

**На правах рукописи**

**Кормишин Василий Алексеевич**

**ДЕНСИТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ  
НЕКОТОРЫХ НАРКОТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ  
И ПСИХОТРОПНЫХ ВЕЩЕСТВ В ХИМИКО-  
ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ**

**14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук**

**Самара - 2014**

Работа выполнена в государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, профессор **Шаталаев Иван Федорович**

**Официальные оппоненты:**

**Катаев Валерий Алексеевич** – доктор фармацевтических наук, профессор, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра послевузовского и дополнительного профессионального фармацевтического образования, заведующий кафедрой, проректор по научной и инновационной работе

**Буланова Анжела Владимировна** – доктор химических наук, профессор, федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Самарский государственный университет», кафедра физической химии и хроматографии, профессор

**Ведущая организация:**

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «05» июня 2014 г. в 12.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.085.06 при государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (443079, г. Самара, пр. К. Маркса, 165 Б).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171; [www.samsmu.ru](http://www.samsmu.ru)).

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат фармацевтических наук, доцент

Петрухина Ирина Константиновна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Проблема экспертизы смертельных отравлений наркотическими средствами является актуальной и насущной. Причина этого – широкое распространение употребления наркотиков в подростковой и молодежной среде, высокой летальностью среди наркоманов, резким ростом количества наркоманов по всей России, высоким уровнем заболеваемости наркоманов ВИЧ, гепатитами В и С.

В последние годы произошли существенные изменения в спектре потребляемых наркотических средств. Получил распространение феномен «полинаркомании» или осложненной наркомании, то есть использование лекарственных «коктейлей», в состав которых входит до 5 наименований психоактивных веществ. В связи с этим возросло число случайных и умышленных интоксикаций лекарственными и наркотическими средствами различных фармакологических групп. Состав «коктейлей» неоднороден и зависит от местной региональной ситуации, круга общения, материального обеспечения и других факторов. При употреблении «коктейлей» доза каждого из принятых веществ может не достигать токсического уровня, но при этом сильно искажается картина отравления и нередко употребление многокомпонентной смеси приводит к летальному исходу (Саакаян М.В., 2007; Григорец Ф.И., 2010).

В работе химиков - экспертов весьма актуальным является получение быстрой и достоверной информации о наличии токсикантов в биологическом материале на этапе скрининга. Этому требованию в полной мере отвечает метод тонкослойной хроматографии (ТСХ). 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 полуколичественного определения анализируемых веществ и документирования результатов (Симонов Е.А., Изотов Б.Н., Фесенко А.В., 2000).

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.

**Цели и задачи работы.** Целью настоящего исследования является оптимизация предварительного исследования в химико-токсикологическом анализе на опиаты, барбитураты, фенилалкиламины и ряд других лекарственных веществ.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Определение аналитических характеристик: пределов обнаружения, значений  $R_f$ , величин интенсивности окраски и флуоресценции ряда токсикантов (фенобарбитала, барбитала, барбамила, морфина, кодеина, эфедрина, верапамила, доксиламина, амитриптилина, димедрола, баклофена) методом ТСХ с применением программы для денситометрии «ТСХ-менеджер».
2. Установление характера градуировочных зависимостей для полуколичественного денситометрического определения фенобарбитала, барбитала, барбамила, морфина, кодеина, эфедрина, верапамила, доксиламина, амитриптилина, димедрола, баклофена, а также провести оценку влияния способа регистрации хроматограмм, программных растровых манипуляций на аналитические характеристики изучаемых веществ.
3. Определение метрологических характеристик методики полуколичественного денситометрического анализа исследуемых веществ.
4. Апробация методики полуколичественного денситометрического определения изучаемых веществ на модельных образцах мочи.
5. Проведение экономической оценки эффективности внедрения в практику химико-токсикологического анализа предложенных методик денситометрического определения токсикантов.
6. Разработка проекта методических указаний для химиков-экспертов «Денситометрическое определение ряда наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ в химико-токсикологическом анализе» для химиков – экспертов судебно-химических отделений.

**Научная новизна.** Разработана методика денситометрического анализа ряда наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ (фенобарбитала, барбитала, барбамила, морфина, кодеина, эфедрина, верапамила, доксиламина, амитриптилина, димедрола, баклофена) в моче, а также обоснована возможность полуколичественного определения вышеуказанных веществ методом денситометрии в условиях серийного химико-

токсикологического анализа на этапе предварительного исследования.

В условиях модельного эксперимента определены метрологические характеристики разработанных методик полуколичественного определения изучаемых веществ в образцах мочи.

Показана возможность полуколичественного определения вышеуказанных веществ и документирования результатов исследования в условиях рутинного анализа в судебно-химическом отделении Бюро судебно-медицинской экспертизы.

**Практическая значимость.** Практическая значимость работы заключается в том, что в результате исследований разработан проект методических указаний «Денситометрическое определение ряда наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ в химико-токсикологическом анализе» для практических химиков-экспертов судебно-химических отделений Бюро судебно-медицинской экспертизы, что позволит повысить эффективность их работы. Результаты диссертационных исследований используются в ГКУЗ «Ульяновское областное бюро судебно-медицинской экспертизы», ГКУЗ «Ульяновская областная наркологическая клиническая больница», а также в учебном процессе на кафедрах фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, химии фармацевтического факультета государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки.** Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России (номер государственной регистрации 01200202298) по теме «Комплексные исследования по проблеме создания новых лекарственных препаратов природного и синтетического происхождения» (№ 01200900658).

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Результаты определения аналитических характеристик некоторых наркотических средств, психотропных веществ методом ТСХ с применением денситометрии.
2. Оценка влияния программных растровых манипуляций на аналитические характеристики методики денситометрического определения ряда

наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ.

3. Метрологические характеристики методики полуколичественного денситометрического определения исследуемых веществ.

4. Апробация методики полуколичественного денситометрического определения исследуемых веществ на модельных образцах мочи.

