

Федеральное государственное автономное образовательное  
учреждение высшего образования  
«Сибирский федеральный университет»

На правах рукописи

**Немихин Василий Васильевич**

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОДЕИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ И  
БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ  
СПЕКТРОМЕТРИИ**

02.00.02 – аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель:  
доктор химических наук, профессор  
Качин Сергей Васильевич

Красноярск – 2018

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

Список сокращений и условных обозначений.....	4
Введение.....	5
ГЛАВА 1. Литературный обзор.....	10
1.1 Общая характеристика и физико-химические свойства кодеина.....	10
1.2 Фармакологическое действие, фармакокинетика, токсикология кодеина...	13
1.3 Выделение кодеина из различных объектов.....	16
1.4 Методы идентификации и количественного определения кодеина.....	26
1.4.1 Хроматографические методы.....	27
1.4.2 Методы молекулярной спектроскопии.....	39
ГЛАВА 2. Объекты исследования, приборы, реактивы и техника эксперимента.....	43
2.1 Объекты исследования.....	43
2.2 Выделение кодеина из объектов исследования.....	45
2.3 Приборы, реактивы и техника эксперимента.....	47
ГЛАВА 3. Изучение спектроскопических свойств кодеина.....	54
3.1 Люминесценция кодеина в водных растворах.....	54
3.1.1 Влияние pH раствора и природы кислоты.....	54
3.1.2 Определение относительного квантового выхода флуоресценции.....	60
3.1.3 Условия люминесцентного определения кодеина.....	61
3.2 Твердофазная спектроскопия кодеина.....	73
3.2.1 Условия определения кодеина методом спектроскопии диффузного отражения.....	74
ГЛАВА 4. Разработка и апробация методик молекулярно- спектроскопического определения кодеина в лекарственных препаратах и биологических объектах.....	80
4.1 Методика люминесцентного определения кодеина в лекарственных	

препаратах.....	80
4.2 Методика определения кодеина в лекарственных препаратах методом спектрометрии диффузного отражения.....	85
4.3 Методика люминесцентного определения кодеина в органах человека.....	89
4.4 Методика экстракционно-флуориметрического определения кодеина в моче человека.....	94
Заключение.....	100
Выводы.....	103
Список литературы.....	105
Приложения.....	121
Приложение 1.....	122
Приложение 2.....	123

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ-МС - высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-селективным детектированием

ВЭЖХ-УФД – высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектором

ГЖХ – газожидкостная хроматография

ГХ – газовая хроматография

ГХ-МС – газовая хроматография с масс-селективным детектированием

ЖЖЭ – жидкость-жидкостная экстракция

ИКС – инфракрасная спектрометрия

ЛС – люминесцентная спектрометрия

МС/МС – tandemная масс-спектрометрия

МСД – масс-спектрометрический детектор

МСД/МСД – tandemный масс-спектрометрический детектор

ПИД – пламенно-ионизационный детектор

СДО – спектрометрия диффузного отражения

СФ – спектрофотометрия

ТИД – термоионный детектор

ТСХ – тонкослойная хроматография

ТФЭ – твердофазная экстракция

УФД – ультрафиолетовый детектор

УФДМ – ультрафиолетовый детектор с диодной матрицей

ФЛД – флуоресцентный детектор

ЭЗД – электронно-захватный детектор

ЭХД – электрохимический детектор

Другие сокращения и условные обозначения приведены в тексте диссертации

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность работы.** Кодеин – 3-метилморфин, алкалоид опия, обладает умеренной анальгетической активностью, в связи с чем используется как компонент болеутоляющих лекарств, а также в качестве противокашлевого лекарственного средства центрального действия в сочетании с другими препаратами [1].

Кодеин включен в Примерный перечень основных лекарственных средств Всемирной организации здравоохранения, Государственный реестр лекарственных препаратов Российской Федерации и в настоящее время является одним из наиболее широко используемых опиатов в мире [2].

Однако, как и другие болеутоляющие средства на основе опиатов, при хроническом использовании кодеин может вызывать физическую зависимость, и поэтому также включен в Список II Перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации [3].

Кроме того, из кодеинсодержащих лекарственных препаратов кустарным способом нелегально синтезируют опиоидный анальгетик дезоморфин (сленговое название – «крокодил»), обладающий мощным наркотическим действием и оказывающий выраженное токсическое воздействие на организм человека [4-6]. Это явилось одной из причин ужесточения порядка отпуска препаратов, содержащих кодеин, физическим лицам в аптечной сети [7].

Необходимость определения кодеина в различных объектах возникает при проверке подлинности лекарственных препаратов, терапевтическом мониторинге, тестировании лиц на употребление наркотических средств, а также при проведении судебно-химических исследований для подтверждения диагноза отравления препаратами опийной группы.

Сложный состав данных объектов и зачастую низкие концентрации кодеина в них предполагают использование для его определения высокочувствительных и селективных методов анализа.

Наиболее эффективными и распространенными методами определения кодеина являются хроматографические. Причем, в зависимости от целей исследования используются как относительно сложные (ГХ-МС, ВЭЖХ-МС), так и более простые (ТСХ) методы.

Вместе с тем, для определения кодеина представляют интерес методы молекулярной спектроскопии, сочетающие высокую чувствительность и экспрессность определения и, вместе с тем, не требующие сложного аппаратного оформления и высокой квалификации оператора. Однако их применение для анализа кодеинсодержащих объектов весьма ограничено, а существующие немногочисленные методики недостаточно чувствительны для определения низких содержаний кодеина.

**Цель работы** заключалась в разработке молекулярно-спектроскопических методик определения кодеина в лекарственных препаратах, биологических жидкостях и внутренних органах человека.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Изучить спектроскопические характеристики кодеина.
2. Найти оптимальные условия определения кодеина методами люминесценции и спектроскопии диффузного отражения.
3. Предложить схемы пробоподготовки исследуемых объектов для выделения кодеина и минимизации мешающего влияния сопутствующих компонентов при его последующем определении.
4. На основании полученных данных разработать аналитические процедуры молекулярно-спектроскопического определения кодеина.
5. Оценить метрологические характеристики разработанных аналитических процедур определения кодеина при анализе реальных образцов.

**Научная новизна.** Впервые систематически изучены спектроскопические свойства кодеина в зависимости от рН среды, природы кислоты, органического растворителя, флуоресцирующего противоиона.

Найдены оптимальные условия определения микро- и нанограммовых содержаний кодеина методами люминесценции и спектрометрии диффузного отражения.

Предложены схемы пробоподготовки, позволяющие достичь заданной чувствительности и селективности определения кодеина в исследуемых объектах.

Разработаны новые подходы к молекулярно-спектрометрическому определению кодеина в растворах и твердой фазе.

Научная новизна полученных результатов подтверждена двумя патентами РФ на изобретения: патент № 2523408 «Способ определения кодеина», патент № 2621474 «Способ определения кодеина».

**Практическая значимость.** Разработаны молекулярно-спектрометрические методики определения кодеина в лекарственных препаратах (от 0,04 до 1,2 г/дм<sup>3</sup>), во внутренних органах человека (от 0,01 до 0,75 мг/г), в моче человека (от 30 до 320 мкг/дм<sup>3</sup>).

Методики успешно апробированы на реальных экспертных образцах и используются в работе Красноярского краевого бюджетного учреждения здравоохранения «Красноярское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы» при проведении соответствующих судебно-химических исследований.

Полученные результаты используются на кафедре органической и аналитической химии Института цветных металлов и материаловедения Сибирского федерального университета при подготовке магистров по программе «Химия окружающей среды, химическая экспертиза и экологическая безопасность».

**Основные положения, выносимые на защиту:**

- спектроскопические свойства кодеина;

- оптимальные условия определения кодеина методами люминесценции и спектрометрии диффузного отражения;
- условия пробоподготовки исследуемых объектов;
- комплекс молекулярно-спектрометрических методик определения кодеина в лекарственных препаратах, внутренних органах и моче человека;
- результаты апробации разработанных методик определения кодеина в реальных образцах.

**Апробация работы.** Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на V Международном симпозиуме «Химия и химическое образование» (Владивосток, 2011), IX научной конференции «Аналитика Сибири и Дальнего Востока» (Красноярск, 2012), VI Международной научно-практической конференции «Достижения вузовской науки» (Новосибирск, 2013), XXV Международной научно-практической конференции «Наука и современность» (Новосибирск, 2013), VII Международном симпозиуме «Химия и химическое образование» (Владивосток, 2017).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 11 работ, из них 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 5 тезисов докладов в сборниках российских, международных конференций и симпозиумов, 2 патента РФ на изобретения.

**Личное участие автора.** Автор самостоятельно осуществлял поиск и систематизацию литературных данных. Основные экспериментальные результаты, приведенные в диссертации, получены самим автором или при его непосредственном участии. Обсуждение полученных результатов, их представление на конференциях, симпозиумах и подготовка материалов к публикации проводилась совместно с научным руководителем и соавторами.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, главы литературного обзора, трех глав экспериментальной части, заключения, выводов, списка цитируемой литературы (143 библиографические

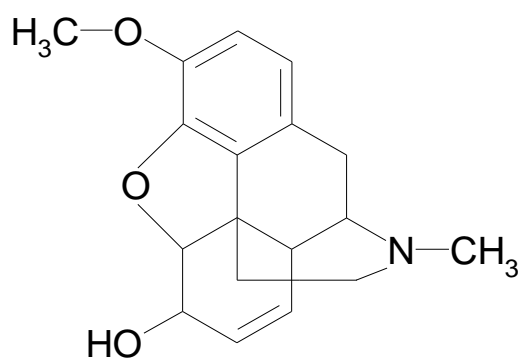


ссылки) и приложения. Диссертация изложена на 123 страницах, включает 41 рисунок и 28 таблиц.

## ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

### 1.1 Общая характеристика и физико-химические свойства кодеина

Кодеин наряду с морфином является одним из основных алкалоидов опия. По структуре является О-метиловым эфиром морфина (1). Название согласно номенклатуре ИЮПАК – (5- $\alpha$ , 6- $\alpha$ )-7,8-дидегидро-4,5-эпокси-3-метокси-17-метилморфинан-6-ол [8].

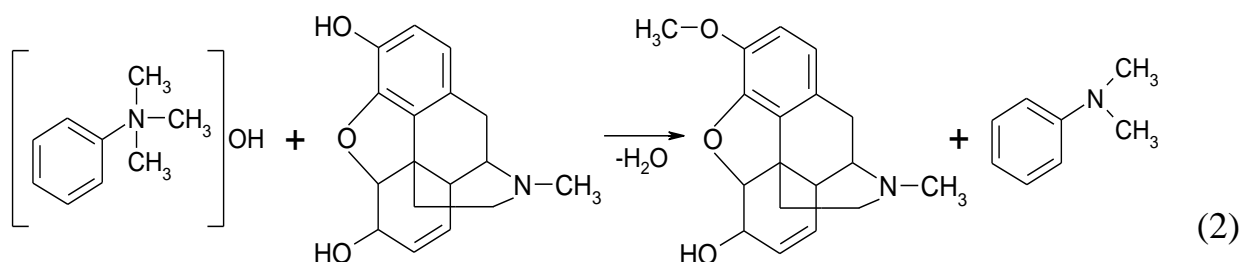


М.м. 299,4

(1)

Содержание натурального кодеина в различных сортах опия варьирует от 0,7 до 3,0% [9, 10]. Впервые выделить кодеин из опия удалось французскому химику Пьеру Жану Робике в 1832 году [11]. Выделение кодеина из смеси алкалоидов опия обычно производится многократной экстракцией хлороформом.

