

УДК 543.631:615

ИССЛЕДОВАНИЯ СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КОДЕИНА ДЛЯ ЕГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ МЕТОДАМИ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ И СПЕКТРОМЕТРИИ ДИФFUЗНОГО ОТРАЖЕНИЯ

¹Немихин В.В., ²Качин С.В., ^{1,3}Кутяков В.А., ²Сагалаков С.А.¹КГБУЗ «Красноярское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы», Красноярск;²ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», Красноярск, e-mail: kachin.s@yandex.ru;³Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск

Представлен обзор результатов исследований спектроскопических свойств кодеина в растворах и твердой фазе, а также разработанных методик его определения в лекарственных препаратах и биологических объектах методами люминесценции и спектрометрии диффузного отражения. Свечение кодеина зафиксировано в водных растворах 0,05 М H₂SO₄ при длинах волн возбуждения ($\lambda_{\text{возб}}$) и люминесценции ($\lambda_{\text{люм}}$) 300 и 345 нм соответственно. В данных условиях возможно определение микрограммовых содержаний кодеина по его собственной люминесценции с пределом обнаружения 3 мг/дм³. В водных растворах при pH = 6–8 кодеин образует ионный ассоциат с эозином, который экстрагируется толуолом и интенсивно флуоресцирует при $\lambda_{\text{возб}} = 520$ нм; $\lambda_{\text{люм}} = 550$ нм. По флуоресценции экстракта ионного ассоциата возможно определение наногаммовых содержаний кодеина с пределом обнаружения 0,4 мкг/дм³. В твердой фазе кодеин образует окрашенный ионный ассоциат с реактивом Драгендорфа с максимальным значением коэффициента диффузного отражения при $\lambda = 520$ нм. Это дает возможность определять кодеин на поверхности сорбентов с пределом обнаружения 9 мг/дм³. Рассмотрены схемы пробоподготовки исследуемых объектов. В пробоподготовке лекарственных препаратов и внутренних органов человека (печень, стенка желудка) использован метод тонкослойной хроматографии. В пробоподготовке мочи человека использована процедура экстракции. Приводятся характеристики методик определения кодеина. Методики определения кодеина в лекарственных препаратах (40–1200 мг/дм³), во внутренних органах человека (0,01–0,75 мг/г) по его собственной люминесценции с предварительным ТСХ-разделением компонентов, элюированием зоны кодеина в раствор и последующим измерением интенсивности свечения. Методика определения (50–1200 мг/дм³) кодеина в лекарственных препаратах с предварительным ТСХ-разделением компонентов, получением ионного ассоциата кодеина с реактивом Драгендорфа и последующим измерением его коэффициента диффузного отражения. Методика определения (30–320 мкг/дм³) кодеина в моче человека с предварительной экстракцией и последующим измерением интенсивности флуоресценции экстракта ионного ассоциата кодеина с эозином.

Ключевые слова: кодеин, определение, люминесценция, спектрометрия диффузного отражения

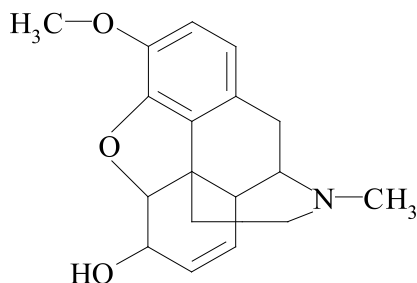
STUDIES OF THE SPECTROSCOPIC PROPERTIES OF CODEINE FOR ITS DETERMINATION IN DRUGS AND BIOLOGICAL OBJECTS BY METHODS OF LUMINESCENCE AND DIFFUSE REFLECTION

¹Nemikhin V.V., ²Kachin S.V., ^{1,3}Kutyakov V.A., ²Sagalakov S.A.¹Krasnoyarsk Regional Bureau of Forensic Medical Examination, Krasnoyarsk;²Siberian Federal University, Krasnoyarsk, e-mail: kachin.s@yandex.ru;³Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk

An overview of the results of studies of the spectroscopic properties of codeine in solutions and solid phase, as well as developed methods for its determination in drugs and biological objects by luminescence and diffuse reflection spectrometry was presented. Codeine luminescence was recorded in aqueous solutions of 0.05 M H₂SO₄ at excitation wavelengths (λ_{exc}) and luminescence wavelengths (λ_{lum}) of 300 and 345 nm, respectively. Under these conditions, it is possible to determine the microgram quantities of codeine by its own luminescence with a detection limit of 3 mg/dm³. In aqueous solutions at pH = 6–8 codeine forms an ionic associate with eosin, which is extracted by toluene and fluoresces intensely at $\lambda_{\text{exc}} = 520$ nm; $\lambda_{\text{lum}} = 550$ nm. The fluorescence of the ion-associate extract can be used to determine the nanogram quantities of codeine with a detection limit of 0.4 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$. In the solid phase, codeine forms a colored ionic associate with the Dragendorf reagent with a maximum diffuse reflection coefficient at $\lambda = 520$ nm. This makes it possible to determine the codeine on the surface of sorbents with a detection limit of 9 mg/dm³. The schemes of sample preparation of the studied objects were considered. The method of thin-layer chromatography was used in the sample preparation of drugs and human internal organs (liver, stomach wall). In the sample preparation of human urine, an extraction procedure was used. The characteristics of codeine determination procedures were given. The procedures for determining of codeine in drugs (40–1200 mg/dm³), in the internal organs of human (0.01–0.75 mg/g) by its own luminescence with preliminary TLC-separation of components, elution of the codeine zone into solution and subsequent measurement of luminescence intensity. The procedure of determination (50–1200 mg/dm³) of codeine in drugs with preliminary TLC-separation of components, obtaining an ion associate of codeine with Dragendorf reagent and subsequent measurement of its diffuse reflection coefficient. The procedure of determination (30–320 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$) of codeine in human urine with preliminary extraction and subsequent measurement of fluorescence intensity of codeine ion associate extract with eosin.

Keywords: codeine, determination, luminescence, diffuse reflection spectrometry

Кодеин – 3-метилморфин, алкалоид опия (рисунок), обладает умеренной анальгетической активностью, в связи с чем препараты на его основе используются при лечении болевого синдрома в сочетании с ненаркотическими анальгетиками, а также для успокоения кашля [1, 2].



Структурная формула кодеина

Однако при длительном использовании кодеин может вызывать физическую зависимость, поэтому отпуск соответствующих кодеинсодержащих препаратов в аптечной сети и контроль их качества регламентируются [3, 4].

В основном кодеин определяют при проверке подлинности лекарственных препаратов, дифференцировании приема лекарственного средства кодеина от немедикаментозного употребления опиатов, а также в процессе соответствующих судебно-химических исследований при подозрении отравления препаратами опиоидной группы. С этой целью, как правило, используются хроматографические методы с различными типами детекторов [5]. К их недостаткам следует отнести применение сложного, дорогостоящего оборудования и в ряде случаев необходимость получения дериватов кодеина при его определении в биологических объектах [6].

Методы молекулярной спектрометрии, в частности люминесценции и спектрометрии диффузного отражения, характеризующиеся относительно высокой чувствительностью, экспрессностью и простотой аппаратного оформления, существенно расширяют возможности определения кодеина в различных объектах [7]. Однако до настоящего времени они практически не использовались в связи с отсутствием соответствующих исследований.

Цель исследования: сравнительный научный обзор работ с результатами исследований спектроскопических свойств кодеина в жидкой и твердой фазах, способов пробоподготовки, а также методиками его определения в лекарственных препаратах и биологических объектах методами лю-

минесценции и спектрометрии диффузного отражения.