**Апробация работы.** Основные материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на Всероссийской научно-практической конференции, посвящённой 40-летию фармацевтического факультета СамГМУ «Современная фармацевтическая наука и практика: традиции, инновации, приоритеты», (Самара, 2011); IV Международной научно-практической конференции «Теория и практика современной науки» (Москва, 2011); IX Международной научно-практической конференции «Современные проблемы гуманитарных и естественных наук» (Москва, 2011); II международной научно-практической конференции «Интеграция науки и практики как механизм эффективного развития современного общества» (Москва, 2011); II Международной научно-практической конференции «Теоретические и практические аспекты развития современной науки» (Москва, 2011); I Международной научно-практической конференции «Научные итоги 2011 года: достижения, проекты, гипотезы» (Новосибирск, 2011); XIV Международной научно-практической конференции «Наука и современность – 2011» (Новосибирск 2011); международной заочной научно-практической конференции «Вопросы науки и техники» (Новосибирск, 2012); Всероссийской конференции с международным участием «Молодые ученые – медицине» (Самара, 2012); Российской научно-практической конференции «Современные проблемы фармацевтической науки», посвященной 75-летию ПГФА (Пермь, 2012); Всеукраинской научно-практической конференции «Актуальные вопросы создания новых лекарственных средств» (Харьков, 2012); международной научно-практической конференции «Фармакологический фундамент современной медицины, проблемы и пути их решения» (Минск, 2012); XVII Всероссийском конгрессе «Экология и здоровье человека» (Самара, 2012); 68-ой научно-практической конференции «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции» (Волгоград, 2013).

**Публикации.** Основное содержание диссертации изложено в 17 печатных работах, в том числе 4 статьи опубликованы в журналах, рекомендованных ВАК

РФ.

**Личный вклад автора.** Приведенные в диссертации результаты исследования Кормишина В.А. полностью соответствуют имеющимся в регистрационных документах (лабораторных журналах, хроматограммах, денситограммах и др.). Все исследования: обработка, анализ и оценка результатов выполнены лично Кормишиным В.А. или при его непосредственном участии. Кормишиным В.А. определены градуировочные зависимости между количеством токсиканта и аналитическим сигналом, а также установлены величины  $R_f$  в определенных системах растворителей.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной объектам и методам исследований, трех глав собственных исследований, выводов, списка литературы, включающего 130 наименований, в т. ч. 36 источников иностранных авторов, а также 5 приложений. Работа изложена на 145 страницах машинописного текста, включает 11 таблиц, 23 рисунка и приложения. Диссертация завершается общими выводами по работе, списком литературы.

Результаты, полученные при проведении исследований, обработаны статистически и представлены в таблицах и на рисунках, которые приведены в тексте диссертации.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Объекты и методы исследования**

Объектами исследования являлись: рабочие стандартные образцы (РСО) следующих производителей: фирмы «Radian» - раствор морфина в метаноле концентрации 1 мг/мл, раствор кодеина в метаноле концентрации 1 мг/мл; фирмы «АВВОТ» - раствор фенобарбитала в метаноле концентрации 1 мг/мл, раствор барбитала в метаноле концентрации 1 мг/мл, раствор барбамила в метаноле концентрации 1 мг/мл, раствор эфедрина в метаноле концентрации 1 мг/мл, раствор доксиламина в метаноле концентрации 1 мг/мл, раствор амитриптилина в метаноле концентрации 1 мг/мл, раствор баклофена в метаноле концентрации 1 мг/мл, раствор димедрола в метаноле концентрации 1 мг/мл; фирмы ОАО «Киевмедпрепарат» - раствор верапамила в метаноле

концентрации 1 мг/мл. Образцы мочи, не содержащие наркотических средств и психотропных веществ.

Для приготовления модельных образцов мочи без примесей производили забор мочи от здоровых добровольцев без дополнительной водной нагрузки, не принимавших лекарственные препараты в течение месяца до отбора проб.

### **Оборудование:**

пластины для ТСХ «ПТСХПА-УФ» (Россия, Краснодар); камеры хроматографические под пластины 10x10; камера для опрыскивания окрашивающим веществом; нагревательное устройство для сушки пластин; пульверизатор; пинцет; пипетки-дозаторы полуавтоматические; пипетки градуированные на 1, 5, 10 мл; пипетки глазные или полимерные на 3 мл; микрошприцы на 10 мкл; флаконы из дрота, емкостью 10 мл; выпарительные чашки; центрифуга на 3000-5000 об/мин; делительная воронка; источник УФ света с длиной волны 254 и 365 нм; сканер планшетный (фирма MUSTEC); цифровая фотокамера (фирма CANON); персональный компьютер с минимальными требованиями (CPU Pentium 166 МГц, ОЗУ не менее 32 Мбайт, свободное место на жестком диске не менее 100 Мбайт, для хранения хроматограмм, операционная система Windows 98/2000/XP); ПО «ТСХ-МЕНЕДЖЕР 3.12».

**В работе были использованы методы** жидкость-жидкостной экстракции, тонкослойной хроматографии, денситометрии (с использованием компьютерной программы для обработки изображений «ТСХ-менеджер» 3.12), регрессионный статистический анализ.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Исследования по идентификации определяемых соединений методом ТСХ были проведены на модельных растворах индивидуальных веществ – фенобарбитала, барбитала, барбамила, морфина, кодеина, эфедрина, верапамила, доксиламина, баклофена, димедрола, амитриптилина в метиловом спирте с концентрацией аналитов 5, 10, 50, 100, 150, 200, 250 мкг/мл. На хроматографическую пластину, предварительно активированную



при 80°C в течение 15 мин., микрошприцем наносили 100 мкл раствора, подсушивая пластину феном. Затем пластину помещали в хроматографическую камеру, предварительно насыщенную парами растворителя, в течение 30 мин. После хроматографирования пластины высушивали при комнатной температуре. Затем пластины фотографировали в ультрафиолетовом свете при длинах волн 254 и 365 нм. Далее пластины обрабатывали детектирующим реагентом, подсушивали, фотографировали цифровой фотокамерой или сканировали на планшетном сканере.

Полученное цифровое изображение хроматографической пластины формата *jpg* загружали в компьютерную программу «ТСХ-МЕНЕДЖЕР» и денситометрировали.