В настоящее время кодеин получают в основном из морфина путем его метилирования. Причем, одним из лучших метилирующих агентов является гидроксид триметилфенилammония (2) [12].



(2)

Кодеин представляет собой белый без характерного запаха кристаллический порошок. Из диэтилового эфира кодеин кристаллизуется в виде моногидрата с т. пл.  $155^{\circ}\text{C}$  [13, 14].

Это довольно сильное третичное основание, содержащее  $=\text{NCH}_3$ -группу ( $K_b = 9 \times 10^{-7}$ ). Водный и спиртовой растворы кодеина имеют щелочную реакцию [13].

Один из кислородных атомов в молекуле кодеина присутствует в виде вторичной спиртовой группы и при окислении трансформируется в кетонную. Другой кислородный атом находится в эфирной, индифферентной форме («мостиковый кислород») [15].

При взаимодействии с кислотами кодеин образует соответствующие соли. Наиболее важные из них:

- гидрохлорид  $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , т. пл.  $280^{\circ}\text{C}$ ;
- фосфат  $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_3 \cdot \text{H}_3\text{PO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ , т. пл.  $235^{\circ}\text{C}$ ;
- сульфат  $(\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , т. пл.  $278^{\circ}\text{C}$ .

В табл. 1 представлены данные по растворимости кодеина-основания и его солей.

Таблица 1 – Растворимость кодеина-основания и его солей при  $25^{\circ}\text{C}$  (кодеин : растворитель, объемн.) [8, 13, 14]

Растворитель	Основание	Гидрохлорид	Сульфат	Фосфат
Вода	1:120	1:30	1:30	1:4
Этанол	1:2	1:100	1:300	1:450
Хлороформ	1:0,5	1:800	н/р	н/р
Диэтиловый эфир	1:18	н/р	н/р	н/р
Бензол	1:10	н/р	н/р	н/р

\*н/р – нерастворим

Как видно из табл. 1, кодеин в отличие от его солей мало растворим в воде, легко растворяется в этиловом спирте и хлороформе.

В УФ-спектре поглощения кодеина (рис. 1) наблюдается характеристическая полоса поглощения с максимумом при 285 нм [8, 16].

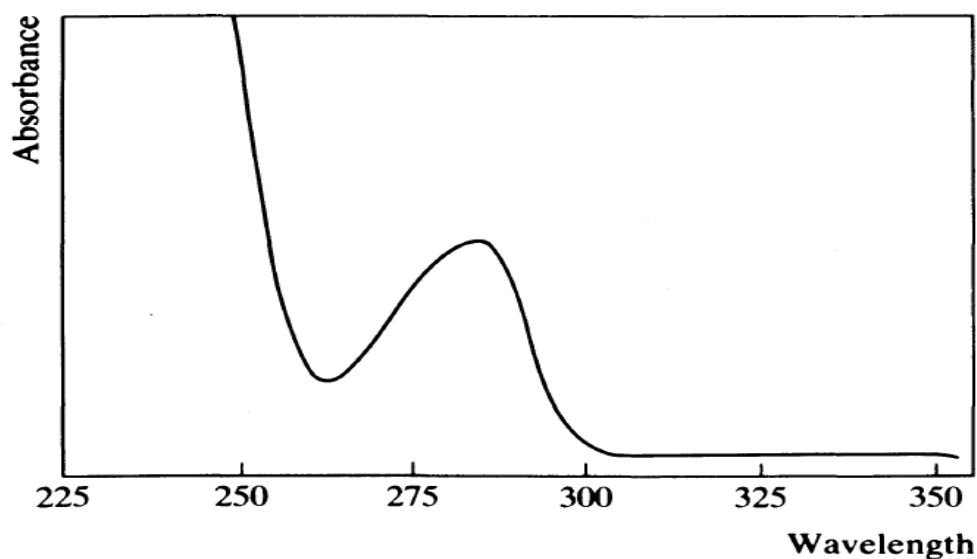


Рисунок 1 – УФ-спектр кодеина в 0,1 М НСІ

В ИК-спектре (KBr) кодеина наблюдаются характеристические полосы поглощения при 1052, 1268, 1500, 1111, 793, 934  $\text{cm}^{-1}$  (рис. 2) [8, 16].

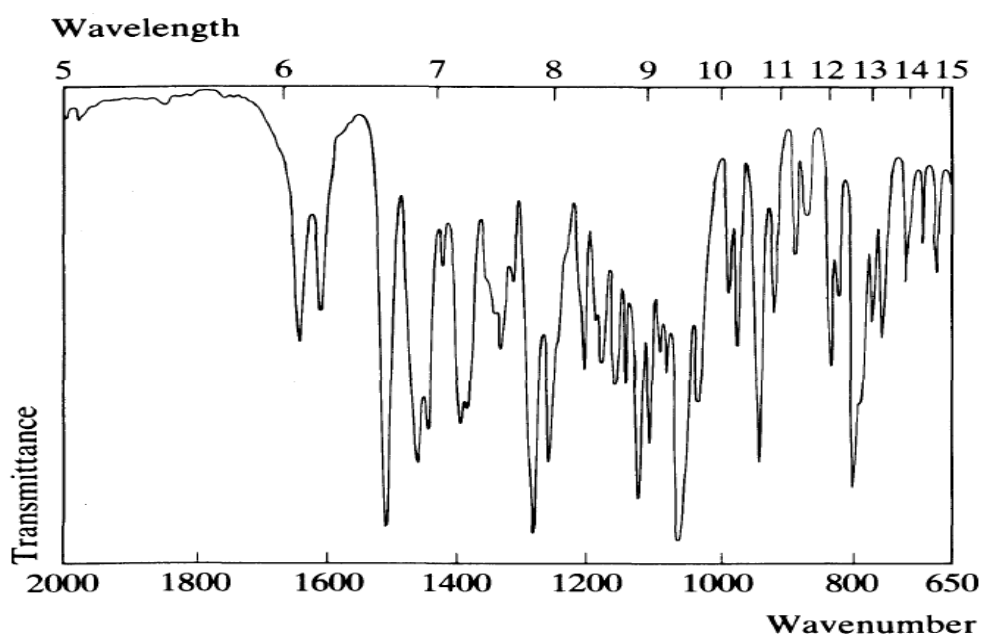


Рисунок 2 – ИК-спектр кодеина

В масс-спектре кодеина наиболее интенсивные пики дают ионы с  $m/z$  299, 42, 162, 124, 229, 59, 300, 69 (рис. 3) [8].

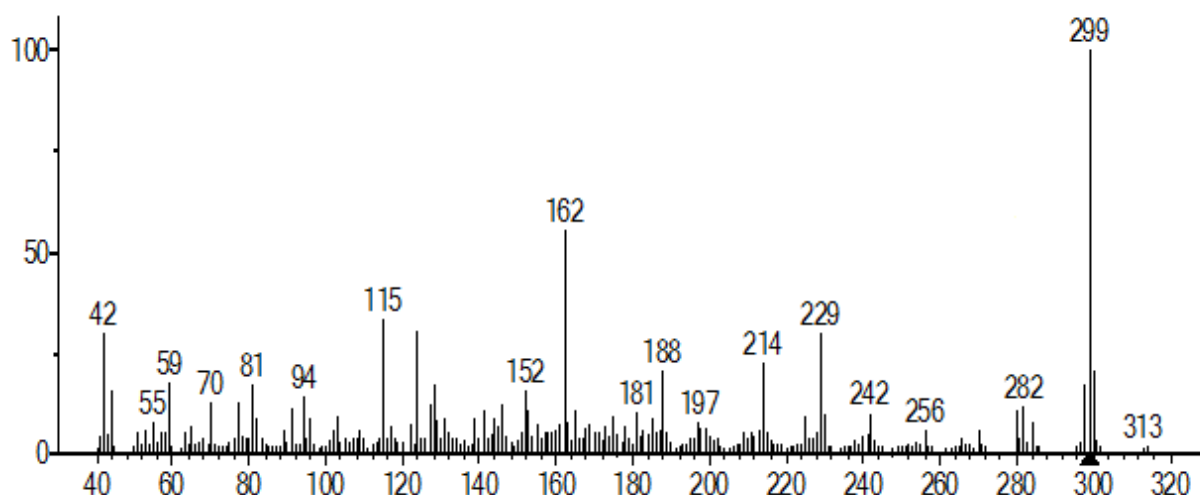


Рисунок 3 – Масс-спектр кодеина

## 1.2 Фармакологическое действие, фармакокинетика, токсикология кодеина

Кодеин является агонистом опиатных рецепторов и по своему действию близок к морфину, но болеутоляющие свойства выражены слабее. В меньшей степени, чем морфин, угнетает дыхание и тормозит деятельность желудочно-кишечного тракта.

Сильно выражена способность кодеина уменьшать возбудимость кашлевого центра, на чем основано его широкое применение в качестве эффективного противокашлевого лекарственного средства [1].

Обладая слабым наркотическим и болеутоляющим эффектом, кодеин содержится во многих комбинированных лекарственных препаратах (табл. 2). Он используется при мигрени, головной и зубной боли, лихорадочном синдроме, посттравматических болях.

После приема внутрь кодеин быстро всасывается, период полувыведения  $T_{1/2}$  составляет 2-4 ч. После всасывания в кровь кодеин подвергается метаболизму

в печени и затем выделяется почками. Основные пути метаболизма в печени: конъюгирование с глюкуроновой кислотой, O-деметилирование, N-деметилирование (рис. 4) [9, 17].

