

А.В. Воронин
**ДЕНСИТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ
НЕКОТОРЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ В КРОВИ**
*ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет»
Минздрава России, г. Самара*

Цель исследования – разработка методики количественного определения ряда лекарственных веществ в крови методом тонкослойной хроматографии с компьютерной денситометрией. Объектом исследования были модельные образцы крови, содержащие морфин, кодеин, верапамил, баклофен, доксиламин, амитриптилин. Определены параметры идентификации веществ методом тонкослойной хроматографии, исследованы интерференционные эффекты. Пределы обнаружения в образцах крови составили для морфина, кодеина, амитриптилина 600,0 нг/мл (5,0 мкг в пробе), для верапамила, доксиламина – 150,0 нг/мл (1,0 мкг в пробе), для баклофена – 75,0 нг/мл (0,5 мкг в пробе). Для количественного определения использовали сканирование хроматограмм, обработку изображения и построение градуировочной зависимости в компьютерной программе. Градуировочные зависимости описываются уравнениями полиномиальной (квадратичной) регрессии. Пределы количественного определения для разных веществ составили от 300,0 до 1500,0 нг/мл; правильность и сходимости в сериях параллельных определений не превышают 25%.

Таким образом, разработана методика анализа лекарственных веществ в крови методом тонкослойной хроматографии с компьютерной денситометрией. Рабочие диапазоны методики позволяют использовать ее в судебно-химической экспертизе и клиническом химико-токсикологическом анализе.

Ключевые слова: лекарственные вещества, тонкослойная хроматография, компьютерная денситометрия, количественное определение.

A.V. Voronin
**THE DENSITOMETRIC QUANTITATION
OF SOME DRUGS IN WHOLE BLOOD**

The study objective was the development of quantitation technique for some drugs in whole blood using thin-layer chromatography with videodensitometry. The study subject was model samples of whole blood containing morphine, codeine, verapamil, baclofen, doxylamine, amitriptyline. The identification parameters of drugs by thin-layer chromatography were defined, interferences of blood matrix and other drugs were studied. Limits of detection in blood samples were 600,0 ng/ml (5,0 µg/spot) for morphine, codeine, amitriptyline, 150,0 ng/ml (1,0 µg/spot) for verapamil, doxylamine, 75,0 ng/ml (0,5 µg/spot) for baclofen. For drug quantitation the chromatograms were scanned, images were processed and calibration models were designed using videodensitometry computer program. The calibration model is described by polynomial (square) regression. The limits of quantitation for different drugs were from 300,0 to 1500,0 ng/ml; accuracy and precision does not exceed 25%.

Thus, a quantitation technique for analysis of some drugs in whole blood by thin-layer chromatography with videodensitometry was developed. The ranges of quantitation allow using this technique for forensic chemistry and clinical analytical toxicology.

Key words: drugs, thin-layer chromatography, videodensitometry, quantitation.

В практике судебно-химической экспертизы и химико-токсикологического анализа актуальной задачей является получение информации о наличии токсикологически важных веществ в биологических жидкостях на этапе скрининга. Метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) является экспрессным, высокопроизводительным и достаточно селективным. Введение в процедуру ТСХ-анализа денситометрии дает аналитику возможность количественного определения и документирования результатов [1]. Также следует отметить преимущество ТСХ перед колоночными вариантами хроматографического анализа – высокая производительность и отсутствие ложноположительных результатов, связанных с переносом анализируемых веществ из одной пробы в другую в хроматографической системе [2].

Цель исследования – разработка методики количественного определения ряда лекарственных веществ в крови методом тонкослойной хроматографии с компьютерной денситометрией.

Материал и методы

В работе использовали стандартные образцы следующих веществ: морфин (в форме сульфата), кодеин, верапамил (в форме гидрохлорида), баклофен, доксиламин (в форме сукцината), амитриптилин (в форме гидрохлорида) (LGC Standards, Великобритания).

Модельные образцы крови готовили путем добавления к образцам крови, не содержащим наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ, расчетного количества стандартных образцов вышеуказанных веществ (в виде метанольных растворов в концентрации 10,0 мкг/мл в пересчете на соответствующее основание). Диапазоны концентраций лекарственных веществ в пробах крови составляли: морфин, кодеин, амитриптилин – 500,0-10000,0 нг/мл; верапамил, доксиламин – 100,0-5000,0 нг/мл; баклофен – 50,0-2000,0 нг/мл.

Пробоподготовку образцов крови осуществляли жидкость-жидкостной экстракцией. Объем пробы крови составлял 10 мл; условия экстракции были следующими: для

морфина, кодеина – смесь хлороформ-изопропанол (9:1) при pH 8-9; для баклофена – хлороформ-н-бутанол (6:4) при pH 4; для остальных лекарственных веществ – хлороформ при pH 9-11. Полученные экстракты упаривали до сухого остатка в токе теплого воздуха при температуре не более 40°C. Сухой остаток растворяли в 50 мкл смеси хлороформ – этанол (1:1).