При проведении ТСХ-анализа использовали системы растворителей, наиболее часто используемые в судебно-химическом отделении Ульяновского областного бюро судебно-медицинской экспертизы: этилацетат-метанол-аммиак 25% (17:2:1) (ЭМА) для опиатов, фенилалкиламинов, амитриптилина, доксиламина, димедрола; толуол-ацетон-этанол-аммиак 25% (45:45:7:3) (ТАЭА) для опиатов, амитриптилина, доксиламина, димедрола; хлороформ-ацетон (9:1) (ХА) для барбитуратов; метанол-аммиак 25% (100:1,5) (МА) для фенилалкиламинов и баклофена; дихлорметан-этанол-аммиак 25% (67,5:30:2,5) (ДЭА) для баклофена. Детектирование хроматограмм проводили: реактивом Драгендорфа для опиатов, верапамила, амитриптилина, доксиламина, димедрола; реактивом Марки для опиатов; раствором сульфата ртути 2% и 0,05% раствором дифенилкарбазона в хлороформе для барбитуратов; раствором нингидрина в ацетоне 0,05% для эфедрина, баклофена; УФ-свет с длиной волны 254 нм для опиатов, верапамила, амитриптилина, доксиламина, димедрола; УФ-свет с длиной волны 365 нм для доксиламина.

При исследовании растворов стандартных образцов в диапазоне концентраций 5,0-250,0 мкг/мл проводили по 10 параллельных определений. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

**Аналитические характеристики методики определения некоторых наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ методом тонкослойной хроматографии**

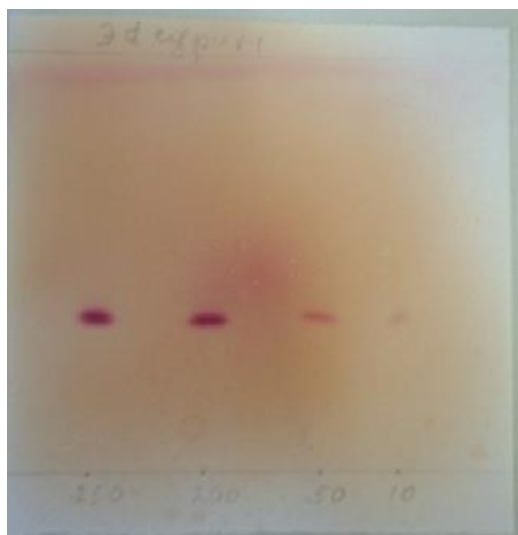
Анализируемое вещество	Система растворителей	$R_f$	Детектирование	Предел обнаружения	
				С мкг/мл	т, мкг в пробе
Морфин	ЭМА	0,31±0,05	Р. Драгендорфа. УФ-свет 254 нм.	50,0	5,0
	ТАЭА	0,28±0,04	Р. Марки	100,0	10,0
Кодеин	ЭМА	0,34±0,02	Р. Драгендорфа. УФ-свет 254 нм.	50,0	5,0
	ТАЭА	0,31±0,03	Р. Марки	100,0	10,0
Фенобарбитал	ХА	0,30±0,02	Р-р сульфата ртути 2% / 0,05% р-р дифенилкарбазона в хлороформе	50,0	5,0
Барбитал	ХА	0,25 ±0,02		50,0	5,0
Барбамил	ХА	0,34 ±0,03		50,0	5,0
Эфедрин	ЭМА	0,21 ±0,05	Р-р нингидрина в ацетоне 0,05%	10,0	1,0
	МА	0,36 ± 0,03			
Амитриптилин	ЭМА	0,71 ±0,02	Р. Драгендорфа.	50,0	5,0
	ТАЭА	0,60 ±0,04	УФ-свет 254 нм.		
Доксиламин	ЭМА	0,69 ±0,02	Р. Драгендорфа	10,0	1,0
			УФ-свет 254 нм	50,0	5,0
	ТАЭА	0,60 ±0,01	УФ-свет 365 нм	100,0	10,0
Димедрол	ЭМА	0,63 ±0,02	Р. Драгендорфа.	50,0	5,0
	ТАЭА	0,55 ±0,02	УФ-свет 254 нм.		
Баклофен	МА	0,72±0,03	Р-р нингидрина в ацетоне 0,05%	5,0	0,5
	ДЭА	0,30 ±0,02			
Верапамил	ЭМА	0,73 ±0,02	Р. Драгендорфа.	10,0	1,0
	МА	0,75 ±0,03	УФ-свет 254 нм.		

Предел обнаружения, выраженный в концентрации мкг/мл, определялся при нанесении на пластину 100 мкл раствора.

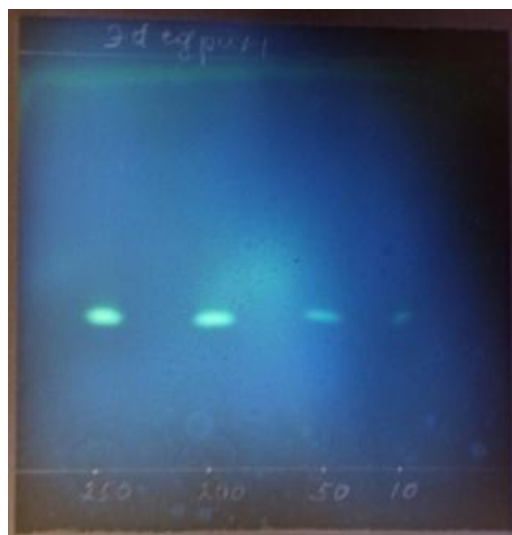
Предел обнаружения методом ТСХ с визуальной регистрацией сигнала (при условии нанесения 100 мкл раствора на пластину) составляет: для опиатов

100 мкг/мл, для барбитуратов 70 мкг/мл, для фенилалкиламинов 20 мкг/мл, для димедрола 70 мкг/мл, для амитриптилина 20 мкг/мл, для доксиламина 30 мкг/мл, для баклофена 10 мкг/мл.

