

Е. А. Мамина, В. В. Болотов, В. С. Бондарь

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АЗОКРАСИТЕЛЯ НА ОСНОВЕ ТЕОФИЛЛИДИНА ДЛЯ ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДИМЕДРОЛА, ПРОМЕДОЛА, ФЕНТАНИЛА И ЦИКЛОДОЛА

Национальная фармацевтическая академия Украины (НФАУ), Харьков

Димедрол (I), промедол (II), фентанил (III) и циклодол (IV) — наркотические и одурманивающие препараты, для которых разработка новых методик химико-токсикологических и судебно-химических исследований, а также усовершенствование уже существующих методов их анализа являются актуальными проблемами [1 – 5].

Среди методов исследования “лекарственных” ядов в биологических объектах в настоящее время широко используется метод экстракционной фотометрии, характеризующийся чувствительностью, точностью, быстротой и простотой в выполнении, а также обеспечивающий частичную очистку вытяжек от биогенных примесей [6].

I – IV — препараты основного характера, в водных растворах образуют положительно заряженные ионы, которые активно взаимодействуют с отрицательно заряженными ионами различных кислотных индикаторов при оптимальных значениях pH среды с образованием ионных ассоциатов. В литературе представлены данные по использованию универсальных кислотных индикаторов (бромтимоловый синий, бромфеноловый синий, метиловый оранжевый) при проведении исследований анализируемых препаратов в фармацевтическом и химико-токсикологическом анализе [6 – 8]. Поэтому синтез индикаторов, характеризующихся селективными свойствами при образовании ионных ассоциатов с препаратами основного характера и применение их в анализе биологических объектов является актуальным направлением современных исследований.

Целью настоящей работы является разработка экстракционно-фотометрического определения веществ с использованием азокрасителя на основе теофиллидина в качестве селективного кислотного индикатора и применение разработанной методики при скрининге наркотических и одурманивающих веществ в биологических жидкостях (моче).

Азокраситель на основе теофиллидина (4-метиламино-5-N-метилкарбамоил-имидазол-2-азо-4'-бензолсульфокислота) синтезирован на кафедре токсикологической химии НФАУ и характеризуется селективностью, высокой чувствительностью к некоторым “лекарственным” ядам или группам ядов, а также низкой чувствительностью к биогенным примесям [9 – 11].

### Экспериментальная часть

В результате исследований были выбраны оптимальные условия образования ионных ассоциатов I – IV с азокрасителем.

Процесс образования и степень экстракции ионных ассоциатов зависят от природы препарата, растворителя и индикатора, а также от pH среды, что выражается в величине оптической плотности окрашенных растворов.

Установлено, что при использовании 0,1 % водного раствора азокрасителя на основе теофиллидина и универсальной буферной смеси Бриттона — Робинсона с оптимальным значением pH 3,0 в слой хлороформа переходило максимальное количество ионных ассоциатов, что выражалось в интенсивности окрашивания органического слоя в оранжевый цвет. Величина pH буферной смеси контролировалась с помощью pH-метра № 3123 (Польша).

Для повышения чувствительности метода образованные ионные ассоциаты разрушали и переводили индикатор в водный слой в виде устойчивого комплекса с ионами меди при использовании 0,1 % раствора  $\text{CuSO}_4$  в ацетатном буфере pH 6,0, при этом водный слой окрашивался в сиреневый цвет. Значения оптической плотности водных растворов после разрушения ионных ассоциатов были выше, чем значения оптической плотности хлороформных растворов с той же концентрацией веществ.

В процессе разработки наиболее эффективных условий определения веществ были выбраны оптимальные объемы растворов азокрасителя и буферной смеси, а также хлороформа. Установлено, что ионные ассоциаты исследуемых препаратов полностью экстрагируются в процессе одноразовой экстракции 15 мл хлороформа.

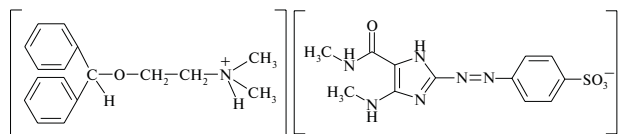
Разработанные оптимальные условия образования ионных ассоциатов препаратов с азокрасителем, а также условия фотометрирования окрашенных растворов были использованы для проведения количественного анализа препаратов в исследуемых растворах.