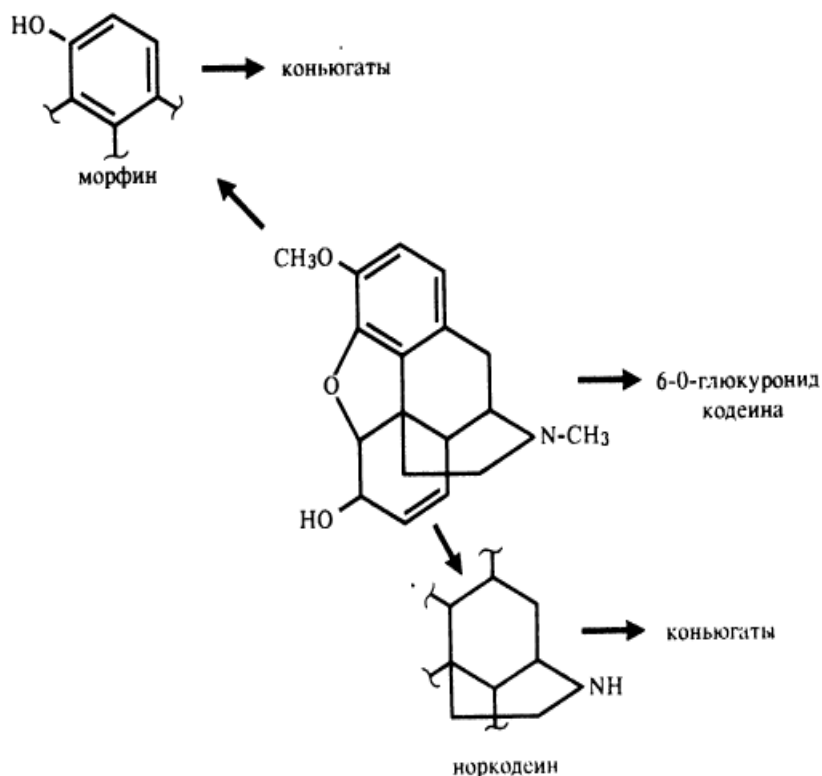


Рисунок 4 – Схема метаболизма кодеина [17]

После орального приема около 86% дозы выделяется с мочой за 24 ч, в т.ч. свободного и конъюгированного кодеина 40-70%, свободного и конъюгированного морфина – 5-15%, свободного и конъюгированного норкодеина – 10-20%.

Максимальные дозы кодеина для взрослых: разовая – 0,05 г, суточная – 0,2 г [1]. При употреблении высоких доз подобно другим опиатам кодеин может вызывать эйфорию. При превышении терапевтической дозы вызывает возбуждение, тошноту, иногда чувство «тяжёлой головы». При регулярном применении кодеина наблюдается явление привыкания (подобное привыканию к героину и другим препаратам группы опиатов) – кодеинизм [18-22].

Таблица 2 – Состав некоторых кодеинсодержащих препаратов [1, 23, 24]

Название препарата	Состав одной таблетки (активные компоненты), г
Пенталгин-Н	Кодеина фосфат 0,008 Метамизол натрия 0,300 Напроксен 0,100 Кофеин 0,050 Фенобарбитал 0,010
Пенталгин Плюс	Кодеина фосфат 0,008 Парацетамол 0,300 Пропифеназон 0,250 Кофеин 0,050 Фенобарбитал 0,010
Седалгин-Нео	Кодеина фосфат 0,010 Парацетамол 0,300 Метамизол натрия 0,150 Кофеин 0,050 Фенобарбитал 0,015
Коделак	Кодеина фосфат 0,008 Натрия гидрокарбонат 0,200 Порошок корня солодки 0,200 Порошок травы термопсиса ланцентного 0,020
Терпинкод	Кодеина фосфат 0,008 Натрия гидрокарбонат 0,250 Терпингидрат 0,250

Согласно литературным данным, терапевтическая концентрация кодеина в плазме крови – 0,05–0,25 мг/дм<sup>3</sup>, токсическая – 0,3–0,5 мг/дм<sup>3</sup>, летальная – более 1,6 мг/дм<sup>3</sup> [25, 26].

Смертельные отравления от употребления только кодеина встречаются достаточно редко. Более распространены случаи отравления кодеином в сочетании с другими лекарственными и наркотическими веществами, а также этиловым спиртом [27]. Содержание кодеина в биожидкостях и тканях человека при смертельных отравлениях представлено в табл. 3.

Таблица 3 – Содержание кодеина в биологических объектах при смертельных отравлениях [8, 9, 27, 28]

Биологический объект	Концентрация кодеина, мг/дм <sup>3</sup> (мкг/г)
Кровь	0,1 – 8,8
Моча	3,2 – 229
Желчь	0,5 – 43
Печень	(0,1 – 45)
Почки	(0,1 – 36)

### 1.3 Выделение кодеина из различных объектов

Объектами судебно-химических исследований на наличие кодеина могут являться:

- 1) лекарственные препараты;
- 2) биологический материал (внутренние органы человека);
- 3) биологические жидкости (кровь, моча, сыворотка, плазма).

Как правило, указанные объекты имеют сложный состав, поэтому стадия выделения кодеина во многом определяет успех его дальнейшей идентификации и последующего определения.



При анализе лекарственных, наркотических, допинговых и других веществ органической природы для пробоподготовки обычно используют ЖЖЭ. В то же время для подтверждения наличия определенного вида наркотического или лекарственного вещества предпочтение отдается ТФЭ [29-31].

Известно, что с помощью ЖЖЭ в органическую фазу извлекаются вещества, находящиеся в неионизированном виде (по принципу подобное растворяется в подобном). Для кодеина оптимальная  $\Delta pH$  максимального существования его неионизированной формы составляет 8,0-8,5 [31, 32]. В табл. 4 приведены данные по степени извлечения кодеина из его водных растворов при pH 8-8,5 различными органическими растворителями.

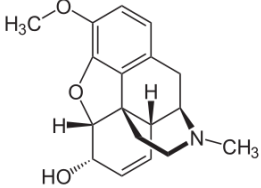
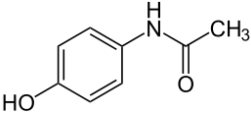
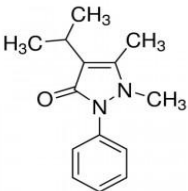
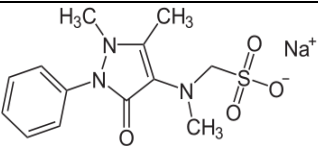
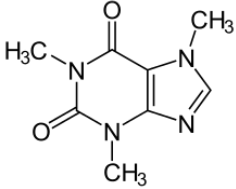
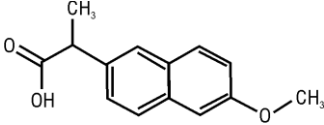
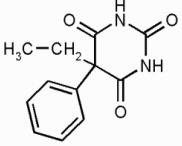
Таблица 4 – Степень извлечения кодеина из водных растворов при pH 8-8,5 [13]

Экстрагент	Степень извлечения, %
Хлороформ	86 – 88
Бензол	77 – 80
Диэтиловый эфир	25 – 29
Изоамиловый спирт	83 – 85

Из приведенных в табл. 4 данных видно, что лучшими экстрагентами для кодеина являются изоамиловый спирт и хлороформ.

*Выделение кодеина из лекарственных препаратов.* Кодеинсодержащие лекарственные препараты являются многокомпонентными смесями, состоящими из веществ с различными физико-химическими свойствами (табл. 5). Пробоподготовка таких лекарственных препаратов предполагает отдельное выделение и анализ соединений кислотного и основного характера.

Таблица 5 – Некоторые физико-химические характеристики основных компонентов кодеинсодержащих лекарственных препаратов [8]

Компонент	Структурная формула	pK <sub>a</sub> *	Log P(oct/wat)**
Кодеин		8,2	0,6
Парацетамол		9,5	0,5
Пропифеназон		-	1,9
Метамизол натрия		-	-
Кофеин		10,4	-0,07
Напроксен		4,2	3,2
Фенобарбитал		7,4	1,5

\* pK<sub>a</sub> – показатель ионизации кислоты, сопряженной основанию;

\*\*Log P (octanol/water) – логарифм коэффициента липофильности в системе 1-октанол — вода.

Часть таблетки или порошка сложного состава смешивается с водой, подкисленной 0,1 М раствором хлороводородной кислоты до pH 2-3 в соотношении 1:10 и полученная смесь переносится в делительную воронку [33, 34]. Далее смесь подвергается пробоподготовке по схеме, представленной на рис. 5.



Рисунок 5 – Схема выделения веществ из лекарственных препаратов [34]

Полученный таким образом «щелочной» экстракт, содержит кодеин, парацетамол, пропифеназон, кофеин, продукт разложения анальгина.

Более сложным является процесс *выделения кодеина из биологического материала (органы человека)*. Наиболее часто исследуемым объектом в этом случае является печень. Вследствие многообразия функций, выполняемых в организме печенью, в экстрактах из тканей этого органа, как правило, присутствует большое количество экзогенных и эндогенных веществ, включая продукты белкового, жирового и углеводного обмена [34-36].

Известно, что большинство поступающих в организм человека лекарственных веществ, в частности кодеин, образуют комплексы с белками, прежде всего с альбумином. Это связано с тем, что кровь и ткани организма имеют слабощелочную реакцию ( $\text{pH} = 7,35-7,40$ ). В данных условиях белки имеют отрицательный заряд, а кодеин – положительный заряд [13, 14].

Таким образом, для того чтобы выделить кодеин из органов необходимо, прежде всего, разрушить его комплексы с белками. Разрушение этих комплексов происходит в диапазоне  $\text{pH} 2,5-3,0$  [13]. Данные значения  $\text{pH}$  используют для извлекающих жидкостей, с помощью которых производят выделение алкалоидов из биологического материала.

Применяемые в химико-токсикологическом анализе методы выделения кодеина из биологического материала основаны на извлечении его подкисленным этанолом – метод Стаса-Отто (рис. 6) или подкисленной водой – метод А.А. Васильевой (рис. 7) [13, 14, 34].

Выделение этанолом с добавлением соответствующих кислот сводится к извлечению алкалоидов в виде их виннокислых или щавелевокислых солей, выпариванию, обработке водой для удаления жиров, а затем экстрагированию оснований алкалоидов диэтиловым эфиром.

Эффективность применения этанола заключается в его способности хорошо растворять многие органические вещества, а также свертывать, переводить в нерастворимое состояние белки – главную составную часть большинства объектов химико-токсикологического исследования.

Вместе с тем данный метод обладает рядом недостатков:

- длительность процесса (в общей сложности обработка занимает 8-10 рабочих дней);
- большое количество операций, связанных с очисткой спиртовой вытяжки от белков и продуктов белкового распада;

- возможность потерь малых количеств алкалоидов как вследствие сорбции их белками и фильтровальной бумагой, так и в результате продолжительного нагревания кислого раствора;

- относительная дороговизна метода, т.к. на каждое исследование, например, внутренних органов расходуется до 500 мл 96 %-го этанола.

Все это приводит к тому, данный метод теряет свое значение, сохраняя свою роль при исследовании биологических объектов с выраженными гнилостными изменениями.

В настоящее время наиболее распространенным в практике судебно-медицинских лабораторий является метод выделения алкалоидов подкисленной водой. Для подкисления воды используют щавелевую, винную, уксусную и другие кислоты.

Достоинства данного метода по сравнению с методом Стаса-Отто:

- уменьшение временных затрат в 3-4 раза;
- отсутствие необходимости в операциях нагревания и, как следствие, уменьшение возможных потерь целевого компонента;
- замена этанола на воду.

Однако, данный метод ограниченно пригоден для выделения кодеина из загнившего биологического материала.