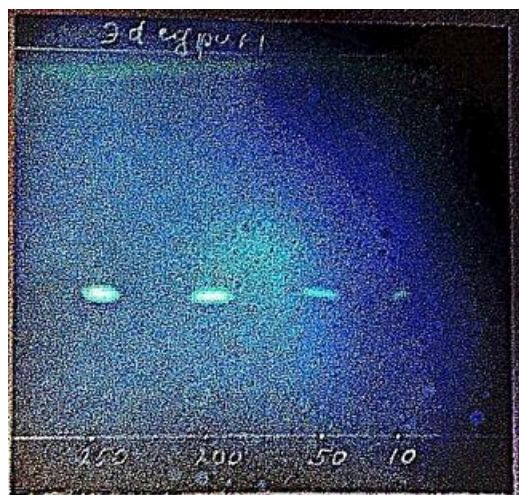
Уменьшение величины предела обнаружения вносят растровые манипуляции с электронным образом хроматограммы – изменения резкости, интенсивности изображения, изменения параметров яркости и контрастности, возможности просмотра хроматограммы в негативе. Данные манипуляции позволяют сделать почти незаметное для человеческого глаза «пятно» анализируемого вещества четко детектируемым. При исследовании модельных образцов мочи также удалось достигнуть предела обнаружения близкого к значениям стандартных растворов в пробе за счет растровых манипуляций. На рисунке приведены хроматограммы модельных образцов мочи с концентрациями эфедрина 10,0, 50,0, 200,0, 250,0 мкг/мл.



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 растровых манипуляций; б – просмотр в негативе; в – просмотр в негативе с увеличением резкости изображения.

Для определения количественных характеристик методики денситометрического анализа проводили по 10 параллельных исследований. На пластину наносили градуировочный образец в четырех заданных концентрациях и анализируемый раствор аналита. После хроматографирования и денситометрирования в программе строили градуировочный график по четырем точкам и определяли концентрацию аналита. Градуировочная зависимость «площадь пятна (Y) – концентрация аналита, мкг/мл (X)», построенная в диапазоне концентраций 5,0-250,0 мкг/мл, описывается уравнением полиномиальной (квадратичной) регрессии. Однако, для установления данной зависимости необходимо использовать не менее четырех 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, при этом количество градуировочных образцов было уменьшено до двух, при этом относительная ошибка определения не превышала 25%, 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 (таблица 2).

Таблица 2

### Градуировочные характеристики количественного денситометрического определения анализируемых веществ

Анализируемое вещество	Источник электронного образа	Полиномиальная регрессия	Линейная регрессия
Морфин	Сканер	$Y = 0,013 \cdot X^2 + 20,0 \cdot X - 569,3$ 0,13±0,004; 20,0±0,9; 569,3±18,3;	$Y = 23,9 \cdot X - 730,1$ 23,9±0,99; 730,1±29,2;
	Фотоаппарат	$Y = 0,021 \cdot X^2 + 17,6 \cdot X - 362,2$ 0,021±0,0008; 17,6±0,81; 362,2±17,9;	$Y = 23,8 \cdot X - 627,5$ 23,8±0,69; 627,5±18,3;
Кодеин	Сканер	$Y = 0,0013 \cdot X^2 + 1,1 \cdot X + 7,6$ 0,0013±0,00007; 1,1±0,55; 7,6±0,03;	$Y = 1,6 \cdot X - 23,8$ 1,6±0,06; 23,8±0,98;
	Фотоаппарат	$Y = 0,002 \cdot X^2 + 5,8 \cdot X + 15,7$ 0,002±0,0001; 5,8±0,24; 15,7±0,65;	$Y = 6,4 \cdot X - 27,7$ 6,4±0,25; 27,7±1,03
Фенобарбитал	Сканер	$Y = 0,024 \cdot X^2 + 113,4 \cdot X - 132,4$ 0,024±0,0007; 113,4±3,3; 132,4±3,9;	$Y = 106,98 \cdot X - 405,9$ 106,98±4,7; 405,9±16,2;