Результаты исследования и их обсуждение

Люминесценция кодеина в водных растворах. Молекула кодеина содержит гетероатом азота с неподеленной парой электронов (рисунок). В спектре поглощения присутствует полоса $n \rightarrow \pi^*$ электронного перехода $^c \lambda_{\text{макс}} = 285 \text{ нм}$ и ϵ порядка $n \cdot 10^2$ [8]. Соединения с подобными электронными структурами слабо или вовсе не флуоресцируют [7]. Активация флуоресценции в ряде случаев достигается протонизацией атома азота. В результате становятся возможными $\pi \rightarrow \pi^*$ электронные переходы, обуславливающие люминесценцию (флуоресценцию) растворов. В соответствии с молекулярной структурой кодеин является весьма сильным третичным основанием, содержащим $=\text{NCH}_3$ группу с $\text{pK}_a = 8,2$ [5]. Таким образом, в нейтральных и кислых водных растворах в результате протонизации атома азота формой нахождения кодеина является положительно заряженный ион. В работе [9] для активации свечения кодеина использован 0,05 М раствор H_2SO_4 при $\lambda_{\text{возб}}$ и $\lambda_{\text{люм}}$ 300 и 345 нм соответственно. Относительный квантовый выход люминесценции кодеина ($\phi_{\text{кв}}$) составил 0,01. В данных условиях по собственной люминесценции возможно определение микрограммовых содержаний кодеина с пределом обнаружения 3 мг/дм³.

Для повышения чувствительности люминесцентных измерений кодеина использована способность его положительно заряженного иона образовывать ионные ассоциаты с отрицательно заряженными противоионами с высокими квантовыми выходами свечения. В [10] в качестве противоиона использован эозин ($\phi_{\text{кв}} = 0,23$) – галонопроизводное флуоресцеина. В диапазоне рН 6–9 эозин находится в виде двукратно ионизированного аниона и образует флуоресцирующий ионный ассоциат с положительно заряженным ионом кодеина, который экстрагируется рядом органических растворителей. Максимальная интенсивность свечения достигается при экстракции ионного ассоциата кодеина с эозином толуолом ($\lambda_{\text{возб}} = 520 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{люм}} = 550 \text{ нм}$). По флуоресценции экстракта возможен определение нанограммовых содержаний кодеина с пределом обнаружения 0,4 мкг/дм³. Аналогичные экстракционно-фотометрические измерения с использованием ионных ассоциатов кодеина с рядом красителей также обеспечивают определения его содержания на уровне $n \text{ мг/дм}^3$ [8].

Твердофазная спектрометрия кодеина. Тонкослойная хроматография (ТСХ) – один из скрининговых методов идентификации и последующего определения кодеина [5]. После ТСХ-разделения сопутствующих компонентов хроматографическую зону кодеина проявляют различными окрашивающими реагентами, в частности реактивом Драгендорфа (тетрайодовисмутат калия $K[Vi_4]$) [8]. При этом образуется поверхностный ионный ассоциат кодеина с реактивом Драгендорфа с характерной для него оранжевой окраской. В работе [11] получен спектр диффузного отражения ионного ассоциата кодеина с реактивом Драгендорфа в координатах функции Гуревича – Кубелки – Мунка $F(R) = [(1 - R)^2/2R]$ – длина волны (нм). Найдены условия определения кодеина на поверхности ТСХ-пластинки путем измерения коэффициента диффузного отражения (R) образующегося ионного ассоциата при $\lambda = 520$ нм с пределом обнаружения 9 мг/дм^3 .

Пробоподготовка объектов исследования. В соответствии со спецификой методов люминесценции и спектрометрии диффузного отражения оптимальными являются способы пробоподготовки, адаптированные к стадии измерения аналитического сигнала.