При разработке новых методов выделения токсикологически значимых веществ из биологического материала предпочтение в настоящее время отдается методикам, позволяющим идентифицировать максимально широкий круг аналитов в одной пробе для использования всех аналитических возможностей новых приборов.

Одна из таких методик основана на экстракции матрицы органическим растворителем и очистке методом ТФЭ (рис. 8). Разработчики назвали этот метод пробоподготовки QuEChERS - аббревиатура от основных достоинств метода: Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe [37]. Метод QuEChERS лишён таких

недостатков традиционных методов пробоподготовки, как длительность процедуры выделения и использование больших объемов опасных растворителей.



Рисунок 6 – Схема выделения веществ по методу Стаса-Отто [34]



Рисунок 7 – Схема выделения веществ по методу А.А. Васильевой [34]

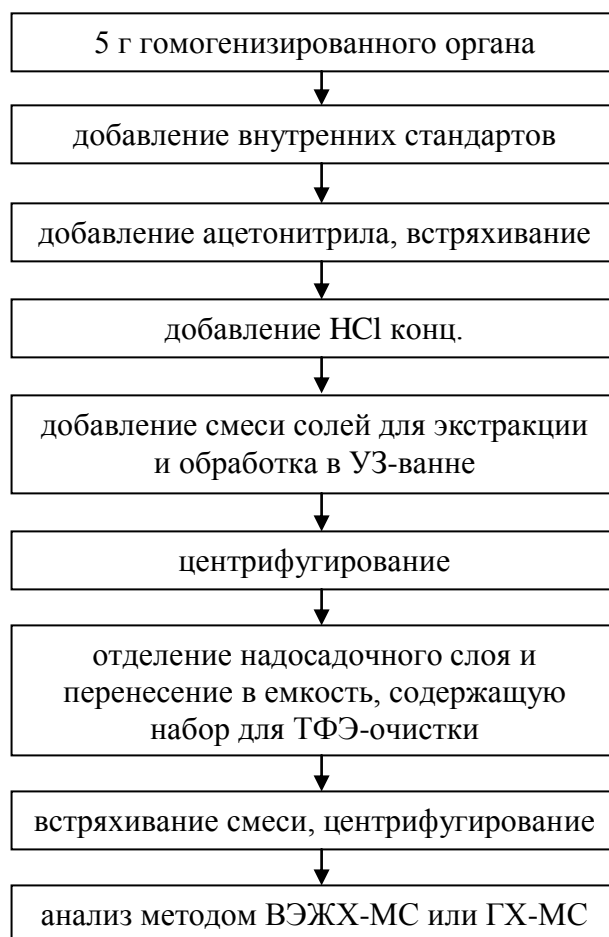


Рисунок 8 – Схема выделения веществ по методу «QuEChERS» [37]

*Выделение кодеина из биологических жидкостей (мочи).* Большинство авторов методик скрининга наркотических и лекарственных веществ в биологических жидкостях сходятся во мнении, что для этих целей лучше всего подходит моча [29, 30, 38, 39].

Существенным преимуществом её использования в качестве биообъекта являются достаточные объемы доступных проб и, как следствие, возможность обеспечить необходимые концентрации психоактивных веществ и их метаболитов [34].

Моча также содержит незначительное количество белковых компонентов, что весьма облегчает выделение и дальнейший анализ контролируемых веществ [31].

Поступающий в организм кодеин вступает в реакции конъюгирования с глюкуроновой кислотой, сульфатом и глутатионом с образованием ковалентно связанных полярных соединений, хорошо растворимых в воде и не извлекаемых органическими растворителями [13, 35]. Поэтому первичный этап при исследовании мочи – гидролиз конъюгатов.

Применяют два способа гидролиза: неспецифический кислотный [40-46] и специфический ферментативный [40-42, 46, 47] гидролиз.

Кислотный гидролиз имеет более короткое время инкубации и проще в осуществлении. Однако вследствие неспецифичности реакции расщепления ковалентной связи и довольно жестких условий его проведения (концентрированные кислоты, высокие температуры, иногда использование автоклавов) возможно образование большого количества побочных продуктов. Экстракты гидролизата продуцируют высокий фон. Кроме того, возникает необходимость нейтрализации кислоты перед экстракцией кодеина.

Ферментативный гидролиз под действием смеси ферментов  $\beta$ -глюкуронидазы и  $\beta$ -сульфатазы является более специфичным, проходит в мягких условиях и уменьшает вероятность образования побочных продуктов, что отражается на чистоте гидролизата. Недостатками этого вида гидролиза являются необходимость строгого соблюдения условий (рН, температуры, состава буфера, активности фермента), длительное время инкубирования (12-20 ч), изменение активности фермента в зависимости от происхождения и сроков хранения, а также его ингибирование солями.

Для выделения кодеина из гидролизатов мочи применяют как ЖЖЭ, так и получивший признание в последние годы метод ТФЭ.

Выделение кодеина из биожидкостей методом ЖЖЭ проводят при рН 8-9 [48]. Добавление твердого хлорида натрия облегчает переход веществ в органическую фазу за счет эффекта высаливания [43, 49, 50].

Экстрагентами наиболее часто служат смеси растворителей: хлорированных углеводов и спиртов в различных соотношениях: хлороформ, 1,2-дихлорэтан,



метиленхлорид в смеси с изопропиловым, н- и изобутиловым, изоамиловым спиртами в соотношении от 3:1 до 9:1 (табл. 6).

Полярные экстрагенты (галогенированные углеводороды в смеси со спиртами) обладают высокой экстракционной активностью, но при этом они экстрагируют большое количество компонентов матрицы пробы. Менее полярные растворители на основе ароматических углеводородов (толуол-бутанол, бензол-бутанол и др.) дают более чистые экстракты при изолировании опиатов из мочи [43].

Таблица 6 – Состав некоторых систем, используемых для экстракции кодеина из мочи при pH 8-9

Состав экстрагента (соотношение компонентов, объемн.)	Реактив для регулирования pH	Степень извлечения, %	Литература
н-Бутилхлорид	0,05 М калий фосфатный буфер $K_2HPO_4$	52	[49]
Хлороформ		76	
Хлороформ-изопропиловый спирт (9:1)		71	
Хлороформ-изопропиловый спирт (8:2)		60	
Хлороформ-изопропиловый спирт (7:3)		46	
Изопропиловый спирт+ $K_2CO_3$		77	
Метиленхлорид-изобутанол (9:1)	0,75 М раствор $Na_2CO_3$	58	[45]
Хлороформ-изобутанол (6:1)	насыщенный раствор	86	[31]
Хлороформ-н-бутанол (9:1)	$NaHCO_3$	95	

Метод ЖЖЭ приводит к соэкстрагированию значительного количества компонентов матрицы, требует использования опасных и вредных органических растворителей, кроме того, в процессе экстракции возможно образование стойкой эмульсии, для разделения фаз в которой необходимы особые приемы.

В последние годы метод ЖЖЭ все чаще заменяют на метод ТФЭ, значительно сокращающий число операций, объемы растворителей и время анализа. ТФЭ также более эффективен для целевых соединений, что способствует снижению матричного фона [51].

ТФЭ-выделение кодеина проводят с применением коммерческих микроколонок («картриджей»), заполненных твердыми сорбентами: Bond Elut Certify (Varian Sample Preparation Products, Harbor City, CA, USA) [40, 52, 53] и ZSDAU020 (Worldwide Monitoring Corp., Horsham, PA, USA) [54].

Для элюирования опиатов применяют различные органические растворители или их смеси: метанол [40], метилхлорид-изопропанол-25%-ный раствор аммиака (80:20:2) [52, 53], этилацетат-диэтиламин (98:2) [54].

Основным недостатком ТФЭ является неоднородность распределения частиц сорбентов по размеру даже для одной серии картриджей.

#### **1.4 Методы идентификации и количественного определения кодеина**

Согласно [55], для анализа объектов, поступающих на исследование, должны применяться различные аналитические методы. По возможности, исследование должно быть проведено не менее чем двумя независимыми методами.

Для идентификации и количественного определения кодеина в различных объектах широко применяются следующие методы анализа:

- хроматографические (ТСХ, а также ГХ и ВЭЖХ с различными типами детекторов);
- спектрометрические (СФ, ЛС, ИКС).

### 1.4.1 Хроматографические методы

Хроматографические методы по праву занимают одно из ведущих мест в анализе опиатов [10, 56, 57].

*ТСХ* – один из скрининговых методов идентификации и количественного определения кодеина, отличающийся простотой, доступностью и относительно низкой стоимостью инструментария и реактивов [10, 34].

Для анализа растворов или экстрактов, содержащих кодеин, применяют хроматографические пластины с металлической, пластиковой или стеклянной подложкой, например, марки Silufol, Merck, Сорбфил. Иногда используют силикагель с флуоресцирующей добавкой (УФ-254, UV-254, F-254) [48].

При исследовании извлечений из биоматериала для *ТСХ*-разделения веществ основного характера в качестве подвижной фазы используют общие системы растворителей, рекомендованные Комитетом по токсикологическому анализу Международной ассоциации судебных токсикологов (табл. 7) [8, 34, 40, 58, 59].

Однако данные системы не обеспечивают эффективное разделение кодеина с морфином, сопутствующим ему в ряде биологических объектов. С этой целью применяют частные системы растворителей [33, 34, 60-72]. В табл. 8 приведены примеры систем, в которых достигается наиболее эффективное разделение пары кодеин-морфин.

Таблица 7 – Общие системы растворителей, применяемые в *ТСХ*-скрининге веществ основного характера

Компоненты системы	Соотношение компонентов (объемн.)
метанол – 25%-ый раствор аммиака	100 : 1,5
циклогексан – толуол – диэтиламин	75 : 15 : 10
хлороформ - метанол	9 : 1

метанол – н-бутанол	60 : 40
хлороформ – этанол	90 : 10
хлороформ – метанол – пропионовая кислота	72 : 18 : 10

Таблица 8 – Некоторые частные системы растворителей, применяемые в ТСХ-скрининге опиатов

Компоненты системы	Соотношение компонентов (объемн.)	Литература
ацетонитрил – хлороформ – этилацетат – 25%-ый раствор аммиака	40 : 30 : 25 : 5	[60]
хлороформ – н-гексан - триэтиламин	9 : 9 : 4	[61]
хлороформ – диэтиловый эфир – метанол- 25%-ый раствор аммиака	75 : 25 : 5 : 1	[62]
хлороформ – этилацетат – метанол - пропиламин	35 : 45 : 5 : 5	[63]
диэтиловый эфир – этанол – 25%-ый раствор аммиака	6 : 3 : 1	[33]
этилацетат – метанол – 25%-ый раствор аммиака	17 : 2 : 1	[33]
хлороформ – циклогексан – диэтиламин	7 : 2 : 1	[34]

После разделения, как правило, пятно кодеина сначала регистрируют по ингибированию флуоресценции соответствующей добавки при 254 нм и затем проводят обработку хроматографической зоны окрашивающими реагентами (табл. 9) [48].