	Фотоаппарат	$Y = 0,078 \cdot X^2 + 90,7 \cdot X - 167,8$ $0,078 \pm 0,0027; 90,7 \pm 2,91; 167,8 \pm 5,5;$	$Y = 113,1 \cdot X - 1351,8$ $113,1 \pm 4,3; 1351,8 \pm 41,7;$
Барбитал	Сканер	$Y = 0,009 \cdot X^2 + 113,9 \cdot X - 237,8$ $0,009 \pm 0,0005; 113,9 \pm 5,2; 237,8 \pm 9,2;$	$Y = 112,5 \cdot X - 116,0$ $112,5 \pm 3,3; 116,0 \pm 3,5;$
	Фотоаппарат	$Y = 0,069 \cdot X^2 + 121,8 \cdot X - 3814,8$ $0,069 \pm 0,0003; 121,8 \pm 4,82; 3814,8 \pm 152,3$	$Y = 78,1 \cdot X - 1595,20$ $78,1 \pm 2,5; 1595,20 \pm 63,5;$
Барбамил	Сканер	$Y = 0,026 \cdot X^2 + 93,3 \cdot X - 67,8$ $0,026 \pm 0,0008; 93,3 \pm 2,7; 67,8 \pm 2,6;$	$Y = 101,62 \cdot X - 468,00$ $101,62 \pm 3,1; 468 \pm 18,0;$
	Фотоаппарат	$Y = 0,101 \cdot X^2 + 135,5 \cdot X - 839,7$ $0,101 \pm 0,004; 135,5 \pm 5,2; 839,7 \pm 28,3;$	$Y = 99,9 \cdot X - 1859,2$ $99,9 \pm 4,7; 1859,2 \pm 73,8;$
Эфедрин	Сканер	$Y = 0,009 \cdot X^2 + 73,9 \cdot X + 274,4$ $0,009 \pm 0,0002; 73,92 \pm 4,43; 274,37 \pm 16,46$	$Y = 76,9 \cdot X - 46,3$ $76,90 \pm 3,04; 46,28 \pm 2,26$
	Фотоаппарат	$Y = 0,025 \cdot X^2 + 66,5 \cdot X - 569,7$ $0,025 \pm 0,0015; 66,46 \pm 3,52;$ $569,67 \pm 27,34$	$Y = 61,4 \cdot X + 477,2$ $61,41 \pm 3,61;$ $477,24 \pm 24,33$
Амитриптилин	Сканер	$Y = 0,011 \cdot X^2 + 73,5 \cdot X - 269,3$ $0,011 \pm 0,0004; 73,5 \pm 2,8; 269,3 \pm 10,7;$	$Y = 71,3 \cdot X + 39,3$ $71,3 \pm 2,6; 39,3 \pm 1,51;$
	Фотоаппарат	$Y = 0,020 \cdot X^2 + 61,3 \cdot X - 497,7$ $0,020 \pm 0,0008; 61,3 \pm 2,3; 497,7 \pm 21,3;$	$Y = 60,9 \cdot X - 346,3$ $60,9 \pm 2,7; 346,3 \pm 14,3;$
Доксиламин	Сканер	$Y = 0,009 \cdot X^2 + 76,5 \cdot X - 279,8$ $0,009 \pm 0,0005; 76,5 \pm 2,63; 279,8 \pm 11,2;$	$Y = 75,9 \cdot X - 116,3$ $75,9 \pm 2,41; 116,3 \pm 4,63;$
	Фотоаппарат	$Y = 0,017 \cdot X^2 + 64,3 \cdot X - 449,2$ $0,017 \pm 0,0008; 64,3 \pm 2,3; 449,2 \pm 18,5;$	$Y = 71,2 \cdot X - 326,3$ $71,2 \pm 2,83; 326,3 \pm 14,1;$
Димедрол	Сканер	$Y = 0,011 \cdot X^2 + 74,4 \cdot X + 583,9$ $0,011 \pm 0,0004; 74,4 \pm 2,13; 583,9 \pm 23,2;$	$Y = 74,9 \cdot X + 119,8$ $74,9 \pm 3,1; 119,8 \pm 4,7;$
	Фотоаппарат	$Y = 0,106 \cdot X^2 + 88,2 \cdot X - 251,2$ $0,106 \pm 0,005; 88,2 \pm 3,1; 251,2 \pm 10,1;$	$Y = 119,2 \cdot X - 1859,7$ $119,2 \pm 3,7; 1859,7 \pm 69,3;$
Баклофен	Сканер	$Y = -0,014 \cdot X^2 + 13,9 \cdot X - 117,4$ $0,014 \pm 0,0007; 13,9 \pm 0,57; 117,4 \pm 4,52;$	$Y = 9,9 \cdot X + 50,1$ $9,9 \pm 0,35; 50,1 \pm 2,5;$
	Фотоаппарат	$Y = -0,006 \cdot X^2 + 11,8 \cdot X - 21,9$ $0,006 \pm 0,0003; 11,8 \pm 0,44; 21,9 \pm 0,85;$	$Y = 9,7 \cdot X + 106,2$ $9,7 \pm 0,36; 106,2 \pm 4,9;$
Верапамил	Сканер	$Y = 0,081 \cdot X^2 + 72,8 \cdot X + 380,5$ $0,081 \pm 0,0025; 72,80 \pm 2,48;$ $380,47 \pm 14,83$	$Y = 96,2 \cdot X - 589,7$ $96,22 \pm 2,89;$ $589,75 \pm 21,52$
	Фотоаппарат	$Y = 0,007 \cdot X^2 + 11,5 \cdot X - 73,4$ $0,0069 \pm 0,0004; 11,54 \pm 0,69; 73,44 \pm 3,76$	$Y = 9,42 \cdot X + 32,3$ $9,42 \pm 0,55; 32,29 \pm 1,61$

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.

Результаты контроля правильности методики определения некоторых наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ с применением их контрольных растворов, (приготовленных независимо от градуировочных образцов), при использовании различных комбинаций пар градуировочных образцов представлены в таблице 3.

Таблица 3

**Результаты контроля правильности полуколичественного денситометрического определения анализируемых веществ при определении их пороговой концентрации**

Анализируемое вещество	Вариант получения файла с изображением хроматограммы	Сст, мкг/мл	Сст* мкг/мл	S y.e.	Со мкг/мл	m мкг	%
Эфедрин	Сканер	250,0; 100,0	10,0	115	10,78	1,078	7,8
	Фотокамера	250,0; 100,0	10,0	1101	13,5	1,35	25
Верапамил	Сканер	250,0; 100,0	10,0	124	11,65	1,165	16,5
	Фотокамера	250,0; 100,0	10,0	1019	12,50	1,25	25
Морфин	Сканер	250,0; 100,0	50,0	65	55,2	5,5	10,4
	Фотокамера	250,0; 100,0	50,0	638	58,1	5,8	16,2
Кодеин	Сканер	250,0; 100,0	50,0	77	54,3	5,4	8,6
	Фотокамера	250,0; 100,0	50,0	704	55,4	5,5	10,8
Фенобарбитал	Сканер	250,0; 100,0	50,0	52	50,7	5,1	1,4
	Фотокамера	250,0; 100,0	50,0	732	51,3	5,1	2,6
Барбитал	Сканер	250,0; 100,0	50,0	48	55,5	5,6	11,0
	Фотокамера	250,0; 100,0	50,0	590	58,0	5,8	16,0
Барбамил	Сканер	250,0; 100,0	50,0	50,2	51,3	5,1	2,5

	Фотокамера	250,0; 100,0	50,0	453	52,8	5,3	5,5
Амитриптилин	Сканер	250,0; 100,0	10,0	110	11,3	1,1	13,0
	Фотокамера	250,0; 100,0	10,0	1368	11,7	1,2	17
Доксиламин	Сканер	250,0; 100,0	10,0	110	11,5	1,2	15,0
	Фотокамера	250,0; 100,0	10,0	1450	12,1	1,21	21,0
Димедрол	Сканер	250,0; 100,0	50,0	81	54,9	5,5	9,8
	Фотокамера	250,0; 100,0	50,0	663	57,2	5,7	14,3
Баклофен	Сканер	250,0; 100,0	5,0	70,6	5,6	0,6	12,0
	Фотокамера	250,0; 100,0	5,0	696	6,0	0,6	20,0

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; Сст\* равна пределу обнаружения, при условии нанесения на пластину 100 мкл образца.