**Методика экстракционно-фотометрического определения препаратов с азокрасителем на основе теофиллидина.** В делительные воронки вносили по: 3,5 мл универсальной буферной смеси Бриттона — Робинсона (pH 3); 1 мл стандартных растворов препаратов, содержащих в 1 мл 200 мкг препарата; 2,5 мл 0,1 % раствора азокрасителя и 15 мл хлороформа. Делительные воронки встряхивали на механическом встряхивателе в течение 5 мин и оставляли на 5 мин для разделения фаз.

Первые порции органической фазы (около 1 мл) отбрасывали и остальные 14 мл окрашенного в оранжевый цвет органического слоя собирали в делительные воронки с 10 мл 0,1 % раствора  $\text{CuSO}_4$  в ацетатном буфере pH 6,0.

Делительные воронки встряхивали 1 – 2 мин, отстаивали 5 мин и отделяли сиреневый водный слой, который фотометрировали на фотоэлектроколориметре КФК-2 при толщине кюветы 20 мм, светофильтре с  $\lambda_{\text{max}}$  540 ± 10 нм; в качестве раствора сравнения использовали раствор, полученный по аналогичной методике с 1 мл дистиллированной воды.

Стехиометрическое соотношение реагирующих компонентов — препаратов (димедрола, промедола, фентанила и циклодола) и азокрасителя было установлено по методу изомолярных серий и составляло 1:1 (например, ионный ассоциат димедрола и азокрасителя):



### Результаты и их обсуждение

Расчет содержания препаратов в исследуемых растворах проводили с помощью калибровочных графиков, для построения которых по представленной выше методике экстракционно-фотометрического анализа в делительные воронки вносили по 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 и 1,0 мл стандартных растворов препаратов (в 1 мл 200 мкг препарата), объем до 1 мл доводили дистиллированной водой. Интервал линейности калибровочных графиков (мкг/мл), нижний предел определения препаратов (мкг/мл), а также коэффициенты калибровочных графиков, рассчитанные по методу наименьших квадратов (1), приведены в табл. 1:

$$D = a + bC, \quad (1)$$

где  $D$  — оптическая плотность окрашенных растворов;  $C$  — концентрация растворов препаратов, мкг/мл исходного раствора.

Подтверждение надежности, достоверности и воспроизводимости методики было проведено при определении содержания препаратов в модельных растворах с заданной концентрацией веществ в 1 мл — от 15 до 150 мкг.

Результаты экстракционно-фотометрического определения препаратов представлены в табл. 2, согласно которой относительные ошибки измерений составляли не более ± 2,5 %, что указывает на возможность использования разработанной методики для количественного анализа препаратов в биологических объектах.

Одним из направлений использования разработанной методики экстракционно-фотометрического анализа наркотических и одурманивающих веществ является применение способности препаратов к образованию ионных ассоциатов при скрининге “лекарственных” ядов в биологических объектах.

В качестве объектов исследования были выбраны наркотические и одурманивающие препараты (синтетические и природного происхождения) — кокаина

гидрохлорид, клофелин, кодеина фосфат, кофеин, морфина гидрохлорид, а также I – IV.

При проведении скрининга использовались стандартные условия экстракционно-фотометрического анализа азотсодержащих препаратов с универсальным (метиловым оранжевым) и селективным (азокрасителем на основе теofilлидина) кислотными индикаторами [11].

**Методика экстракционно-фотометрического определения препаратов с метиловым оранжевым [8].** В делительные воронки вносили по: 5 мл ацетатного буферного раствора (рН 4,6); 1 мл стандартных растворов препаратов, содержащих в 1 мл 200 мкг препарата; 5 мл 0,1% раствора метилового оранжевого и 15 мл хлороформа. Делительные воронки встряхивали на механическом встряхивателе в течение 5 мин и оставляли на 5 мин для разделения фаз.

Первые порции органической фазы (около 1 мл) отбрасывали, а к остальным 14 мл окрашенного в желтый цвет органического слоя, собранным в мерный цилиндр, добавляли 2 мл 1 % раствора концентрированной серной кислоты в абсолютном этиловом спирте. Хлороформные растворы, окрашенные в краснофиолетовый цвет, фотометрировали на фотоэлектроколориметре КФК-2 при толщине кюветы 20 мм, светофильтре с  $\lambda_{\text{max}}$  540 ± 10 нм; в качестве раствора сравнения использовали раствор, полученный по аналогичной методике с 1 мл дистиллированной воды.