Таблица 9 – Окраска зон кодеина при обработке хроматограммы различными реагентами [8, 13, 14, 73]

Название реагента	Состав реагента	Окраска хроматографической зоны кодеина
Реактив Марки	концентрированная серная кислота, содержащая формальдегид	фиолетовая
Реактив Манделина	концентрированная серная кислота, содержащая ванадиевую кислоту	светло-зеленая
Реактив Драгендорфа	тетрайодовисмутат калия	кирпично-красная
Реактив Фреде	концентрированная серная кислота, содержащая молибденовую кислоту	светло-зеленая

При анализе многокомпонентных кодеинсодержащих лекарственных препаратов методом ТСХ возникают трудности в подборе оптимальной системы растворителей. Для надежной идентификации микрокомпонентов (кодеина) увеличивают количество хроматографируемого образца, что приводит к перегруженности хроматограммы макрокомпонентами (парацетамол, анальгин, пропифеназон) и, в конечном счете, к снижению эффективности разделения [74].

Авторы [75] для эффективного разделения кодеина с парацетамолом, пропифеназоном и кофеином использовали систему хлороформ – этанол (8:2). В работе [76] кодеин успешно разделен с парацетамолом, кофеином, папаверином, атропином (препарат «Спазмoverалгин Нео») в системе хлороформ – этанол – 25%-ый раствор аммиака (90:10:1).

При ТСХ-скрининге извлечений из биологического материала важно, подвергся ли биоматериал путрификации (гниению). В процессе путрификации идет разложение высокомолекулярных соединений с образованием низкомолекулярных аминов, близких по химической структуре к анализируемым

лекарственным средствам. Таким образом, при ТСХ-скрининге упомянутых выше образцов в экстрактах обнаруживается целый ряд соэкстрактивных веществ (кадаверин, путресцин, триптамин), мешающих проведению анализа [34].

В целом, конечно, ТСХ уступает многим инструментальным методам по чувствительности и разрешающей способности обнаружения опиатов. Однако простота и экономичность определяет эффективность его использования для предварительного обнаружения кодеина или в качестве способа дополнительной очистки проб.

Одним из наиболее распространенных методов анализа кодеинсодержащих объектов является ГХ. Это обусловлено экспрессностью, высокой разрешающей способностью, чувствительностью при относительно невысокой погрешности ГХ (1-5%) [36, 77, 78].

В аналитической практике чаще используют *метод ГЖХ*, что связано с чрезвычайным разнообразием жидких неподвижных фаз.

При идентификации и количественном определении опиатов разделение проводят, как правило, на кварцевых капиллярных колонках с неполярными или слабополярными стационарными фазами (табл. 10).

Среди неполярных фаз наиболее часто используют фазы на основе 100%-диметилполисилоксана (HP-1, OV-1) [79, 80] или 5%-фенил-95%-метилполисилоксана (EC-5) [81]. Из среднеполярных стационарных фаз имеются данные об использовании фаз на основе 50%-фенил-50%-метилполисилоксана (OV-17, DB-17) [82, 83], 75%-фенил-25%-метилполисилоксана (OV-25) [84, 85].

Типы используемых в ГЖХ детекторов приведены в табл. 10.

Таблица 10 – ГЖХ-анализ кодеинсодержащих объектов

Объект анализа	Неподвижная жидкая фаза	Тип детектора	Предел обнаружения кодеина, мг/дм <sup>3</sup> (мкг/г)	Литература
Сироп от кашля	OV-25	ПИД	0,1	[84]
Внутренние органы	OV-17	ПИД	(0,3)	[82]
Кровь	HP-1	ТИД	0,1	[79]
	OV-1	ЭЗД	0,005	[80]
Плазма	DB-17	ТИД	0,0025	[83]
Моча	EC-5	ТИД	0,0015	[81]
	Chrompack	ТИД	0,004	[86]

В настоящее время мощным инструментарием для систематического токсикологического анализа является метод *ГХ-МС*, благодаря его высокой информативности [29-31, 39, 87, 88]. Вместе с тем это весьма затратный метод из-за высокой стоимости оборудования и сопутствующих материалов, поэтому его использование оправдано при проведении серийных анализов множества образцов.

Хроматографическое разделение в *ГХ-МС* проводят на кварцевых капиллярных колонках с неполярными и малополярными стационарными фазами – 100%-ый диметилсиликон (DB-1, HP-1, OV-1, CP-SIL 5CB) [89-94] или 95%-метил-5%-фенилсиликон (DB-5, DB-5MS, HP-5MS) [95-101].

Для получения ионов наиболее часто используется «жесткая» ионизация электронным ударом (EI – electron impact) [89-91, 93, 95, 97]. Масс-спектры хорошо воспроизводимы и на их базе существуют известные библиотеки спектров, прилагаемые к приборам.

Некоторые авторы [92, 96] для обнаружения кодеина применяют «мягкий» метод химической ионизации отрицательных ионов (NICI – negative ion chemical ionization). В данном случае масс-спектры не так перегружены информацией [88].

В табл. 11 приведены примеры ГХ/МС определений кодеина в биологическом материале.

Таблица 11 – ГХ/МС-анализ кодеинсодержащих объектов

Объект анализа	Неподвижная жидкая фаза	Метод ионизации	Предел обнаружения кодеина, мг/дм <sup>3</sup>	Литература
Кровь	DB-1	EI	0,01	[89]
	DB-1	EI	0,005	[90]
	OV-1	EI	0,001	[91]
	HP-5MS	EI	0,04	[99]
	HP-5MS	EI	0,02	[100]
Плазма	HP-1	NICI	0,0001	[92]
Сыворотка	DB-5MS	EI	0,034	[95]
	DB-5	NICI	0,00015	[96]
Моча	DB-1	EI	0,01	[93]
	DB-5MS	EI	0,006	[97]
	DB-1	EI	0,05	[101]
	DB-5	EI	0,06	[98]
	CP-SIL 5CB	EI	0,05	[94]

Количественное определение кодеина проводят, как правило, с использованием внутреннего стандарта (налорфин, этилморфин, н-тетракозан, докозан, дейтерированные опиаты).

При ГХ-определениях соединений, имеющих полярные группы –ОН и –NH, необходима стадия дериватизации, поскольку потери веществ из-за низкой



летучести и сорбции могут быть довольно значительными. В результате дериватизации активный водород гидроксильных и аминогрупп замещается на группы, придающие молекуле свойства менее полярного и более летучего соединения [102].

Для дериватизации опиатов в основном используют реакции двух типов:

1) ацилирование с помощью уксусного ангидрида [99, 103], пропионового ангидрида [89, 93, 98, 100], трифторуксусного ангидрида [95, 99], пентафторпропионового ангидрида [80, 96], гептафтормасляного ангидрида [79, 92];

2) силилирование с помощью ВСА (N,O-бис(триметилсилил)ацетамид) [52, 82], BSTFA-TMCS 99:1 (N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамид + 1% триметилхлорсилан) [40, 43, 79, 82, 94, 101].

Наряду с повышением чувствительности и воспроизводимости ГХ-определений опиатов процедура дериватизации имеет ряд недостатков:

- вследствие гидролитической неустойчивости продуктов дериватизацию необходимо проводить непосредственно перед газохроматографическим определением;

- перфторированные ангидриды являются высокоактивными соединениями, и введение их в хроматограф в составе реакционной смеси отрицательно сказывается на разделительной способности колонки. Поэтому после завершения реакций избыток реагентов и летучие побочные кислые продукты необходимо удалять из реакционной среды нагреванием под током азота;

- еще большую опасность представляют кислые побочные продукты ацилирования, которые отрицательно влияют на эффективность колонки, вплоть до исчезновения ее разделительной способности. Для нейтрализации этого влияния (особенно при дериватизации с уксусным или пропионовым ангидридом) реакцию проводят в среде крайне токсичных растворителей основного характера, способных акцептировать кислые продукты (чаще всего, в пиридине).

- силилирующие реагенты не разрушают фазу хроматографической колонки, что позволяет анализировать непосредственно реакционную смесь, однако они могут загрязнять детектор, откладываясь в виде двуокиси кремния. Кроме того, введение реагентов для получения ТМС-эфиров в колонку газового хроматографа при анализе ведет к ее «привыканию» и после этого резко ухудшаются газохроматографические характеристики колонки при анализе других дериватов и нативных лекарственных веществ

- полифторированные реагенты и реагенты для силилирования довольно дороги, а для их производных в библиотеках масс-спектров имеется очень мало справочных данных.

В настоящее время одним из наиболее часто используемых методов обнаружения и количественного определения кодеина в различных объектах является *ВЭЖХ*.

Достоинства *ВЭЖХ*:

- большое разнообразие жидких подвижных фаз позволяет, применяя различные элюенты, изменять параметры удерживания и селективность хроматографической системы [77];

- проведение разделения при комнатной температуре исключает стадию дериватизации кодеина в отличие от метода газовой хроматографии;

- высокая чувствительность анализа;

- относительно небольшая погрешность анализа [104].

*ВЭЖХ* идеально подходит для проверки чистоты и качества многокомпонентных лекарственных препаратов, содержащих кодеин, особенно когда применение *ГЖХ* затруднено из-за недостаточной термической устойчивости или низкой летучести соединений [105]. *ВЭЖХ* включена в отечественную фармакопею [106] и ряд зарубежных фармакопей [107-109].

Контроль качества кодеинсодержащих лекарственных препаратов является достаточно трудной задачей. Это обусловлено, во-первых, многокомпонентным составом анализируемых препаратов, а во-вторых, большой разницей в

содержании кодеина и других компонентов. Так, содержание парацетамола превышает количество кодеина фосфата в 16-37 раз [105]. Возникает необходимость в предварительных операциях отделения и концентрирования веществ, содержащихся в сравнительно малых количествах.

Так, авторы [110] при анализе препарата «Каффетин» кодеина фосфат отделяют и концентрируют ЖЖЭ, а затем определяют методом ВЭЖХ. Вместе с тем, известны примеры успешного одностадийного анализа (табл. 12).

Основным преимуществом ВЭЖХ - анализа опиатов в биожидкостях является возможность определять глюкурониды (основные метаболиты морфина и кодеина), и, таким образом, исключить стадию гидролиза при подготовке пробы [111, 112].

ВЭЖХ в анализе биологических образцов, содержащих кодеин, в основном используют как подтверждающий результаты ГХ-МС-скрининга наркотических и лекарственных веществ (табл. 13).

Кодеин определяют методом обращенно-фазовой хроматографии [113-122]. В качестве подвижной фазы обычно используют смешанные водно-органические фазы. Из органических растворителей в основном применяют метанол и ацетонитрил, сочетающие хорошую растворяющую способность и низкую вязкость [123]. Однако, метанол относится к группе особо опасных ядов, а недостатком ацетонитрила является его довольно высокая стоимость.

Вещества, входящие в состав кодеинсодержащих препаратов, относятся к веществам кислотного характера, большинство анализов выполняют при рН 2,5-5 [113, 114, 117, 119-122, 124, 125].