S – площадь пятна в условных единицах, соответствующих пикселям экрана монитора;

So – рассчитанная концентрация аналита в пробе, мкг/мл;

m – рассчитанная масса аналита в пробе, мкг;

% - относительная ошибка определения среднего значения концентрации аналита в пробе, %.

Относительная ошибка определения среднего значения содержания аналитов в пробе не превышает соответственно 25% при использовании для получения электронного образа хроматограммы цифрового фотоаппарата и 16,5% – в случае сканирования хроматографических пластинок, последний вариант является наиболее предпочтительным. Наименьшая величина ошибки достигается при концентрации аналитов в пробе 100,0 мкг/мл.

**Метрологические характеристики методики полуколичественного денситометрического определения ряда наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ**

Анализируемое вещество	*	Коэффициент чувствительности мл/мкг	Правильность %	Относительное стандартное отклонение %	Дисперсия у.е.
Морфин	с	0,379	7,2	5,38	12,25
	ф	0,142	11,4	7,4	2237,3
Кодеин	с	0,300	4,6	5,82	16,81
	ф	0,147	13,9	7,24	2601
Фенобарбитал	с	0,153	2,2	4,03	4,41
	ф	0,113	7,8	4,51	1089,0
Барбитал	с	0,221	7,6	5,21	6,25
	ф	0,114	14,9	5,93	1225,0
Барбамил	с	0,256	1,7	3,98	4,0
	ф	0,136	3,7	5,52	625,40
Эфедрин	с	0,968	6,2	6,35	53,29
	ф	0,789	17,3	6,53	5184,0
Амитриптилин	с	0,900	9,3	5,73	39,69
	ф	0,821	12,1	6,51	7921
Доксиламин	с	0,848	11,3	7,18	62,41
	ф	0,699	15,3	9,72	19881
Димедрол	с	0,360	8,7	8,65	49,1
	ф	0,240	11,4	8,82	3481,0
Баклофен	с	1,362	7,7	7,22	26,01
	ф	1,112	12,7	8,76	3721,0
Верапамил	с	0,249	10,7	10,5	169,6
	ф	0,093	13,6	11,18	12996,0

\* - вариант получения файла с изображением хроматограммы, С – сканер; Ф - фотокамера.

**Апробация методики полуколичественного денситометрического определения ряда наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ на образцах мочи**

Для изолирования морфина, кодеина, фенобарбитала, барбитала, барбамила, эфедрина, верапамила, доксиламина, амитриптилина, димедрола из мочи была выбрана методика пробоподготовки, используемая в практике судебно-химического отделения Ульяновского областного бюро судебно-медицинской экспертизы (изолирование подкисленной водой). Экстрагирование анализов из модельных образцов мочи осуществляли



хлороформом при рН 9-11; барбитураты диэтиловым эфиром при рН 2; опиаты смесью хлороформ – изопропанол 9:1 при рН 8-9. Модельные образцы баклофена экстрагировали при различном значении рН от 2 до 9 и двумя комбинациями органических растворителей – хлороформом и смесью хлороформ – н-бутанол (6:4); максимальный выход баклофена составил – 79%, при экстракции смесью хлороформ – н-бутанол при рН 4.

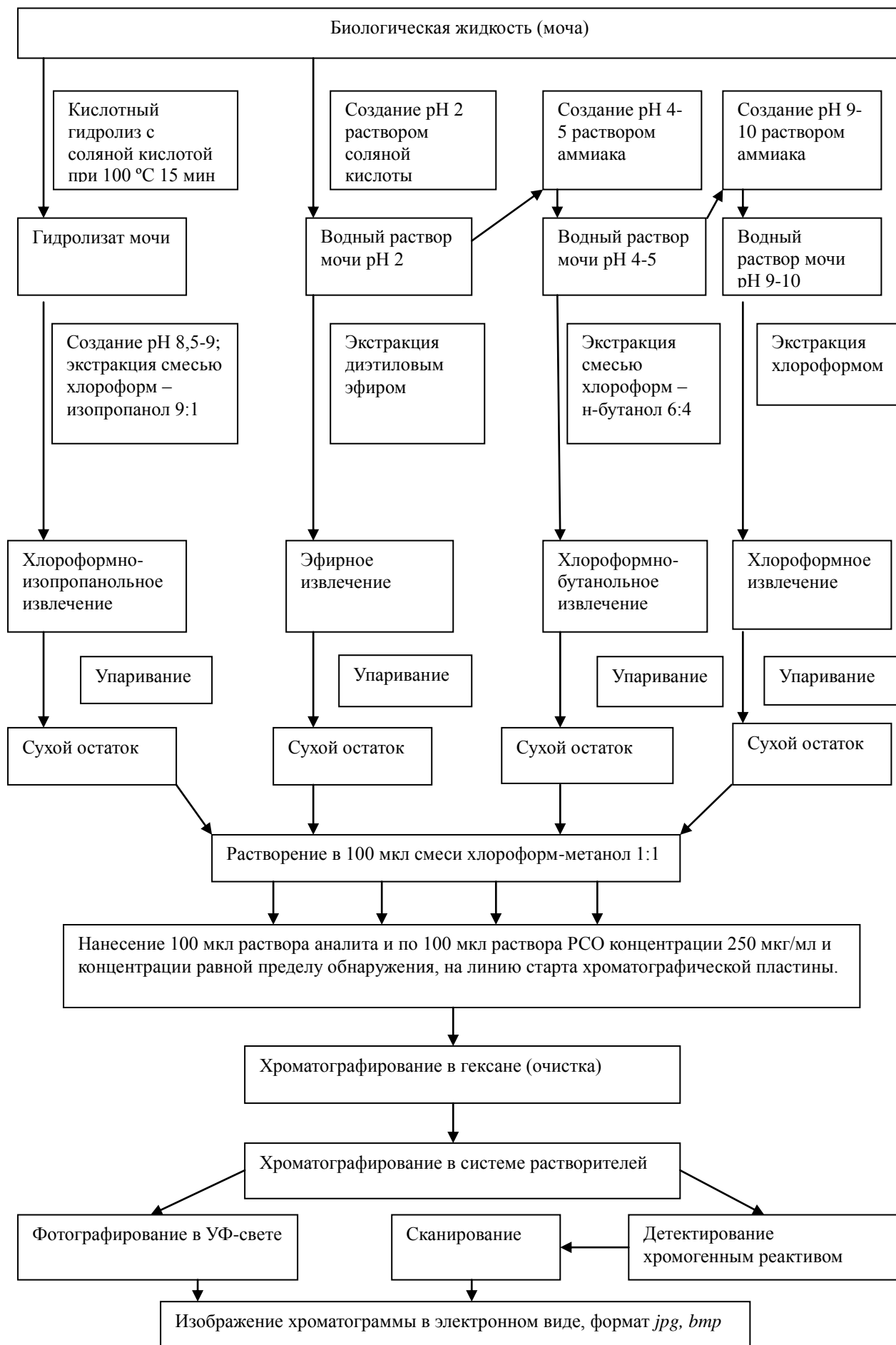
Экстракт выпаривали до сухого остатка в токе воздуха при комнатной температуре. Водный раствор отбрасывали. Сухие остатки растворяли в 100 мкл хлороформа. 100 мкл полученного раствора наносили на линию старта хроматографической пластины, затем хроматографировали и денситометрировали.