Кодеинсодержащие лекарственные препараты представляют собой, как правило, многокомпонентные смеси веществ с различными физико-химическими свойствами. Так, кроме кодеина основными компонентами препаратов выступают парацетамол, пропифеназон, метамизол натрия, кофеин, напроксен, фенобарбитал и др. В способе пробоподготовки [12] применительно к веществам опиной группы на первой стадии экстракцией разделяют соединения кислотного и основного характера. Полученные «щелочные экстракты», содержащие кодеин, парацетамол, пропифеназон, кофеин и продукты разложения анальгина, на второй стадии подвергают ТСХ-процедуре. При этом значения R_f составляют для кодеина (0,23), парацетамола (0,71), анальгина (0,65), кофеина (0,66), пропифеназона (0,60).

Согласно действующему нормативному акту [13] в летальном случае при подозрении на отравление человека ядовитым веществом для судебно-химического исследования необходимо направлять печень и стенку желудка. Известно [8], что большинство действующих компонентов лекарств, в том числе кодеин образуют в органах человека комплексы с белками, прежде всего с альбумином. Таким образом, выделение кодеина из органов человека предполагает разрушение этих комплексов. Для этой цели чаще

всего используется метод А.А. Васильевой [14], основанный на выделении кодеина из его комплексов с белками подкисленной водой. Основным мешающим компонентом при определении кодеина в данном случае является морфин. Его влияние устраняют специально подобранной хроматографической системой растворителей (ацетон: хлороформ: 25%-ный раствор аммиака при объемном соотношении компонентов 24: 12: 1). При этом значения R_f кодеина и морфина при последующем ТСХ-разделении составляют 0,23 и 0,09 соответственно.

В большинстве методик скрининга наркотических и лекарственных веществ в биологических жидкостях человека в качестве объекта исследования используется моча. Кроме того, что имеются достаточные объемы доступных для исследования проб, в моче многие вещества, выводятся почками, могут обнаруживаться более длительное время, чем, например, в крови. Присутствующий в организме человека кодеин образует в моче конъюгаты, поэтому первичный этап пробоподготовки – гидролиз этих соединений. Для последующего выделения кодеина из гидролизатов используют процедуру экстракции [15]. В данном случае морфин также является основным мешающим компонентом. Для разделения морфина и кодеина используется свойство последнего экстрагироваться из слабощелочных водных растворов диэтиловым эфиром [8]. При этом морфин образует морфинат и остается в водной фазе.

Определения кодеина в лекарственных препаратах. В работе [10] описана методика определения кодеина в некоторых кодеинсодержащих препаратах (Пенталгин Н, Пенталгин Плюс, Седалгин Нео) с предварительным ТСХ-разделением сопутствующих компонентов по его собственной люминесценции в растворах при $\lambda = 345$ нм. В пробоподготовке исходных образцов использованы рекомендации [12]. Основные метрологические характеристики методики: линейный диапазон определяемых содержаний кодеина – $40\text{--}1200 \text{ мг/дм}^3$, предел обнаружения – 7 мг/дм^3 , S_f не превышает 0,06.

Значительный выигрыш в экспрессности измерений достигнут при определении кодеина в лекарственных препаратах методом спектроскопии диффузного отражения [11]. После ТСХ-разделения сопутствующих компонентов получают поверхностный ионный ассоциат кодеина с реактивом Драгендорфа и измеряют его коэффициент диффузного отражения при $\lambda = 520$ нм. Градуировочный график зависимости функции ΔF от концентрации кодеина линеен в диапазоне $50\text{--}1200 \text{ мг/дм}^3$.

Рассчитанный предел обнаружения составил 15 мг/дм^3 , а S_r не более 0,05.

Определения кодеина в органах человека. В работе [16] описана методика определения кодеина в биоматериале человека (печень, стенка желудка) по его собственной люминесценции в растворах. Исходные образцы предоставлены экспертами Отдела судебно-медицинской экспертизы трупов КГБУЗ «Красноярское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы» при реальном отравлении кодеинсодержащими препаратами. В качестве независимого метода исследования использован метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым детектором. Методика позволяет определять $10\text{--}750 \text{ мкг/г}$ кодеина с пределом обнаружения $\sim 3 \text{ мкг/г}$, S_r не превышает 0,07.