ВЭЖХ-анализ биожидкостей проводится с использованием ФЛД [119], ЭХД [121, 124], МСД [111, 112] и МСД/МСД [115, 116] детекторов.

В [126] применили способ косвенного кондуктометрического детектирования в анализе восьмикомпонентного сиропа от кашля.

Метод ВЭЖХ, наряду со своими достоинствами, имеет ряд недостатков:

- необходимость в особо тщательной пробоподготовке;

- высокие требования к чистоте используемых растворителей;
- оперирование с токсичными растворителями (ацетонитрил, метанол);
- высокая стоимость оборудования.

Таблица 12 – ВЭЖХ-анализ кодеинсодержащих объектов (лекарственные препараты)

Состав препарата	Неподвижная фаза	Подвижная фаза; режим элюирования	Детектор	Предел обнаружения кодеина, мг/дм <sup>3</sup>	Литература
кодеина фосфат, псевдоэфедрина гидрохлорид, трипролидина гидрохлорид	Силикагель С <sub>18</sub>	метанол – ацетонитрил – ацетатный буфер; изократический	УФД	20	[113]
кодеина фосфат парацетамол кофеин	Силикагель С <sub>8</sub>	метанол – ацетонитрил – изопропиловый спирт – фосфатный буфер; изократический	УФД	0,3	[117]
кодеина фосфат, парацетамол	Силикагель С <sub>18</sub>	ацетонитрил – фосфатный буфер; изократический	УФД	0,6	[114]
кодеина фосфат, ацетилсалициловая кислота, кофеин	Силикагель С <sub>8</sub>	ацетонитрил – вода – изопропиловый спирт – о- фосфорная кислота; изократический	УФДМ	0,48	[118]
кодеина фосфат бромизовал парацетамол фенобарбитал папаверина гидрохлорид кофеин	Силикагель CN	ацетонитрил – фосфатный буфер; изократический	УФД	не указан	[122]

Таблица 13 – ВЭЖХ-анализ кодеинсодержащих объектов (биологические жидкости)

Биологическая жидкость	Неподвижная фаза	Подвижная фаза; режим элюирования	Детектор	Предел обнаружения кодеина, мг/дм <sup>3</sup>	Литература
Кровь	Силикагель C <sub>18</sub>	метанол – формиат аммония; градиентный	МС/МС	0,001	[115]
	ODS-3	ацетонитрил – формиат аммония; градиентный	МС	0,001	[111]
Плазма	Силикагель C <sub>18</sub>	метанол – ацетонитрил – муравьиная кислота; изократический	МС/МС	0,0002	[116]
	Силикагель C <sub>8</sub>	ацетонитрил – фосфатный буфер; изократический	ФЛД	0,005	[119]
	μPorasil	ацетонитрил – ацетатный буфер; изократический	ЭХД	0,00014	[124]
Сыворотка	SupelcoSil LC-Si	вода – метанол – ацетонитрил – муравьиная кислота; изократический	МС	0,004	[112]
Моча	Nova Pak phenyl	ацетонитрил – фосфатный буфер; изократический	УФД/ЭХД	0,05	[121]
	Hibar Lichrosphere 100 CN-8	ацетонитрил – фосфатный буфер; градиентный	УФДМ	не указан	[120]

### 1.4.2 Методы молекулярной спектроскопии

Методы молекулярной спектроскопии (СФ, СДО, ЛС, ИКС) в анализе кодеинсодержащих препаратов используются весьма ограниченно. В составе молекул всех опиатов имеются ароматические и пиперидиновые структуры, которые обуславливают появление хорошо выраженных полос поглощения в УФ-спектрах [10]. Однако близость максимумов поглощения кодеина и сопутствующих ему в анализируемых пробах лекарственных веществ (парацетамол, пропифеназон, кофеин, анальгин) и метаболитов (прежде всего, морфин), затрудняет прямое определение кодеина в сложных смесях.

Для устранения мешающего влияния сопутствующих компонентов применяют предварительное ТСХ-разделение. Так, авторы работы [75] проводят ТСХ-отделение кодеина от парацетамола, пропифеназона и кофеина, используя систему растворителей хлороформ – этанол (8:2), затем зону кодеина элюируют 0,05 М раствором хлороводородной кислоты и измеряют оптическую плотность раствора при 285 нм.

Для разделения кодеина и его основного метаболита морфина применяют экстракцию диэтиловым эфиром из щелочного раствора. Морфин при данных условиях образует морфинат и не экстрагируется [13].

Отличить кодеин от морфина методом УФ-спектроскопии можно по их спектрам поглощения в 0,1 М растворе гидроксида натрия: кодеин в данных условиях не имеет характерных максимумов поглощения, а морфин поглощает при 298 нм [8, 13].

Для повышения чувствительности и селективности определения кодеина предложено несколько экстракционно-фотометрических методик его определения в фармацевтических препаратах, основанных на реакциях образования ионных ассоциатов с различными органическими красителями (табл. 14).

Таблица 14 – Условия экстракционно-фотометрического определения кодеина в фармацевтических препаратах

Фотометрический реагент	рН раствора	Экстрагент	Предел обнаружения кодеина, мг/дм <sup>3</sup>	Литература
Тропеолин 00	4,6	хлороформ	7	[13]
Бромкрезоловый зеленый	3,8	хлороформ	3	[127]
Бромтимоловый синий	5,6	хлороформ	2	[128]
Метилловый оранжевый	3,5	хлороформ	не указан	[129]

В данных способах экстракционно-фотометрического определения кодеина пробоподготовка отличается многостадийностью и приходится оперировать с большими объемами токсичного растворителя – хлороформа.

Минимальные значения концентраций кодеина, определяемых спектрофотометрическим методом, составляют  $10^{-1}$ — $10^1$  мг/дм<sup>3</sup> [77]. Такая чувствительность вполне достаточна при определении кодеина в образцах лекарственных препаратов, однако, неудовлетворительна при анализе биологических объектов.

Метод ИКС используют в фармакопейном анализе для определения подлинности субстанции кодеина [106-109]. Наибольший интерес в ИК-спектре кодеина (рис. 2) представляют валентные колебания связей C=C, C=N, O-H, O=O и колебаний ароматического и гетероароматического циклов [130].

При ИКС-анализе многокомпонентных кодеинсодержащих препаратов проводят предварительное разделение компонентов смеси, например, методом ТСХ [131].



Для полуколичественного определения основных алкалоидов опия (морфина, кодеина, папаверина, тебаина) в образцах растительного мака авторы [132] предложили метод ИК-Фурье-спектроскопии. Данным способом возможно быстрое (в течение 5 минут) определение веществ непосредственно в объекте анализа, без предварительной очистки и разделения. Однако метод предполагает использование достаточно дорогостоящего аналитического оборудования.

По сравнению с СФ метод ЛС имеет существенные преимущества в чувствительности, селективности и информативности [69, 133, 134]. Однако в литературе описано лишь несколько способов люминесцентного определения кодеина в многокомпонентных смесях. Так авторы [135] предложили способ одновременного определения морфина, кодеина, папаверина и наркотина в некоторых анальгетических медицинских препаратах. Кодеин и морфин ( $0,1 \text{ мг/дм}^3$ ) определяют в водной среде дифференциальным методом, основанном на разнице в интенсивности их флуоресценции в  $0,1 \text{ М NaOH}$  и  $0,05 \text{ М H}_2\text{SO}_4$ .

Известен способ определения до  $0,3 \text{ мг/дм}^3$  кодеина, основанный на тушении люминесценции комплекса тербия (III) с 2-окси-4-гидроксихинолин-3-карбоновой кислотой кодеином фосфатом в водном растворе при pH 8,0 [136].

Проведенный анализ литературы дает основания сделать некоторые обобщения. Наиболее эффективными и распространенными методами определения кодеина в различных объектах являются хроматографические. Причем, в зависимости от целей исследования используются как относительно сложные (ГХ-МС, ВЭЖХ-МС), так и более простые (ТСХ) методы.

Однако, применение хроматографических методов для определения кодеина имеет ряд существенных недостатков:

- тщательная пробоподготовка объектов исследования и использование особо чистых реагентов при проведении анализа (ВЭЖХ);
- в ряде случаев проведение реакций дериватизации с применением дорогостоящих, либо крайне токсичных реактивов (ГЖХ, ГХ-МС);

- использование сложного и дорогостоящего аналитического оборудования.

Хорошим дополнением к хроматографическим методам определения кодеина могут служить некоторые спектрометрические методы анализа, например, СФ, ЛС, СДО. Данные методы сочетают в себе высокую чувствительность, экспрессность с относительной простотой аппаратного оформления, а селективность определений может быть повышена на стадии пробоподготовки.

Анализ литературы показывает, что применение спектрометрических методов для анализа кодеинсодержащих объектов весьма ограничено, а существующие методики недостаточно чувствительны для определения низких содержаний кодеина. Поэтому разработка новых селективных и высокочувствительных молекулярно-спектрометрических методик определения кодеина в различных объектах представляется весьма актуальной задачей.

## ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ, ПРИБОРЫ, РЕАКТИВЫ И ТЕХНИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

### 2.1 Объекты исследования

В качестве основного объекта исследования использовали соль кодеина фосфата с чистотой 98% («Фармалаб», Австралия), поскольку именно в такой форме он входит в состав большинства комбинированных лекарственных препаратов. Исходный раствор кодеина (10 г/дм<sup>3</sup>) готовили растворением точной навески препарата в 96%-ном этаноле.

Для исследования были выбраны следующие кодеинсодержащие лекарственные препараты:

- «Пенталгин Плюс» (ОАО «Фармстандарт-Лексредства», г. Курск, Россия);
- «Пенталгин Н» (ОАО «Фармстандарт-Лексредства», г. Курск, Россия);
- «Седалгин-Нео» («Балканфарма-Дупница АД», г. Дупница, Болгария).

Данные препараты содержат в различных сочетаниях кодеин, метамизол натрия (анальгин), парацетамол, пропифеназон, фенobarбитал, напроксен и кофеин, поэтому являются весьма удобными реальными объектами исследования (табл. 15).

В качестве исследуемых биологических объектов использовали образцы печени, стенки желудка, мочи, предоставленные Красноярским государственным бюджетным учреждением здравоохранения «Красноярское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы» (КГБУЗ «ККБСМЭ»).

Разработанные методики применяли для определения кодеина в реальных образцах печени, стенки желудка, мочи, поступивших в КГБУЗ «ККБСМЭ» от лиц с подозрением на отравление кодеинсодержащими лекарственными препаратами либо опиатами.

Отбор и хранение биологических объектов производился согласно п. 73 Приказа Министерства здравоохранения и социального развития Российской

Федерации № 346н «Об утверждении порядка организации и производства судебно-медицинских экспертиз в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации» от 12 мая 2010г. [55].