В соответствии с законом Бугера – Ламберта – Бера зависимость оптической плотности растворов  $D_1$  и  $D_2$  (полученных для одного и того же препарата по двум стандартным методикам) от концентрации  $C$  (одинаковой для указанных исследований) можно было бы представить следующими уравнениями (2) и (3):

$$D_1 = E_1 \cdot C \quad (2)$$

$$D_2 = E_2 \cdot C, \quad (3)$$

где  $D_1$  и  $D_2$  — оптическая плотность окрашенных растворов, полученных по стандартным методикам экстракционно-фотометрического анализа с метиловым оранжевым (2) и азокрасителем на основе теofilлидина (3);  $E_1$  и  $E_2$  — удельные коэффициенты светопоглощения растворов;  $C$  — концентрация исследуемого раствора препарата, мкг/мл.

Соотношение представленных величин имело следующий вид (4):

$$D_1/D_2 = E_1/E_2 = K \quad (4),$$

где  $K$  — это величина постоянная, так как получена при выполнении эксперимента по двум стандартным методикам с одинаковой концентрацией исследуемого препарата.

В результате эксперимента из исследуемой группы наркотических и одурманивающих препаратов значение постоянной  $K$  было определено для I (3,98 ± 0,31), II (1,93 ± 0,11), III (4,08 ± 0,23) и IV (2,58 ± 0,52), кото-

Схема скрининга биологического объекта на наркотические и одурманивающие препараты основного характера



рые образовывали ионные ассоциаты как с метиловым оранжевым, так и с азокрасителем.

Кокаина гидрохлорид, клофелин, кодеина фосфат характеризовались высокой чувствительностью к метиловому оранжевому и низкой — к азокрасителю.

Кофеин и морфина гидрохлорид не образовывали ионных ассоциатов с используемыми индикаторами.

Для апробирования полученных результатов при проведении исследования биологических жидкостей использовали мочу, как наиболее информативный объект.

**Экстракцию веществ из мочи проводили по следующей методике:** пробу мочи (20 мл), содержащую

Таблица 1  
Характеристики калибровочных графиков экстракционно-фотометрического определения препаратов с азокрасителем на основе теофиллидина

Препарат	Коэффициенты калибровочных графиков		Интервал линейности графиков, мкг/мл	Нижняя граница определения препаратов, мкг/мл
	<i>a</i>	<i>b</i>		
Димедрол (I)	-0,018	0,007	14 – 150	14
Промедол (II)	-0,006	0,008	11 – 135	11
Фентанил (III)	-0,020	0,011	8 – 90	8
Циклодол (IV)	-0,002	0,007	13 – 130	13

по 500 мкг препаратов, подщелачивали 25 % раствором аммиака до pH 9–10 и подвергали экстракции хлороформом дважды по 15 мл. Объединенные вытяжки фильтровали через безводный натрия сульфат и упаривали. Остаток промывали гексаном (трижды по 10 мл) для удаления соэкстрактивных веществ, который отбрасывали, а высушенный остаток растворяли в 10 мл хлороформа.

1 мл хлороформной вытяжки использовали для получения ионных ассоциатов с метиловым оранжевым, как с более чувствительным индикатором по сравнению с азокрасителем, производным теофиллидина. При получении значений оптической плотности растворов, отличающихся от 0,5, проводили увеличение или уменьшение объемов хлороформной вытяжки, используемых для анализа, и вновь повторяли процесс образования ионных ассоциатов с метиловым оранжевым. После этого с таким же объемом хлороформной вытяжки проводили экстракцию ионных ассоциатов с использованием азокрасителя, производного теофиллидина с последующим расчетом постоянной величины *K*.

Таким образом, полученные результаты позволяют предложить схему скрининга биологического объекта

Таблица 2  
Экстракционно-фотометрическое определение “лекарственных” ядов с азокрасителем в модельных растворах (*n* = 7, *P* = 95 %)