При исследовании модельных растворов мочи удалось достигнуть пределов обнаружения: около 10 мкг/мл для баклофена; около 30,0 мкг/мл для эфедрина, доксиламина; около 50,0 мкг/мл для верапамила и amitriptилина; около 70 мкг/мл для димедрола, фенобарбитала, барбитала, барбамила; около 80 мкг/мл для морфина и кодеина 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 четко детектируемым почти незаметное для человеческого глаза «пятно» анализируемого вещества. Повышение пределов обнаружения в модельных растворах мочи обусловлено потерями при пробоподготовке, а также присутствием соэкстрактивных веществ в пробе, что создает дополнительный фон на пластинке.

Этапы пробоподготовки мочи и ТСХ – анализа представлены на схеме 1.

Этапы денситометрического анализа представлены на схеме 2.

Схема пробоподготовки мочи и ТСХ-анализа анализируемых веществ



## Схема (2) денситометрического анализа анализируемых веществ



На основании проведенных исследований разработан проект методических указаний «Денситометрическое определение ряда наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ в химико-токсикологическом анализе» для практических химиков-экспертов судебно-химических отделений Бюро судебно-медицинской экспертизы.

**Экономическая оценка эффективности внедрения в практику химико-токсикологического анализа методики полуколичественного денситометрического определения ряда наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ**

Для проведения экономической оценки эффективности внедрения методики сравнивали следующие показатели: количество ложноположительных, ложноотрицательных результатов, а также стоимость одного анализа и количество затрачиваемого времени на проведения анализа между методом ТСХ с визуальным детектированием и методом ТСХ с применением денситометрии, а также иммунохроматографическим методом анализа. Для оценки проанализировали 50 образцов мочи от трупов. Перед началом исследования моча была проверена на отсутствие анализируемых веществ методом ТСХ и ГЖХ-ТИД. Затем в мочу добавляли рассчитанное количество вещества, создавая концентрацию аналита в моче равную пределу обнаружения. Для ИХА использовали экспресс - тесты фирмы «Фактор-Мед». Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5

**Сравнение иммунохроматографического метода, метода ТСХ и ТСХ с применением денситометрии при анализе мочи на этапе скрининга**

Анализируемое вещество	Процент ложноположительных результатов, %			Процент ложноотрицательных результатов, %			Стоимость одного анализа, руб			Время, мин		
	ТСХ	ТСХД	ИХА	ТСХ	ТСХД	ИХА	ТСХ	ТСХД	ИХА	ТСХ	ТСХД	ИХА
Морфин	2	2	6	8	4	2	100	100	170	80	90	5
Кодеин	2	2	6	8	4	2	100	100	170	80	90	5
Фенobarбитал	3	2	7	6	4	4	85	85	110	65	75	5
Барбитал	3	2	7	6	4	4	85	85	100	65	75	5
Барбамил	3	2	7	6	4	4	85	85	110	65	75	5
Эфедрин	2	2	4	10	6	6	110	110	170	65	75	5

Верапамил	4	2	---	4	2	---	100	100	---	65	75	---
Амитриптилин	6	4	---	4	2	---	100	100	---	65	75	---
Доксиламин	4	2	---	4	2	---	100	100	---	65	75	---
Димедрол	6	4	---	6	4	---	100	100	---	65	75	---
Баклофен	8	4	---	8	4	---	110	110	---	65	75	---

Количество ложноположительных результатов в методе ИХА превышает их количество методом ТСХ по причине невысокого качества ИХА тестов вышеуказанного производителя. Количество ложноотрицательных результатов при определении методом ИХА меньше, чем при определении методом ТСХ (за счет более высокой чувствительности метода). Однако, в методе ТСХ с применением денситометрии количество ложноотрицательных результатов меньше, чем в методе ТСХ с визуальным детектированием за счет применения растровых манипуляций. ТСХ с применением денситометрии и визуальным детектированием имеет одинаковую стоимость, а метод ИХА значительно дороже, но выигрывает во времени. Полуколичественный результат в виде концентрации вещества, полученный методом ТСХ с применением денситометрии, позволяет корректировать объем навески биожидкости, исследуемой подтверждающим методом анализа (ГХ-МС, ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС). Это снижает нагрузку на хроматографическую колонку, масс-селективный детектор, и тем самым снижает размер экономических затрат по ремонту и обслуживанию оборудования.

## **ВЫВОДЫ**

1. Определены аналитические характеристики: значения  $R_f$ , величины интенсивности окраски и флуоресценции, пределы обнаружения, ряда токсикантов (фенобарбитала, барбитала, барбамила, морфина, кодеина, эфедрина, верапамила, доксиламина, амитриптилина, димедрола, баклофена) методом ТСХ с применением программы для денситометрии «ТСХ-менеджер».
2. Установлено снижение пределов обнаружения исследуемых веществ по сравнению с методом ТСХ с визуальной регистрацией аналитического сигнала за счет программных растровых манипуляций.