Условия хроматографического разделения были следующими: пробу объемом 50 мкл наносили микрошприцем на пластины для ТСХ «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ» размером 10×15 см в виде полосы толщиной не более 1 мм и шириной не более 0,5 см, при нанесении зону первичной адсорбции высушивали теплым воздухом.

В качестве систем растворителей (подвижных фаз) использовали: для морфина, кодеина, верапамила, доксиламина, amitриптилина – этилацетат-метанол-аммиак 25% (ЭМА) (17:2:1), толуол-ацетон-этанол-аммиак 25% (ТАЭА) (45:45:7:3); для верапамила, баклофена – метанол-аммиак 25% (100:1,5) (МА); для баклофена – дихлорметан-этанол-аммиак 25% (67,5:30:2,5) (ДЭА). Насыщение камеры парами растворителей проводили в течение 30 мин.

Детектирование хроматограмм проводили реактивом Драгендорфа для морфина, коде-

ина, верапамила, доксиламина, amitриптилина – реактивом Марки, для морфина, кодеина – раствором нингидрина в ацетоне 0,05%, а также в УФ-свете, при длине волны 254 нм (морфин, кодеин, верапамил, доксиламин, amitриптилин) и при 365 нм (доксиламин).

Полученные хроматограммы фиксировали путем сканирования с оптическим разрешением 900 dpi в True Color-режиме на планшетном сканере, сохраняли в виде файлов с расширением jpeg и обрабатывали с использованием программы «ТСХ-менеджер 4.0» [3, 4].

Определение пределов обнаружения и диапазона определяемых концентраций, интерференционных эффектов, правильности и прецизионности проводили в соответствии рекомендациями «Руководства по валидации аналитических методик, используемых в судебно-химическом и химикотоксикологическом анализе биологического материала» [5].

Результаты и обсуждение

В табл. 1 приведены параметры методики идентификации исследуемых лекарственных веществ в модельных образцах крови. Были использованы подвижные фазы и варианты детектирования анализируемых веществ, наиболее часто используемые в практике судебно-химической экспертизы.

Таблица 1

Параметры методики идентификации лекарственных веществ в крови

Анализируемое вещество	Подвижная фаза	R _f	Детектирование	Предел обнаружения	
				С, нг/мл	т, мкг/проба
Морфин	ЭМА	0,31±0,07	Реактив Драгендорфа УФ-свет 254 нм	600,0	5,0*
	ТАЭА	0,28±0,05	Реактив Марки	1200,0	10,0
Кодеин	ЭМА	0,41±0,05	Реактив Драгендорфа УФ-свет 254 нм	600,0	5,0*
	ТАЭА	0,33±0,04	Реактив Марки	1200,0	10,0
Верапамил	ЭМА	0,73±0,04	Реактив Драгендорфа УФ-свет 254 нм	150,0	1,0*
	МА	0,75±0,03		150,0	1,0*
Баклофен	МА	0,70±0,04	Раствор нингидрина в ацетоне 0,05%	75,0	0,5
	ДЭА	0,30±0,03		75,0	0,5*
Доксиламин	ЭМА	0,69±0,05	Реактив Драгендорфа УФ-свет 254 нм	150,0	1,0*
	ТАЭА	0,60±0,03	Реактив Драгендорфа УФ-свет 365 нм	750,0	5,0
Амитриптилин	ЭМА	0,71±0,05	Реактив Драгендорфа УФ-свет 254 нм	600,0	5,0
	ТАЭА	0,60±0,04		600,0	5,0*

* Варианты анализа, выбранные для количественного определения.

Для определения предела обнаружения исследуемых веществ были проанализированы модельные образцы крови в следующих диапазонах концентраций: для морфина, кодеина, верапамила, доксиламина, amitриптилина – 100,0-5000,0 нг/мл; для баклофена – 50,0-2000,0 нг/мл.

Для пробоподготовки использовали образцы крови объемом 10 мл, а объем пробы, наносимой на хроматографическую пластину,

составлял 50 мкл. При определении величины предела обнаружения использовали визуальную регистрацию обработанного изображения хроматограммы, для обработки изображения применяли программные средства «ТСХ-менеджер 4.0» – просмотр хроматограммы в негативе и увеличение контрастности. Наименьшие величины предела обнаружения обеспечивали детектирование в УФ-свете, проявление хроматограмм реактивом Драген-

дорфа и раствором нингидрина в ацетоне 0,05% (для баклофена).

Пределы обнаружения методом ТСХ с денситометрической регистрацией составили: для морфина, кодеина, амитриптилина – 600,0 нг/мл (5,0 мкг в пробе), для верапамила, доксиламина – 150,0 нг/мл (1,0 мкг в пробе), для баклофена – 75,0 нг/мл (0,5 мкг в пробе).

