пятна (Y) – количество эфедрина и верапамила, мкг (X)", построенные в диапазоне концентраций 10,0–250,0 мкг/мл, описываются уравнениями полиномиальной (квадратичной) регрессии. Однако для установления данной зависимости необходимо использовать более трех модельных растворов аналита в метаноле различных концентраций, что в условиях повседневной аналитической практики приведет к снижению производительности анализа.

Для упрощения аналитической задачи нами было предложено применение линейной регрессии, при этом количество модельных растворов аналита в метаноле, используемых для градуировки, было уменьшено до двух, при этом относительная



а



б



в

Рис. Хроматограммы модельных растворов мочи с концентрацией эфедрина 10,0; 50,0; 200,0; 250,0 мкг/мл:
а — после обработки 0,5 % раствором нингидрина в ацетоне без растворяющих манипуляций; б — просмотр в негативе; в — просмотр в негативе с увеличением резкости изображения

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).

Таблица 2

Градуировочные характеристики количественного денситометрического определения эфедрина и верапамила

Вещество	Источник электронного образа	Полиномиальная регрессия	Линейная регрессия
Эфедрин	Сканер	$Y=0,0078 \cdot X^2+73,92 \cdot X+274,37$ $0,0078 \pm 0,0002; 73,92 \pm 4,43;$ $274,37 \pm 16,46$	$Y=76,90 \cdot X-46,28$ $76,90 \pm 3,04;$ $46,28 \pm 2,26$
	Фотоаппарат	$Y=0,025 \cdot X^2+66,46 \cdot X-569,67$ $0,025 \pm 0,0015; 66,46 \pm 3,52;$ $569,67 \pm 27,34$	$Y=61,41 \cdot X+477,24$ $61,41 \pm 3,61;$ $477,24 \pm 24,33$
Верапамил	Сканер	$Y=0,081 \cdot X^2+72,80 \cdot X+380,47$ $0,081 \pm 0,0025; 72,80 \pm 2,48;$ $380,47 \pm 14,83$	$Y=96,22 \cdot X-589,75$ $96,22 \pm 2,89;$ $589,75 \pm 21,52$
	Фотоаппарат	$Y=0,0069 \cdot X^2+11,54 \cdot X-73,44$ $0,0069 \pm 0,0004; 11,54 \pm 0,69;$ $73,44 \pm 3,76$	$Y=9,42 \cdot X+32,29$ $9,42 \pm 0,55;$ $32,29 \pm 1,61$

Результаты контроля правильности методики определения эфедрина и верапамила при использовании различных комбинаций пар модельных растворов анализов в метаноле с определенными концентрациями представлены в табл. 3. При производстве контроля правильности методики проводили по 10 параллельных определений.

Таблица 3

Результаты контроля правильности количественного денситометрического определения эфедрина и верапамила

Аналит	Источник электронного образа	Ст, мкг/мл	Ст*, мкг/мл	S, у. е.	С ₀ , мкг/мл	m, мкг	%
Эфедрин	Сканер	250,0; 100,0	10,0 ¹	115	10,78	1,078	7,8
		100,0; 10,0 ¹	250,0	2831	266	26,6	6,4
		250,0; 10,0 ¹	100,0	1110	104,3	10,43	4,3
	Фотокамера	250,0; 100,0	10,0 ¹	1101	13,5	1,35	35
		100,0; 10,0 ¹	250,0	23040	282,5	28,25	13
		250,0; 10,0 ¹	100,0	9297	114	11,4	14

Окончание табл. 3

Аналит	Источник электронного образа	Сст, мкг/мл	Сст*, мкг/мл	S, у. е.	Со, мкг/мл	m, мкг	%
Верапамил	Сканер	250,0; 100,0	10,0 ¹	124	11,65	1,165	16,5
		100,0; 10,0 ¹	250,0	2882	270,75	27,075	8,3
		250,0; 10,0 ¹	100,0	1141	107,2	10,72	7,2
	Фотокамера	250,0; 100,0	10,0 ¹	1019	12,50	1,25	25
		100,0; 10,0 ¹	250,0	22020	270	27	8
		250,0; 10,0 ¹	100,0	8784	107,7	10,77	7,7

