

УДК 543.426

ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОДЕИНА В ОРГАНАХ ЧЕЛОВЕКА

^{1,2}Немихин В.В., ¹Качин С.В., ¹Сагалаков С.А., ²Шахворостова Т.С.

¹ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет», Красноярск;

²КГБУЗ «Красноярское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы»,
Красноярск, e-mail: basilefs88@mail.ru

Весьма перспективным методом для определения кодеина в биологических объектах является люминесцентная спектроскопия. Данный метод сочетает в себе высокую чувствительность, селективность, экспрессность определения с относительной простотой аппаратного оформления. Спектр люминесценции кодеина в 0,05 М растворе серной кислоты представляют собой широкую бесструктурную полосу с характерным максимумом (λ_{lum}) при 345 нм. «Щелочные извлечения» из образцов биоматериала, содержащего кодеин, также люминесцируют с $\lambda_{lum} = 345$ нм. Это указывает на возможность его определения в присутствии сопутствующих компонентов. Разработана люминесцентная методика определения кодеина (0,01–0,75 мг/г) в некоторых органах человека. Рассчитанный предел обнаружения составляет $3 \cdot 10^{-3}$ мг/г, относительное стандартное отклонение не превышает 0,06. Методика успешно апробирована на «модельных» и экспертных образцах печени и стенки желудка с применением независимого метода ВЭЖХ. Полученные результаты люминесцентного определения кодеина в органах человека позволяют рекомендовать разработанную методику для ее использования в практике экспертных учреждений.

Ключевые слова: люминесценция, кодеин, органы человека

LUMINESCENT DETERMINATION OF CODEINE IN HUMAN ORGANS

^{1,2}Nemikhin V.V., ¹Kachin S.V., ¹Sagalakov S.A., ²Shakhvorostova T.S.

¹Siberian Federal University, Krasnoyarsk;

²Krasnoyarsk Regional Bureau of Forensic Medical Examination,
Krasnoyarsk, e-mail: basilefs88@mail.ru

The luminescent spectroscopy is very promising method for the determination of codeine in biological objects. This method combines high sensitivity, selectivity, rapidity of the determination with the relative simplicity of the equipment design. The luminescence spectrum of codeine in 0,05 M sulfuric acid solution is a broad structureless band with a characteristic maximum (λ_{lum}) at 345 nm. «Alkaline extractions» of samples of biological material containing codeine also luminesce with $\lambda_{lum} = 345$ nm. This indicates the possibility of the determination in the presence of associated components. The luminescence procedure the codeine (0,01–0,75 mg/g) determination in some human organs was developed. The limit of detection of the codeine is $3 \cdot 10^{-3}$ mg/g, the relative standard deviation is not more than 0,06. The procedure for the «model» and expert samples of liver and stomach's side with using HPLC as independent method was successfully approbated. According to results of the luminescence determination of the codeine in human organs the developed procedure can be recommended for using in practice of expert institutions.

Keywords: luminescence, codeine, human organs

В настоящее время в практике судебно-медицинской экспертизы отмечается рост числа определений наркотического анальгетика кодеина в органах человека. Это связано с увеличением доли смертельных случаев, вызванных употреблением относительно нового, легкодоступного наркотика дезоморфина (сленговое название «крокодил») [1]. В кустарных условиях дезоморфин получают взаимодействием кодеина, выделенного из лекарственных препаратов, со смесью кристаллического йода и красного фосфора [2].

Одним из наиболее распространенных методов определения лекарственных и наркотических веществ в различных объектах является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [3]. Вместе с тем определение этим методом отдельных компонентов, в частности, кодеина, в органах человека требует особо тщательной пробоподготовки, а в ряде случаев – приме-

ние токсичных растворителей. Кроме того, сложный состав проб предполагает применение особо чистых элюентов и периодическую регенерацию хроматографических колонок, что ведет к увеличению времени и стоимости анализа [4].

Весьма перспективным может быть использование метода люминесцентной спектроскопии (ЛС), который сочетает в себе высокую чувствительность, селективность, экспрессность с относительной простотой аппаратного оформления [5].

Цель данной работы – изучение возможности люминесцентного определения кодеина в некоторых органах человека.

Материалы и методы исследования

Приборы и оборудование

Спектры и интенсивность люминесценции исследуемых образцов регистрировали на спектрофлуориметре «Флюорат-02 Панорама» (ООО «Люмэкс», Россия). Управление прибором и обработку результатов осуществляли на персональном компьютере с ис-

пользованием программного обеспечения «Рапогата Про», версия 2.0.0.