Таблица 15 – Состав исследуемых кодеинсодержащих препаратов [24]

Наименование препарата	Состав таблетки препарата	
	Основные компоненты, мг	Вспомогательные вещества
Пенталгин-Н	Метамизол натрия, 300 Напроксен, 100 Кофеин, 50 Фенобарбитал, 10 Кодеина фосфат, 8	Крахмал картофельный, поливинилпирролидон низкомолекулярный (повидон), цитрат натрия, стеарат магния
Пенталгин Плюс	Парацетамол, 300 Пропифеназон, 250 Кофеин, 50 Фенобарбитал, 10 Кодеина фосфат, 8	Диоксид кремния коллоидный (аэросил), карбоксиметилкрахмал натрия, повидон (пласдон к25), микрокристаллическая целлюлоза, додецилсульфат натрия, стеариновая кислота, тальк
Седалгин-Нео	Парацетамол, 300 Метамизол натрия, 150 Кофеин, 50 Фенобарбитал, 15 Кодеина фосфат, 10	Микрокристаллическая целлюлоза, повидон, крахмал пшеничный, кросповидон, метабисульфит натрия, тальк, стеарат магния

Для исследования влияния парацетамола, пропифеназона, анальгина и кофеина на люминесценцию кодеина использовали фармакопейные субстанции

данных веществ. Исходные растворы, содержащие  $10 \text{ г/дм}^3$  каждого вещества, готовили растворением точных навесок в 96%-ном этаноле.

## **2.2 Выделение кодеина из объектов исследования**

### *Выделение кодеина из лекарственных препаратов.*

Для выделения кодеина использовали методику пробоподготовки порошков сложного состава, используемую при исследовании вещественных доказательств на наличие опиатов [33]. Данная методика предусматривает получение «кислых» и «щелочных» экстрактов из лекарственных препаратов.

Таблетку лекарственного препарата тщательно измельчали в фарфоровой чашке, переносили в делительные воронки на 100 мл, растворяли в 10 мл 0,01 М HCl и выдерживали в течение 30 минут при периодическом перемешивании. Далее экстрагировали диэтиловым эфиром (х.ч.) трижды порциями по 10, 5, 5 мл в течение 15 мин. Объединенные «кислые» экстракты из лекарственных препаратов в соответствии со свойствами экстрагирующихся компонентов содержат фенобарбитал и напроксен [8].

Водный остаток подщелачивали 25%-ым водным раствором аммиака (х.ч.) до pH 10 и экстрагировали хлороформом (х.ч.) трижды порциями по 5 мл в течение 15 мин. Органические фазы фильтровали через бумажные фильтры (красная лента) и выпаривали досуха при комнатной температуре. Сухой остаток растворяли в 20 мл 96%-ого этанола. Так называемые «щелочные» экстракты, содержат кодеин, анальгин, пропифеназон, парацетамол и кофеин [8]. «Щелочные» экстракты из лекарственных препаратов использовали для определения кодеина.

### *Выделение кодеина из внутренних органов человека.*

Выделение кодеина из внутренних органов человека проводили по методу, применяемому в практике химико-токсикологического изолирования алкалоидов

и других токсических веществ из биологического материала (модификация метода А.А. Васильевой) [13, 14, 34].

Навески биоматериала по 20 г, измельчали, тщательно перемешивали. К полученным пробам добавляли по 40 мл 0,01 М раствора HCl и выдерживали 2 часа при периодическом перемешивании. Жидкие фазы отделяли центрифугированием (2500 об/мин) в течение 30 мин, а к твердым фазам добавляли по 20 мл 0,01 М HCl и повторяли операции, описанные выше. Объединенные водные растворы трижды экстрагировали диэтиловым эфиром (х.ч.) порциями по 20, 15, 15 мл в течение 15 минут. Эфирные экстракты отбрасывали («кислые» экстракты).

Водные растворы последовательно экстрагировали порциями по 15 мл смесью хлороформ – бутанол (9 : 1) при рН 8, хлороформом при рН 10, диэтиловым эфиром при рН 13. Растворители, используемые для экстракции, имели квалификацию «х.ч.». Органические фазы объединяли, фильтровали через бумажный фильтр («красная лента») и упаривали досуха при комнатной температуре в чашках Петри. «Щелочные» экстракты использовали для определения кодеина.

#### *Выделение кодеина из мочи человека*

Пробоподготовку образцов мочи человека проводили по адаптированной к условиям флуориметрического детектирования кодеина методике в соответствии с рекомендациями [31]. Для устранения мешающего влияния морфина использовали свойство кодеина экстрагироваться из слабо щелочных водных растворов диэтиловым эфиром. При этом морфин образует морфинат и остается в водной фазе. Это свойство используется для разделения алкалоидов в ходе их определения [13].

В пробирку вместимостью 20 мл вносили 10 мл мочи и 1 мл концентрированной HCl (х.ч). Пробирку закрывали пробкой и подвергали кислотному гидролизу на глицериновой бане при температуре 100 °С в течение 30 мин. Раствор в пробирке охлаждали, добавляли 1,7 мл 50%-ого раствора

трихлоруксусной кислоты (х.ч.), перемешивали, выдерживали 10 мин, а затем фильтровали через бумажный фильтр «красная лента». Фильтр промывали 5 мл воды, подкисленной HCl до pH 2. Фильтраты объединяли, переносили в делительную воронку и экстрагировали трижды 5 мл смеси хлороформ - изопропанол (9 : 1) в течение 5 мин. Растворители, используемые для экстракции, имели квалификацию «х.ч.».

Водный слой отделяли, нейтрализовали порошком гидрокарбоната натрия (х.ч.), добавляли 10%-ный раствор аммиака до pH 8,5, экстрагировали дважды 5 мл диэтилового эфира (х.ч.) в течение 5 мин. Органическую фазу отделяли, фильтровали через фильтр «белая лента» с безводным сульфатом натрия, выпаривали до сухого остатка в токе теплого воздуха (60 °C).

## **2.3 Приборы, реактивы и техника эксперимента**

### *Спектролюминесцентные исследования*

Трехмерные спектры люминесценции кодеина, спектры возбуждения люминесценции, люминесценции и интенсивность люминесценции исследовали с использованием спектрофлуориметров «Флюорат-02 Панорама» (ООО «Люмэкс», Россия) и «Cary Eclipse» («Varian», Австралия).

Условия измерений на спектрофлуориметре «Флюорат-02 Панорама»:

- диапазон длин волн возбуждения, нм: 220 – 690 (шаг 10);
- диапазон длин волн регистрации, нм: 220 – 690 (шаг 5);
- чувствительность фотоэлектронного умножителя: низкая при двумерном сканировании проб и средняя при градуировке;
- задержка строба, мкс: 0,05;
- длительность строба, мкс: 3,00;
- область сканирования: стокс, анти-стокс;
- усреднение: 25 вспышек.
- кварцевые кюветы с толщиной поглощающего слоя 10 мм.

Условия измерений на спектрофлуориметре «Cary Eclipse»:

- длина волны возбуждения, нм: 520;
- диапазон длин волн регистрации, нм: 510 – 650 нм (шаг 1);
- спектральная ширина щели монохроматора возбуждения, нм: 10;
- спектральная ширина щели монохроматора люминесценции, нм: 20;
- скорость сканирования, нм/мин: 600;
- чувствительность фотоэлектронного умножителя: средняя, 600 В.
- фильтры на монохроматорах возбуждения и люминесценции

отсутствуют.

Для изучения люминесценции кодеина (парацетамола, пропифеназона, анальгина, кофеина) соответствующие аликвотные части исходных этанольных растворов выпаривали досуха и полученные сухие остатки растворяли в 0,05 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$  или 0,1 М  $\text{HCl}$ . Растворы кислот готовили из фиксаналов.

Для экстракционно-флуориметрического исследования кодеина в виде ионного ассоциата с эозином в качестве исходного раствора эозина использовали стандартный раствор «ГЕМСТАНДАРТ-Э-1» производства ООО «ГЕМСТАНДАРТ» (Россия). Рабочие растворы эозина с меньшими концентрациями готовили разбавлением исходного раствора деионизованной водой.

При определении относительного квантового выхода флуоресценции кодеина стандартный раствор бисульфата хинина готовили растворением в 0,5 М растворе  $\text{H}_2\text{SO}_4$  точной навески дополнительно очищенного перекристаллизацией коммерческого препарата фирмы НАВ (Индия).

Органические растворители (хлороформ, четыреххлористый углерод, толуол, этанол, диэтиловый эфир, изопропанол) предварительно очищали перегонкой.

#### *Спектрофотометрические исследования*

Спектры поглощения и оптическую плотность растворов регистрировали на спектрофотометре «Lambda 35» (Perkin Elmer, США).



Коэффициент диффузного отражения (R) ионного ассоциата кодеина с реактивом Драгендорфа измеряли на спектроколориметре «Пульсар» (ОКБА НПО «Химавтоматика», Узбекистан) при следующих условиях:

- диапазон длин волн, нм: 380-720 (шаг 10);
- калибровка на полное и нулевое отражение: по черному и белому стандартам.

#### *Хроматографические исследования*

ТСХ использовали для отделения кодеина от сопутствующих ему веществ (анальгин, пропифеназон, кофеин, парацетамол, морфин) на стеклянных пластинках с закрепленным слоем силикагеля.

Приготовление пластинок. В фарфоровую ступку вносили 3,25 г силикагеля КСК (150-200 меш), 0,25 г медицинского гипса и 8,5 мл воды. Смесь тщательно растирали и переносили на стеклянную пластинку (11×13 см). Смесь равномерно распределяли на пластинке, высушивали на воздухе. Затем тонкий слой сорбента активировали нагреванием пластинки в сушильном шкафу при 110 °С в течение 1 часа.

Проведение ТСХ-разделения. «Щелочные» экстракты из лекарственных препаратов и внутренних органов человека растворяли в 5 мл хлороформа. На хроматографическую пластинку на линию старта наносили по 0,2 мл исследуемых растворов в виде полосы шириной 2 см, правее наносили каплю раствора «свидетеля». Пластинки подсушивали на воздухе и переносили в хроматографическую камеру, насыщенную парами растворителей (время насыщения не менее 30 минут). Для хроматографирования применяли систему растворителей ацетон-хлороформ-25%-ый раствор аммиака (24:12:1), для приготовления которой использовали растворители квалификации «х.ч.».

После продвижения смеси на 10 см выше линии старта пластинку вынимали из камеры, подсушивали на воздухе до исчезновения запаха растворителей и проявляли только в области «свидетеля» кодеина реактивом Драгендорфа (тетрайодовисмутатом калия  $K[ViI_4]$ ). Данный реактив широко используют для

обнаружения кодеина в тонком слое сорбента при проведении соответствующих экспертиз [13, 14, 34, 48, 60].

Слой пластинки в области исследуемого раствора параллельный проявленному пятну снимали с пластинки, элюировали 5 мл 0,05 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и исследовали.

Приготовление реактива Драгендорфа [13]. В 20 мл азотной кислоты ( $\rho = 1,18$ ) растворяли 8 г основного нитрата висмута (х.ч.) и объединяли с раствором, содержащим 27,2 г иодида калия (х.ч.) в 30 мл воды. Через сутки жидкость фильтровали и разбавляли водой до 100 мл.