Примечания. Сст — концентрации модельных растворов аналитов в метаноле, используемые для градуировки, мкг/мл; Сст* — концентрации модельных растворов, приготовленных отдельно от растворов, используемых для градуировки, и служащих в качестве контроля правильности количественного определения аналитов, мкг/мл; S — площадь пятна в условных единицах, соответствующих пикселям экрана монитора; Со — рассчитанная концентрация аналита в пробе, мкг/мл; m — рассчитанная масса аналита в пробе, мкг; % — относительная ошибка определения среднего значения концентрации аналита в пробе, %; 1 — концентрация 10,0 мкг/мл при объеме, наносимой на пластинку пробы 100 kb мкл соответствует пределу обнаружения.

Различие в уравнениях регрессии, полученных при оцифровке сканером и фотоаппаратом, объясняется наличием дополнительного фона при фотографировании пластин — "паразитное освещение", блики, чего удается избежать при сканировании пластин.

Относительная ошибка определения среднего значения содержания эфедрина и верапамила в пробе в диапазоне концентраций 10,0–250,0 мкг/мл не превышает соответственно 35 и 25 % при использовании для получения электронного образа хроматограммы цифрового фотоаппарата и 7,8 и 16,5 % соответственно — в случае сканирования хроматографических пластинок, последний вариант является наиболее предпочтительным. Наименьшая величина ошибки достигается при концентрациях эфедрина и верапамила в пробе 100 мкг/мл.

Заключение

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 на эфедрин и верапамил в биологических жидкостях. Анализ биологических жидкостей на эфедрин и верапамил проводится сериями с использованием модельных раство-

ров эфедрина и верапамила в метаноле с концентрацией 10,0 и 250,0 мкг/мл. Данная методика может быть применена в клинико-токсикологическом анализе.

Литература

- [1] Еремин С.К., Изотов Б.Н., Веселовская Н.В. Анализ наркотических средств / под ред. Б.Н. Изотова. М.: Мысль, 1993. 270 с.
- [2] WEB-страница И.Н. Плахотного [Электронный ресурс]. URL: <http://www.garruc2008.narod.ru>. (дата обращения: 09. 09 2011).
- [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] Наркотические средства, психотропные и сильнодействующие вещества / Р.В. Бабахаян [и др.]. СПб.: Реноме, 2008. 276 с.
- [5] Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов: учебное пособие / под ред. проф. Н.И. Калетиной. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 1016 с.
- [6] Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. London: The pharmaceutical press, 2011. 2473 p.
- [7] Химико-токсикологический анализ веществ, вызывающих одурманивание: метод. указания / под ред. Б.Н. Изотова. М., 1987. 122 с.

Поступила в редакцию 8/IV/2013;
в окончательном варианте — 8/IV/2013.

EPHEDRINE AND VERAPAMYLE DENSITOMETRIC ANALYSIS IN JUDICIAL-CHEMICAL EXAMINATION

© 2013 V.A. Kormishin³ A.V. Voronin, I.F. Shatalaev⁴

In this article the analytical characteristics of method of analysis of ephedrine and verapamyle with application of thin-layer chromatography and densitometry is considered. Detection limit of ephedrine and verapamyle is 10,0 $\mu\text{g/ml}$ in a sample. The possibility of ephedrine and verapamyle quantitative determination in model samples in the range of 10,0–250,0 $\mu\text{g/ml}$ concentration is indicated.

Key words: ephedrine, verapamyle, densitometry, thin-layer chromatography.

Paper received 8/IV/2013.

Paper accepted 8/IV/2013.

³Kormishin Vasily Alekseevich (kormishinva@inbox.ru), the Dept. of Chemistry of Pharmaceutical Faculty, Samara State Medical University, Samara, 443099, Russian Federation. Judicial-medical expert of judicial-chemical branch of the bureau of a forensic medical examination of the Ulyanovsk region, Ulyanovsk, 432064, Russian Federation.

⁴Voronin Alexander Vasilievich (dimmu2000@mail.ru), Shatalaev Ivan Fedorovich (cyric@proezd.net), the Dept. of Chemistry of Pharmaceutical Faculty, Samara State Medical University, Samara, 443099, Russian Federation.