Сравнительный анализ образцов проводили методом ВЭЖХ [4] на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Милихром А-02» (ЗАО Институт хроматографии «ЭкоНова», г. Новосибирск, Россия) с УФ-спектрофотометрическим детектором и металлической колонкой (2×75 мм), заполненной сорбентом Prontosil 120-5 C18. Обработку хроматограмм проводили на персональном компьютере с использованием базы данных «БД-500» и программного обеспечения «МультиХром», версия 1.5х-Е.

Проботбор и пробоподготовка

В качестве исследуемого биоматериала использовали образцы печени, стенки желудка, отобранные экспертами Отдела судебно-медицинской экспертизы трупов Красноярского краевого бюро судебно-медицинской экспертизы.

Навески биоматериала по 20 г, измельчали, тщательно перемешивали, а затем извлекали кодеин по методике [6]. Для этого к полученным пробам добавляли по 40 мл 0,01 М раствора HCl и настаивали 2 часа при постоянном перемешивании. Жидкие фазы отделяли центрифугированием (2500 об/мин) в течение 30 мин, а к твердым фазам добавляли по 20 мл 0,01 М HCl и повторяли операции, описанные выше.

Объединенные водные растворы трижды экстрагировали диэтиловым эфиром порциями по 20, 15, 15 мл в течение 15 минут. Эфирные экстракты отбрасывали, а водные растворы последовательно экстрагировали порциями по 15 мл в смеси хлороформ – бутанол (9:1) при pH = 8, хлороформа (pH = 10), диэтилового эфира (pH = 13). Экстракты «щелочных

извлечений» кодеина объединяли, фильтровали через бумажный фильтр («красная лента») и упаривали досуха при комнатной температуре в чашках Петри. Полученные сухие остатки растворяли в 5 мл хлороформа. Эффективность извлечения кодеина в данном случае составляет около 85%.

Для проведения люминесцентного анализа в пенициллиновые флаконы емкостью 15 мл отбирали по 2 мл полученных хлороформных растворов, упаривали досуха в токе воздуха при температуре 40 °C и сухие остатки растворяли в 5 мл 0,05 М H₂SO₄. Спектры люминесценции снимали в диапазоне длин волн 310–590 нм при длине волны возбуждения 300 нм [7].

Для сравнительного анализа методом ВЭЖХ также отбирали по 2 мл полученных хлороформных растворов, проводили операции, как описано выше, а сухие остатки растворяли в 1 мл метилового спирта. Аликвоты полученных спиртовых растворов по 0,1 мл помещали в специальные пробирки для ВЭЖХ и проводили измерения при следующих условиях: УФ-детектирование в диапазоне длин волн 220–300 нм (базовая длина волны – 210 нм); элюенты: А – [4,0 М LiClO₄ в 0,1 М HClO₄]:H₂O в соотношении 5:95, В – ацетонитрил (в режиме градиентного элюирования); скорость потока элюентов – 200 мкл/мин; температура колонки – 40 °C; объем водимой пробы – 5 мкл.

Результаты исследования и их обсуждение

Спектр люминесценции раствора кодеина в 0,05 М H₂SO₄ представляют собой широкую бесструктурную полосу с характерным максимумом ($\lambda_{\text{люм}}$) при 345 нм (рис. 1) [8].

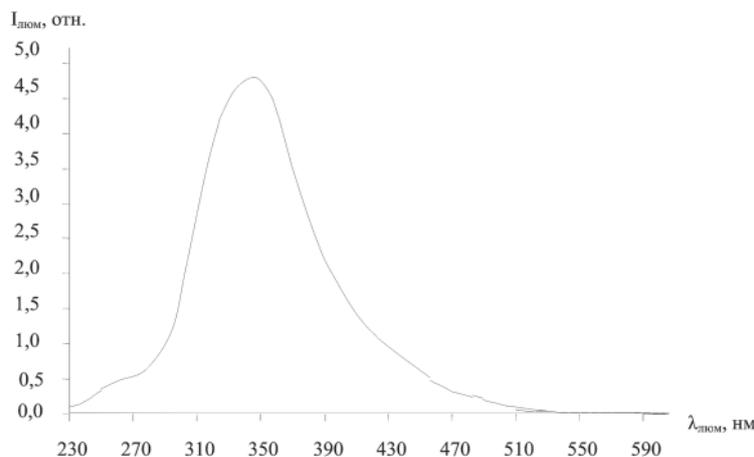


Рис. 1. Спектр люминесценции раствора кодеина (1 мг/мл) в 0,05 М H₂SO₄

Предварительные эксперименты показали, что «щелочные извлечения» из образцов биоматериала, содержащего кодеин, также люминесцируют с $\lambda_{\text{люм}} = 345$ нм. Это указывает на возможность его определения в присутствии сопутствующих компонентов.