Влияние балластных веществ крови на результаты анализа учитывали путем исследования «холостых» проб крови в условиях, приведенных в табл. 1. При этом хроматографических зон в диапазоне значений R_f 0,3-0,8 на пластинках не детектировали.

Интерференционные эффекты оценивались на двух группах модельных образцов

крови: первая группа содержала морфин (1000,0 нг/мл), кодеин (1000,0 нг/мл), верапамил (200,0 нг/мл), доксиламин (200,0 нг/мл), амитриптилин (1000,0 нг/мл), вторая – баклофен (100,0 нг/мл), верапамил (200,0 нг/мл).

Полное разделение (разрешение R_s более 1,5) наблюдалось для хроматографических зон морфина, кодеина с зонами доксиламина, амитриптилина, верапамила (табл. 2). Для пар анализируемых веществ, имеющих показатель R_s менее 1,5, при совместном присутствии в пробе количественное определение невозможно.

Исследование на баклофен проводится с использованием подвижной фазы ДЭА, поэтому вышеперечисленные вещества не мешают его определению в крови.

Таблица 2

Результаты разделения образцов крови, содержащих комбинации лекарственных веществ

Анализируемое вещество	R_f	Зоны	R_s	Анализируемое вещество	R_f	Зоны	R_s
Подвижная фаза – ЭМА				Подвижная фаза – ТАЭА			
Морфин	0,31	1-2	0,89	Морфин	0,28	1-2	0,35
Кодеин	0,41	2-3	4,23	Кодеин	0,33	2-3	3,89
Доксиламин	0,69	3-4	0,15	Доксиламин	0,60	3-4	0,0
Амитриптилин	0,71	4-5	0,17	Амитриптилин	0,60		
Верапамил	0,73						

Определение характера зависимости аналитического сигнала – площади хроматографической зоны от концентрации определяемых веществ – показало, что при количестве морфина, амитриптилина свыше 10,0 мкг в пробе, верапамила, доксиламина свыше 5,0 мкг в пробе и баклофена свыше 1,5 мкг в пробе наблюдается отклонение от линейной зависимости.

Для изучаемых лекарственных веществ были определены градуировочные зависимости, которые описываются уравнениями полиномиальной (квадратичной) регрессии, а также диапазоны концентраций в крови, в которых возможно проводить количественное определение (рабочие диапазоны методики) методом денситометрии (табл. 3).

Таблица 3

Характеристика методики количественного определения лекарственных веществ в крови методом денситометрии

Анализируемое вещество	Уравнение градуировочной зависимости	Предел количественного определения, нг/мл	Диапазон определяемых концентраций, нг/мл
Морфин	$0,013 \cdot X^2 + 10,3 \cdot X - 730,5$	1200,0	1200,0-10000,0
Кодеин	$0,021 \cdot X^2 + 10,6 \cdot X - 23,8$	1400,0	1400,0-10000,0
Верапамил	$0,081 \cdot X^2 + 36,2 \cdot X - 501,3$	300,0	300,0-5000,0
Баклофен	$0,014 \cdot X^2 + 11,9 \cdot X + 37,6$	160,0	160,0-1000,0
Доксиламин	$0,010 \cdot X^2 + 30,5 \cdot X - 87,2$	300,0	300,0-5000,0
Амитриптилин	$0,011 \cdot X^2 + 10,5 \cdot X + 39,3$	1500,0	1500,0-10000,0

Диапазоны определяемых концентраций в крови для морфина, кодеина и амитриптилина соответствуют летальной концентрации, для верапамила и доксиламина – токсической и летальной концентрациям, для баклофена – терапевтической и токсической концентрациям. Это обуславливает возможность применения предложенной методики для решения задач судебно-химической экспертизы, а также клинического химиико-токсикологического анализа.

Для оценки правильности и прецизионности (сходимости) методики анализировали образцы крови с известными количествами лекарственных веществ трех уровней концен-

траций в пределах рабочего диапазона методики. Определяли сходимость результатов измерений (относительное стандартное отклонение), полученных в 5 разных аналитических циклах – параллельных определений в разные дни (табл. 4).

Относительные погрешности определения морфина, кодеина, верапамила и амитриптилина в крови, используемые для оценки правильности методики, для всех уровней концентраций не превышали значения $\pm 20,0\%$. Для верхних уровней концентрации баклофена (800,0 нг/мл) и доксиламина (4000,0 нг/мл) погрешность составляет около $\pm 22,0\%$.