Определение кодеина в моче человека. Концентрации кодеина в моче человека, подтверждающие его наличие в случаях немедицинского употребления, составляют порядка $n \cdot 10^2 \text{ мкг/дм}^3$. Для его определения использовано свойство толуольного экстракта ионного ассоциата кодеина с эозином интенсивно флуоресцировать при $\lambda = 550 \text{ нм}$ [10]. Для апробации методики взяты образцы мочи потребителей опиатов. Для оценки правильности полученных результатов привлечен метод газовой хроматографии (ГХ) с масс-селективным детектором. Подтверждено определение $30\text{--}320 \text{ мкг/дм}^3$ кодеина с пределом обнаружения 6 мкг/дм^3 и S_r не более 0,06.

Заключение

Приведен научный обзор работ с результатами исследований спектроскопических свойств кодеина в жидкой и твердой фазах, способов пробоподготовки, а также методик его определения в лекарственных препаратах и биологических объектах методами люминесценции и спектрометрии диффузного отражения.

В Государственном реестре лекарственных средств кодеинсодержащие препараты отечественных и зарубежных производителей занимают весьма внушительное место [17]. Методики определения кодеина в лекарственных препаратах (в основном ВЭЖХ) хорошо отработаны и включены в известные фармакопеи [18]. Концентрационные диапазоны ВЭЖХ-определений кодеина в данных объектах составляют порядка $n \cdot 10^1 \text{--} n \cdot 10^2 \text{ мкг/дм}^3$ [19]. Однако зачастую в ВЭЖХ-методиках необходимо применение в качестве подвижных фаз токсичных растворителей: метанола и ацетонитрила. В экстракционно-фотометрических методиках определения $n \cdot \text{мг/дм}^3$ кодеина в виде

его ионных ассоциатов с рядом красителей для экстракции последних используют хлороформ [8]. В разработанных авторами [9, 11] методиках определения кодеина в лекарственных препаратах по его собственной люминесценции в растворах и диффузному отражению ионного ассоциата с реактивом Драгендорфа в твердой фазе не используются токсичные органические растворители, а селективность определений обеспечивается на стадии пробоподготовки.

При определении кодеина во внутренних органах человека также в основном используются методы ВЭЖХ и ГХ [20]. Содержания кодеина в образцах печени и стенки желудка при подтверждении диагноза отравления составляют порядка $n \cdot 10^1 \text{--} n \cdot 10^2 \text{ мкг/г}$. Соответствующие ВЭЖХ- и ГХ-методики обеспечивают определения до $n \cdot 10^{-1} \text{--} n \cdot 10^{-2} \text{ мкг/г}$ кодеина. Люминесцентная методика определения $10\text{--}750 \text{ мкг/г}$ кодеина [16] с учетом экономичности и относительной простоты инструментария в данном случае может рассматриваться в качестве дополнительной при определенных условиях.

При определении кодеина в биологических жидкостях человека (кровь, моча) в рамках серийных анализов наиболее эффективным методом является хромато-масс-спектрометрия (ГХ-МС). Достижимые содержания кодеина составляют $n \cdot 10 \text{ мкг/дм}^3$. Вместе с тем в анализе образцов с низкими содержаниями кодеина на стадии пробоподготовки часто требуются проведение реакций ацилирования или силилирования для получения соответствующих дериватов с применением весьма токсичных реагентов. В этой связи методика [10] также может представлять практический интерес, например, при проведении разовых анализов.

В целом описанные в работах [9–11, 16] методики определения кодеина в биофармабъектах методами люминесценции и спектрометрии диффузного отражения могут быть использованы при решении научных и учебных задач в НИИ, вузах, а после необходимой валидации – в контрольно-аналитических лабораториях соответствующего профиля.