Содержание кодеина в биоматериале можно определять по градуировочным графикам, полученным с использованием

стандартных растворов, биоматериала, не содержащего кодеин, или методом добавок.

На рис. 2 в качестве примера приведен градуировочный график для люминесцентного определения кодеина, полученный с использованием стандартных растворов. Предел обнаружения кодеина, рассчитанный по 3S-критерию, составил 3 мкг/мл ($n = 3$, $P = 0,95$). Градуировочный график линеен до 1,0 мг кодеина на 1 мл раствора.

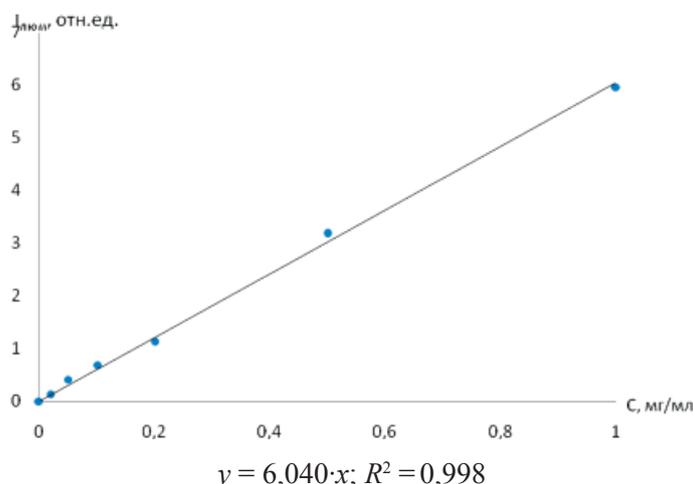


Рис. 2. Градуировочный график для люминесцентного определения кодеина ($\lambda_{возб} = 300$ нм, $\lambda_{люм} = 345$ нм)

Содержание кодеина (Q , мг/г) в биоматериале можно рассчитать по уравнению:

$$Q = (C \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot 100) / (V_2 \cdot m_n \cdot R), \quad (1)$$

где C – концентрация кодеина, рассчитанная по градуировочному графику; V_1 – общий объем раствора «щелочных извлечений» кодеина в хлороформе (5 мл); V_2 – аликвотная часть раствора «щелочных извлечений» кодеина в хлороформе для его количественного определения (2 мл); V_3 – объем раствора «щелочных извлечений» кодеина в H_2SO_4 (5 мл); m_n – масса навески биоматериала (20 г); R – процент извлечения кодеина (85%).

В табл. 1 приведены результаты люминесцентного определения кодеина в «модельных образцах» печени.

Таблица 1

Результаты люминесцентного определения кодеина в «модельных образцах» печени ($n = 3, P = 0,95$)

Содержание кодеина ($Q \pm \delta$), мг/г		S	S _r
Введено	Найдено		
0,050	0,047 ± 0,007	0,003	0,06
0,100	0,105 ± 0,009	0,004	0,04
0,250	0,245 ± 0,017	0,007	0,03

Как видно из табл. 1, полученные результаты методом «введено – найдено» удовлетворительно совпадают. Относительное стандартное отклонение не превышает 0,06.

Вместе с тем при проведении серийных анализов представляется более оправданным определять содержание кодеина в органах человека по градуировочному графику, полученному с использованием матрицы биоматериала. Для этого в навески биоматериала (20 г), не содержащего коде-

ин, добавляли стандартные растворы кодеина фосфата в этиловом спирте (1 мг/мл) и проводили пробоподготовку, как описано выше. В этом случае прямолинейная зависимость интенсивности люминесценции от содержания кодеина сохраняется в диапазоне 0,01–0,75 мг/г, а предел обнаружения составляет $3 \cdot 10^{-3}$ мг/г.

Исследование экспертных образцов. Для апробации разработанной методики люминесцентного определения кодеина в органах человека был взят случай реального отравления кодеинсодержащими препаратами. Исследованию были подвергнуты образцы печени и стенки желудка. В табл. 2 приведены сравнительные результаты определения кодеина методами ЛС и ВЭЖХ.