3. Показано, что при сканировании хроматографических пластин основные аналитические характеристики методики: чувствительность, правильность, относительное среднее отклонение, дисперсия имеют лучшие показатели, чем при фотографировании пластин.
4. Установлен характер линейной градуировочной зависимости  $y = kx + b$  и полиномиальной градуировочной зависимости  $y = kx^2 + bx - a$  для полуколичественного денситометрического определения исследуемых наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ
5. Определены метрологические характеристики методик полуколичественного денситометрического определения морфина, кодеина, фенobarбитала, барбитала, барбитала, эфедрина, верапамила, доксиламина, амитриптилина, димедрола, баклофена: чувствительность, правильность, относительное среднее отклонение, дисперсия.
6. Методика полуколичественного денситометрического определения некоторых наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ апробирована на модельных образцах мочи, установлены пределы обнаружения исследуемых веществ.
7. Проведена экономическая оценка эффективности внедрения в практику химико-токсикологического анализа предложенных методик денситометрического определения ряда наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ. Показана экономия ресурса аналитического оборудования, используемого для подтверждающего метода исследования.
8. Разработан проект методических указаний «Денситометрическое определение ряда наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ в химико-токсикологическом анализе» для практических химиков-экспертов судебно-химических отделений Бюро судебно-медицинской экспертизы.

#### **Список работ, опубликованных по теме диссертации:**

1. Кормишин, В.А. Денситометрический анализ барбитуратов в судебно-химической экспертизе // В.А. Кормишин // **Аспирантский вестник Поволжья.** – 2012. - № 2. – С. 113-116.
2. Кормишин, В.А. Денситометрическое определение эфедрина в судебно-химической практике // В.А. Кормишин, А.В. Воронин, И.Ф. Шаталаев // **Известия Самарского научного центра Российской академии наук.** –

2012. - Т. 14. - №5(3). - С. 723-726.

3. Кормишин, В.А. Денситометрический анализ эфедрина и верапамила в судебно-химической экспертизе. // В.А. Кормишин, А.В. Воронин, И.Ф. Шаталаев // **Вестник СамГУ-Естественнонаучная серия.** – 2013. - № 6 (107). – С. 167-174.
4. Кормишин, В.А. Денситометрическое определения ряда наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ в химико-токсикологическом анализе // В.А. Кормишин, А.В. Воронин, И.Ф. Шаталаев // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.** – 2013. - № 8. - С. 11-16.
5. Воронин, А.В. Денситометрическое определение морфина в судебно-химическом анализе // А.В. Воронин, И.Ф. Шаталаев, В.А. Кормишин // Современная фармацевтическая наука и практика: традиции, инновации, приоритеты: сборник Всероссийской научно-практической конференции, посвящённой 40-летию фармацевтического факультета СамГМУ. – Самара, 2011. – с. 67-68.
6. Кормишин, В.А. Денситометрический анализ фенобарбитала в судебно-химической экспертизе // В.А. Кормишин, А.В. Воронин, И.Ф. Шаталаев // Теория и практика современной науки: материалы IV Международной научно-практической конференции. – Москва, 2011. - С. 664-667.
7. Кормишин, В.А. Денситометрическое определение фенобарбитала в химико-токсикологическом анализе // В.А. Кормишин, А.В. Воронин, И.Ф. Шаталаев // Современные проблемы гуманитарных и естественных наук: материалы IX Международной научно-практической конференции. – Москва, 2011. - С. 477-479.
8. Кормишин, В.А. Денситометрический анализ барбитала в судебно-химической экспертизе // В.А. Кормишин, А.В. Воронин, И.Ф. Шаталаев // Интеграция науки и практики как механизм эффективного развития современного общества: материалы II Международной научно-практической конференции. – Москва, 2011. - С. 241-244.
9. Кормишин, В.А. Денситометрический анализ барбамила в судебно-химической экспертизе // В.А. Кормишин, А.В. Воронин, И.Ф. Шаталаев // Теоретические и практические аспекты развития современной науки: материалы II Международной научно-практической конференции. – Москва, 2011. - С. 325-328.

- 10.Кормишин, В.А. Денситометрический анализ эфедрина в судебно-химической экспертизе // В.А. Кормишин, А.В. Воронин, И.Ф. Шаталаев // Научные итоги 2011 года: достижения, проекты, гипотезы: материалы I Международной научно-практической конференции. – Новосибирск, 2011. - С. 34-37.
- 11.Кормишин, В.А. Денситометрическое определение эфедрина в химико-токсикологическом анализе // В.А. Кормишин, А.В. Воронин, И.Ф. Шаталаев // Наука и современность – 2011: материалы XIV Международной научно-практической конференции. – Новосибирск, 2011. - С. 207-210.
- 12.Кормишин, В.А. Денситометрический анализ верапамила в судебно-химической экспертизе // В.А. Кормишин, А.В. Воронин, И.Ф. Шаталаев // Вопросы науки и техники: материалы международной заочной научно-практической конференции. – Новосибирск, 2012. - С. 31-35.
- 13.Кормишин, В.А. Денситометрический анализ баклофена в судебно-химической экспертизе // В.А. Кормишин // Молодые ученые – медицине: материалы докладов Всероссийской конференции с международным участием. - Самара, 2012. - с. 213-216.
14. Кормишин, В.А. Денситометрический анализ димедрола в судебно-химической экспертизе // В.А. Кормишин // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии. – 2012. – № 9. – С. 138-140.
15. Кормишин, В.А. Денситометрическое определение барбитуратов в химико-токсикологическом анализе // В.А. Кормишин, А.В. Воронин, И.Ф. Шаталаев // Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы: материалы X Международной конференции. – Минск, 2012. - С. 398-401.
16. Кормишин, В.А. Денситометрический анализ барбитуратов в химико-токсикологической практике // В.А. Кормишин, А.В. Воронин, И.Ф. Шаталаев // Актуальные вопросы создания новых лекарственных средств: материалы Всеукраинской научно-практической конференции студентов и молодых ученых. - Харьков, 2012. - С. 146.
- 17.Кормишин, В.А. Денситометрическое определение барбитуратов в химико-токсикологическом анализе // В.А. Кормишин, А.В. Воронин, И.Ф. Шаталаев // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сборник научных трудов 68-ой научно-практической конференции. - Волгоград, 2013. - С. 251-252.