Список литературы

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2014. 1216 с.
2. 20th WHO model list of essential medicines. World Health Organization, 2017. 58 p.
3. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 17 мая 2012 г. № 562н «Об утверждении Порядка отпуска физическим лицам лекарственных препаратов для медицинского применения, содержащих кроме малых количеств наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров другие фармакологические ак-

- тивные вещества» [Электронный ресурс]. URL: <http://base.garant.ru/70184474> (дата обращения 27.10.2019).
4. Постановление Правительства РФ от 30 июня 1998 г. № 681 «Об утверждении перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации» (с изменениями и дополнениями) [Электронный ресурс]. URL: <http://base.garant.ru/77663526> (дата обращения 27.10.2019).
5. Moffat A.C., Osselton M.D., Widdop B. Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. London: Pharmaceutical Press, 2011. 2473 p.
6. Vitha M.F. Chromatography: principles and instrumentation. Hoboken: Wiley, 2017. 280 p.
7. Беккер Ю. Спектроскопия. М.: Техносфера, 2009. 528 с.
8. Крамаренко В.Ф. Токсикологическая химия. Киев: Вища школа, 1989. 447 с.
9. Немихин В.В., Качин С.В., Шахворостова Т.С. Изучение спектролюминесцентных свойств кодеина с целью его определения в некоторых лекарственных препаратах // Журнал Сибирского федерального университета. Химия. 2012. Т. 5. № 3. С. 289–295.
10. Метелица С.И., Киреева Е.В., Немихин В.В., Качин С.В., Лосев В.Н., Сагалаков С.А. Экстракционно-флуориметрическое определение кодеина в моче человека // Аналитика и контроль. 2017. Т. 21. № 4. С. 315–321. DOI: 10.15826/analitika.2017.21.4.006.
11. Немихин В.В., Качин С.В., Метелица С.И., Лосев В.Н., Сагалаков С.А., Шахворостова Т.С. Определение кодеина в лекарственных препаратах методом спектроскопии диффузного отражения // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2016. Т. 82. № 2. С. 20–23.
12. Бушуев Е.С., Бабахян Р.В., Куклин В.В. Современные проблемы химико-токсикологического анализа наркотических средств и психотропных веществ. СПб.: НИИХ СПбГУ, 2003. 127 с.
13. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 12 мая 2010 г. № 346н «Об утверждении Порядка организации и производства судебно-медицинских экспертиз в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации» [Электронный ресурс]. URL: <http://garant.ru/products/ipo/prime/doc/12077987> (дата обращения: 27.10.2019).
14. Раменская Г.В., Родионова Г.М., Кузнецова Н.И., Петухов А.Е. ТСХ-скрининг токсикологически значимых соединений, изолируемых экстракцией и сорбцией. М.: ГЕОТАР-Медиа, 2010. 240 с.
15. Мелентьев А.Б. Практическое руководство по скринингу лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором для целей судебной токсикологии. Челябинск, 2001. Ч. 1. 62 с.
16. Немихин В.В., Качин С.В., Сагалаков С.А., Шахворостова Т.С. Люминесцентное определение кодеина в органах человека // Фундаментальные исследования. 2013. № 1. С. 483–486.
17. Государственный реестр лекарственных средств (по состоянию на 2 октября 2019 года) [Электронный ресурс]. URL: [document/cons_doc_LAW_119873/](http://document.cons_doc_LAW_119873/) (дата обращения 27.10.2019).
18. European Pharmacopoeia. 8th edition. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care, 2013. 3655 p.
19. Maslarska V., Tencheva J. Simultaneous determination and validation of paracetamol and codeine phosphate in pharmaceutical preparation by RP-HPLC. Int. J. Pharmacy and Pharmaceutical Sci. 2013. vol. 5. no. 2. P. 417–419.
20. Барсегян С.С., Пурвина Е.А., Саломатин Е.М., Свиридова Т.А., Федорова Т.Н. Определение морфина и кодеина при судебно-химических исследованиях с применением одноквадрупольного масс-селективного детектора, сопряженного с ВЭЖХ-системой // Судебно-медицинская экспертиза. 2012. № 6. С. 33–37.