Таблица 2

Результаты определения кодеина в экспертных образцах методами ЛС и ВЭЖХ ($P = 0,95; n = 3$)

Экспертный образец	Содержание кодеина ($Q \pm \delta$), мг/г	
	Метод ЛС	Метод ВЭЖХ
Печень	0,040 ± 0,005	0,035 ± 0,005
Стенка желудка	0,133 ± 0,009	0,126 ± 0,012

Как видно из табл. 2, результаты люминесцентного определения кодеина в экспертных образцах удовлетворительно совпадают с данными независимого метода ВЭЖХ.

Полученные результаты люминесцентного определения кодеина в органах человека позволяют рекомендовать разработанную методику для ее использования в практике экспертных учреждений.

Выводы

1. Разработана люминесцентная методика определения кодеина (0,01–0,75 мг/г) в некоторых органах человека.

2. Методика успешно апробирована на «модельных» и экспертных образцах печени и стенки желудка с применением независимого метода ВЭЖХ.

3. Полученные результаты люминесцентного определения кодеина в органах человека позволяют рекомендовать разработанную методику для ее использования в практике экспертных учреждений.

Список литературы

1. Веселовская Н.В., Коваленко А.Е. Наркотики: свойства, действие, фармакокинетика, метаболизм. – М.: Триада – X, 2000. – 206 с.
2. Катаев С.С., Зеленина Н.Б., Шилова Е.А. Определение дезоморфина в моче. Проблемы экспертизы в медицине. – 2007. – № 1. – С. 32–36.
3. Snyder L.R., Kirkland J.J., Dolan J.W. Introduction to Modern Liquid Chromatography. John Wiley & Sons, 2009. – 960 p.
4. Кокорина Н.О. Скрининг лекарственных препаратов в биологических жидкостях методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). – Новосибирск, 2010. – 18 с.
5. Harvey D. Modern Analytical Chemistry. – McGraw-Hill, 2000. – 798 p.
6. Крамаренко В.Ф. Токсикологическая химия. – Киев: Высшая школа, 1989. – 447 с.
7. Люминесцентное определение кодеина в некоторых лекарственных препаратах / В.В. Немихин, С.В. Качин, С.А. Сагалаков, Н.А. Козель // Аналитика Сибири и Дальнего Востока: материалы IX Научной конференции. – Красноярск, 2012. – С. 268.
8. Chalmers R.A., Wadds G.A. Spectrofluorimetric analysis of mixtures of the principal opium alkaloids. Analyst. – 1970. – Vol. 95. – P. 234–241.

References

1. Veselovskaya N.V., Kovalenko A.E. Narkotiki: svoystva, deistviye, farmakokinetika, metabolism [Drugs: the properties, action, pharmacokinetic, metabolism]. Moscow, Triada-X, 2000. 206 p.
2. Kataev S.S., Zelenina N.B., Shilova E.A. Opredeleniye dezomorfina v moche [Dezomorfine determination in urine]. Problems of expertise in medicine. 2007. no.1. pp. 32–36.
3. Snyder L.R., Kirkland J.J., Dolan J.W. Introduction to Modern Liquid Chromatography. John Wiley & Sons, 2009. 960 p.
4. Kokorina N.O. Skrininyng lekarstvennykh preparatov v biologicheskikh zhidkostyakh metodom vysokoeffektivnoy zhidkostnoy khromatografii [Drugs screening in biological fluids by high performance liquid chromatography (HPLC)]. Novosibirsk, 2010. 18 p.
5. Harvey D. Modern Analytical Chemistry. McGraw-Hill, 2000. 798 p.
6. Kramarenko V.F. Toksikologicheskaya khimiya [Toxicological Chemistry]. Kiev, High School, 1989. 447 p.
7. Nemikhin V.V., Kachin S.V., Sagalakov S.A., Kozel N.A. Luminescentnoe opredeleniye kodeina v nekotorykh lekarstvennykh preparatakh [Codeine luminescence determination in some drugs]. Proceedings of the IX Scientific Conference «Analytics of Siberia and the Far East». Krasnoyarsk, 2012. pp. 268.
8. Chalmers R.A., Wadds G.A. Spectrofluorimetric analysis of mixtures of the principal opium alkaloids. Analyst. 1970. Vol. 95. pp. 234–241.

Рецензенты:

Париллов С.Л., д.м.н., доцент кафедры судебной медицины ИПО, ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Красноярск;

Бурмакина Г.В., д.х.н., главный научный сотрудник Института химии и химической технологии СО РАН, г. Красноярск.

Работа поступила в редакцию 29.12.2012.