Результаты оценки правильности и прецизионности методики количественного денситометрического определения лекарственных веществ в крови

Анализируемое вещество	Уровни концентраций в образцах крови, нг/мл	Правильность, %	Сходимость между сериями параллельных определений, %
Морфин	Нижний 2000,0	16,8	17,1
	Средний 4000,0	14,3	7,4
	Высокий 8000,0	19,6	4,1
Кодеин	Нижний 2000,0	16,2	22,7
	Средний 4000,0	14,7	9,8
	Высокий 8000,0	16,5	5,4
Верапамил	Нижний 500,0	16,4	24,3
	Средний 2000,0	14,8	10,5
	Высокий 4000,0	20,2	5,8
Баклофен	Нижний 200,0	24,8	21,8
	Средний 400,0	20,6	9,4
	Высокий 800,0	22,3	5,2
Доксиламин	Нижний 500,0	19,8	22,6
	Средний 2000,0	18,0	9,9
	Высокий 4000,0	22,1	5,5
Амитриптилин	Нижний 2000,0	18,8	20,1
	Средний 4000,0	15,7	8,7
	Высокий 8000,0	20,4	4,8

Максимальное значение относительной погрешности определения определялось для баклофена на нижнем уровне концентрации 200,0 нг/мл и составило $\pm 24,8\%$

Сходимость результатов определений всех анализируемых лекарственных веществ на нижнем уровне концентраций была в диапазоне 17,0-24,0%, на верхнем уровне концентраций – 4,0-6,0%.

Заключение

Разработана методика количественного определения лекарственных веществ – морфина, кодеина, верапамила, баклофена, док-

силамина, amitriptilina – в крови методом тонкослойной хроматографии с использованием компьютерной денситометрии. Сканирование хроматограмм и использование специальной программы позволили количественно оценить содержание лекарственных веществ в пробах крови.

Данная методика характеризуется показателями правильности и прецизионности, не превышающими значения $\pm 25,0\%$, и может быть рекомендована для применения в судебно-химической экспертизе и экспресс-диагностике острых отравлений.

Сведения об авторе статьи:

Воронин Александр Васильевич – к.фарм.н., доцент, зав. кафедрой химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. Адрес: 443099, г. Самара, ул. Чапаевская, 89. Тел./факс: 8(846)332-29-07. E-mail: dim-mu2000@mail.ru.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кормишин В.А. Денситометрическое определение некоторых наркотических средств и психотропных веществ в химико-токсикологических исследованиях: автореф. дис. ... канд. фарм.наук. – Самара, 2014. – 24 с.
2. Обьедкова Е.В. Разработка схемы определения стероидных гормонов и нестероидных противовоспалительных препаратов в биологических жидкостях методом ВЭТСХ: дис. ... канд. хим. наук. – СПб., 2014. – 180 с.
3. Ренкевич, А.Ю. Разработка и валидация методики количественного определения 4-аминобутановой кислоты в таблетках алендроната натрия методом мицеллярной тонкослойной хроматографии / А.Ю. Ренкевич, А.Ю. Куликов // Методы и объекты химического анализа. – 2013. – Т. 8, № 4. – С. 199-206.
4. Разработка и валидация методики количественного определения таблеток 11-дезоксимизопропостола / А.Г. Ялкаев [и др.] // Медицинский альманах. – 2017. – Т. 48, № 3. – С. 198-202.
5. Методические рекомендации по валидации аналитических методик, используемых в судебно-химическом и химико-токсикологическом анализе биологического материала. – М., 2014. – 76 с.

REFERENCES

1. Kormishin V.A. Densitometric determination of some narcotic drugs and psychotropic substances in chemical-toxicological studies: avtoref. dis. ... kand. farm.nauk, Samara, 2014, 24 p. (In Russ.).
2. Ob'edkova E.V. Razrabotka shemy opredeleniya steroidnykh gormonov i nesteroidnykh protivovospalitel'nykh preparatov v biologicheskikh zhidkostyakh metodom VJeTSH (Development of a regimen for determining steroid hormones and non-steroidal anti-inflammatory drugs in biological fluids using the HETC method): dis. ... kand. him.nauk, SPb., 2014, 180 p. (In Russ.).
3. Renkevich A.Yu., Kulikov A.Yu. Development and validation 4-aminobutyric acid assay in alendronate sodium tablets using micellar thin-layer chromatography. Methods and Objects of Chemical Analysis. 2013;8(4):199-206. (In Russ.).
4. Yalkaev A.G., Kildiyarov F.Kn., Kataev V.A. [et al.] Development and validation of the procedure for the quantification of tablets of 11-deoxyimipoprostopol. Medical almanac. 2017; 48(3):198-202. (In Russ.).
5. Metodicheskie rekomendacii po validacii analiticheskikh metodik, ispol'zuemykh v sudebno-himicheskom i himiko-toksikologicheskom analize biologicheskogo materiala (Methodical recommendations on the validation of analytical techniques used in forensic and chemical toxicological analysis of biological material). Moscow, 2014, 76 p. (In Russ.).