Препарат	Взято препарата, мкг/мл	Оптическая плотность	Найдено препарата		Метрологические характеристики
			мкг	%	
Димедрол (I)	15	0,10	15,3	101,8	$\bar{x} = 100,0$ $S^2 = 4,46$ $S = 2,11$ $S_x = 0,81$ $\Delta x = 1,99$ $\varepsilon = \pm 1,99\%$ $\bar{x} \pm \Delta x = 100,0 \pm 1,99\%$
	30	0,19	30,3	101,0	
	50	0,32	48,5	96,9	
	70	0,48	71,1	101,5	
	90	0,60	88,6	98,4	
	120	0,81	117,8	98,2	
Промедол (II)	15	0,11	14,4	96,3	$\bar{x} = 99,8$ $S^2 = 6,20$ $S = 2,49$ $S_x = 0,96$ $\Delta x = 2,34$ $\varepsilon = \pm 2,35\%$ $\bar{x} \pm \Delta x = 99,8 \pm 2,34\%$
	25	0,20	25,6	102,5	
	45	0,35	45,1	100,2	
	55	0,43	54,0	98,1	
	75	0,61	77,3	103,0	
	95	0,74	93,0	97,9	
Фентанил (III)	10	0,10	10,0	100,3	$\bar{x} = 99,5$ $S^2 = 5,64$ $S = 2,38$ $S_x = 0,89$ $\Delta x = 2,20$ $\varepsilon = \pm 2,21\%$ $\bar{x} \pm \Delta x = 99,5 \pm 2,21\%$
	20	0,20	19,9	99,8	
	30	0,30	29,3	97,7	
	40	0,43	41,3	103,2	
	60	0,65	60,5	100,9	
	70	0,73	68,6	98,0	
Циклодол (IV)	15	0,10	14,7	98,3	$\bar{x} = 100,3$ $S^2 = 6,09$ $S = 2,47$ $S_x = 0,93$ $\Delta x = 2,28$ $\varepsilon = \pm 2,27\%$ $\bar{x} \pm \Delta x = 100,3 \pm 2,27\%$
	25	0,17	24,9	99,6	
	45	0,32	46,2	102,7	
	65	0,47	67,2	103,4	
	85	0,61	87,0	102,4	
	105	0,72	103,1	98,2	
125	0,85	121,9	97,5		

на токсические лекарственные вещества основного характера, которая складывается из двух этапов:

1 этап заключается в образовании ионных ассоциатов с метиловым оранжевым, что позволяет выделить две группы препаратов — образующих и не образующих ионные ассоциаты.

2 этап заключается в образовании ионных ассоциатов с азокрасителем, производным теофиллидина, что позволяет разделить группу препаратов, образующих ионные ассоциаты с метиловым оранжевым на две подгруппы препаратов — образующих и не образующих ионные ассоциаты с азокрасителем. Для препаратов, образующих ионные ассоциаты, при их обнаружении проводится расчет постоянной величины  $K$  и сверяется с табличными показателями.

Для идентификации индивидуального препарата первой группы ядов и подтверждения полученных результатов при анализе второй группы ядов можно использовать химические (реакции окрашивания и осаждения) или физико-химические (тонкослойная хроматография, УФ-спектры) методы анализа.

Разработанные методики скрининга наркотических и одурманивающих веществ и их количественного

анализа при исследовании биологических объектов можно рекомендовать для практики судебных химиков и химиков-токсикологов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. В. В. Болотов, А. А. Джуманазаров, А. О. Онов, *Вісник фармації*, **3 – 4**, 75 – 77 (1994).
2. В. В. Болотов, О. О. Онов, Н. Ф. Шахмамедов, *Вісник фармації*, **1 – 2**, 137 – 139 (1993).
3. В. В. Болотов, С. В. Баюрка, О. О. Маміна і інш., *Вісник фармації*, **1 – 2**, 71 – 74 (1993).
4. Т. В. Герасимчук, А. О. Медведовський, Л. Г. Горюшко і інш., *Фарм. журн.*, **2**, 42 – 45 (1993).
5. А. И. Жебентяев, А. П. Арзамасцев, *Фармация*, **5**, 63 – 71 (1993).
6. С. К. Еремін, Б. Н. Изотов, Н. В. Веселовская, *Анализ наркотических средств*, Мысль, Москва (1993).
7. Б. Н. Изотов, *Химико-токсикологический анализ веществ, вызывающих одурманивание*, Москва (1989).
8. О. О. Маміна, *Вісник фармації*, **1**, 20 – 24 (2001).
9. Е. М. Саломатин, Э. Г. Николаева, *Суд.-мед. эксперт*, **3**, 21 – 22 (1999).
10. В. А. Усенко, Ю. А. Стадник, *Провизор*, **8**, 8 – 12 (2001).
11. E. J. C. Clarke, *Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material*, The Pharm. Press, London (1986).

Поступила 19.03.02