ВЭЖХ-УФД использовали в качестве независимого метода определения кодеина во внутренних органах человека. Измерения проводили в судебно-химическом отделении КГБУЗ «ККБСМЭ» на жидкостном микроколоночном хроматографе «Милихром А-02» (ЗАО Институт хроматографии «ЭкоНова», г. Новосибирск, Россия).

Аликвоты исследуемых извлечений упаривали досуха и растворяли в 1 мл 0,1 М раствора хлороводородной кислоты. Хроматографические измерения проводили при следующих условиях:

- металлическая колонка размерами 2×75 мм, заполненная обращено-фазным сорбентом Prontosil 120-5 C18;
- многоволновое УФ-детектирование при длинах волн 220, 230, 240, 250, 260, 280, 300 нм, базовая длина волны – 210 нм;
- элюент А – [4 М раствор перхлората лития в 0,1 М растворе хлорной кислоты]: $\text{H}_2\text{O}$  в соотношении 5:95 (ЗАО Институт хроматографии «ЭкоНова», г. Новосибирск, Россия);
- элюент В – ацетонитрил (сорт 0, ос.ч., «Криохром», г. Санкт-Петербург, Россия);
- режим элюирования – градиентное элюирование (табл. 16);
- скорость потока элюентов – 100 мкл/мин;
- температура термостата колонки – 40 °С;

- объем вводимой пробы – 5 мкл;
- идентификацию пика кодеина осуществляли по абсолютному времени удерживания и спектральным отношениям с использованием базы данных «БД-2003-500» и программного обеспечения «МультиХром», версия 1.5х-Е.

Таблица 16 – Градиент концентрации элюентов в ВЭЖХ-анализе образцов

Шаг	Объем, мкл	Концентрация элюента В, %
Регенерация	800	5
1	0	5
2	4000	100
3	4300	100

ГХ-МС использовали в качестве независимого метода определения кодеина в образцах мочи. Измерения проводили в судебно-химическом отделении КГБУЗ «ККБСМЭ» на газовом хроматографе Agilent Technologies 6890N (США), снабженным автосамплером Agilent Technologies 7683В и квадрупольным Agilent Technologies 5973 Network детектором.

Для уменьшения полярности молекулы кодеина проводили его дериватизацию уксусным ангидридом в присутствии пиридина по методике [99]. Аликвоты исследуемых извлечений в пробирках типа Эппендорф упаривали досуха в токе теплого воздуха. Прибавляли по 200 мкл смеси уксусный ангидрид – пиридин (3:2), выдерживали в термостате в течение 30 мин при 70 °С.

После окончания реакции ацетилирования жидкость выпаривали в токе теплого воздуха, сухой остаток растворяли в 1 мл этилацетата и исследовали методом ГХ/МС в следующих условиях:

- кварцевая капиллярная колонка HP-5MS (сополимер 5%-дифенил-95%-диметилсилоксана) длиной 30 м, с внутренним диаметром 0,25 мм и толщиной пленки неподвижной фазы 0,25 мкм;

- режим программирования температуры колонки: начальная температура термостата колонки 80 °С, экспозиция при начальной температуре 1 мин, далее нагрев до температуры 200 °С со скоростью 40 °С/мин и до температуры 300 °С со скоростью 12,5 °С/мин, экспозиция 10 мин при конечной температуре;

- газ-носитель: гелий (марка А); скорость потока газа-носителя 1,2 мл/мин (режим постоянного потока);

- температура инжектора – 250 °С;

- ввод пробы с помощью автосамплера в режиме без деления потока (splitless); объем пробы – 1 мкл;

- ионизация электронным ударом (70 эВ);

- время задержки растворителя 3,5 мин;

- ГХ/МС анализ исследуемых растворов проводили в режиме селективного ионного мониторинга (SIM) по характеристическим ионам ацетилированного производного кодеина: 341, 282, 229, 204;

- идентификацию масс-спектров проводили с использованием библиотечных данных MPWTOX7 и Wiley7.

При постановке эксперимента также использовали следующее *вспомогательное оборудование и расходные материалы*:

- центрифуга «ОС-6М» (ОАО «ТНК «Дастан», Кыргызстан);

- перемешивающее устройство «ПЭ-0034» (ООО «Экротхим», г. Санкт-Петербург, Россия);

- набор дозаторов переменного объема 10-100 мкл и 100-1000 мкл с одноразовыми наконечниками (Thermo Fisher Scientific, USA);

- иономер Seveneasy («Mettler Toledo», Испания);

- аналитические весы, дискретность 0,0001 г («Mettler Toledo», Испания);

- бумага индикаторная универсальная рН 0-12 («Lachema», Чехия);

- бумажные фильтры («красная лента»);

- хроматографические камеры;

- пластинки для тонкослойной хроматографии Sorbfil ПТСХ-П-А, размер 10×15 см (ООО «ИМИД», г. Краснодар, Россия);
- система очистки воды Thermo Scientific Barnstead E-Pure D4642-33 (Thermo Fisher Scientific, USA).

## ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КОДЕИНА

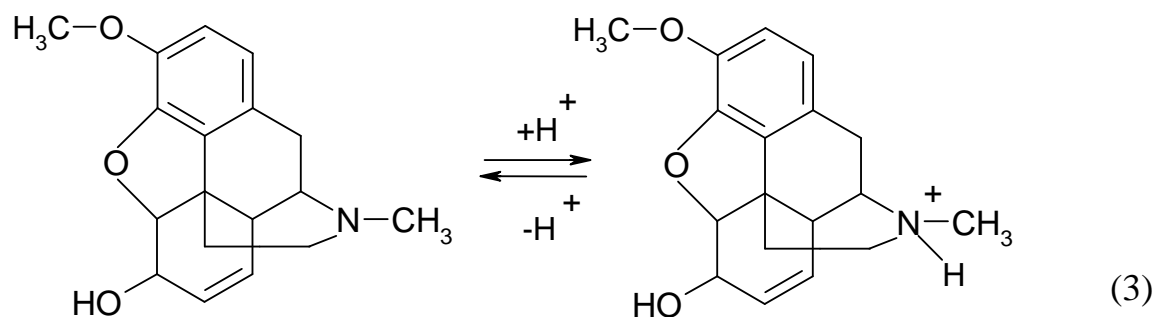
Для характеристики электронных переходов, определяющих спектроскопические свойства кодеина, воспользуемся известной классификацией Каши по молекулярным орбиталям (МО). Молекула кодеина содержит гетероатом азота с неподеленной парой электронов, локализованной на этом атоме. Поэтому можно предположить, что при возбуждении молекулы кодеина наиболее вероятными будут низкоэнергетические  $n \rightarrow \pi^*$  переходы. Вероятность такого перехода мала ( $\epsilon_{\text{макс}} \sim 10^{-3}$ ), а время жизни возбужденного синглетного состояния ( $1/\tau \sim 10^4 \epsilon_{\text{макс}}$ ) будет иметь порядок  $10^{-7} - 10^{-5}$  с. Последнее приводит к увеличению вероятности безызлучательной дезактивации возбужденного синглетного состояния. Кроме того, известно, что разница в энергиях  $S_1 - T_1$  для  $n, \pi^*$  - состояния в 2 – 4 раза меньше, чем для  $\pi, \pi^*$  - состояния, что облегчает  $S_1 \rightarrow T_1$  переход, приводящий к фосфоресценции. Таким образом, соединения, содержащие  $n$ -электроны, слабо или вовсе не флуоресцируют, но при определенных условиях интенсивно фосфоресцируют.

### 3.1 Люминесценция кодеина в водных растворах

#### 3.1.1 Влияние pH раствора и природы кислоты

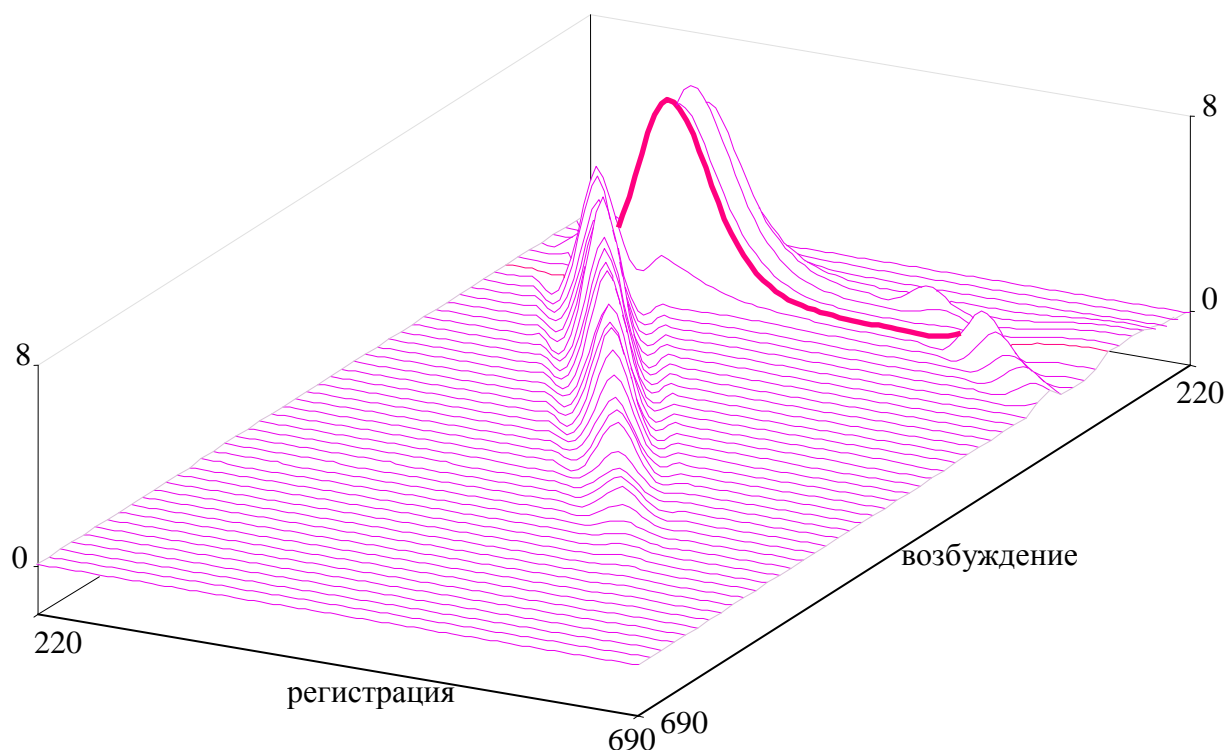
Для изучения люминесценции кодеина использовали 0,05 М раствор серной и 0,1 М раствор хлороводородной кислот.

Мы предполагали, что в результате присоединения протона к атому азота в третичной N-метильной группе будет изменяться конформация и энергетическое состояние молекулы кодеина за счет связывания неподеленной пары электронов (3). В результате становятся возможными  $\pi, \pi^*$ -электронные переходы, обуславливающие люминесценцию (флуоресценцию) его растворов.



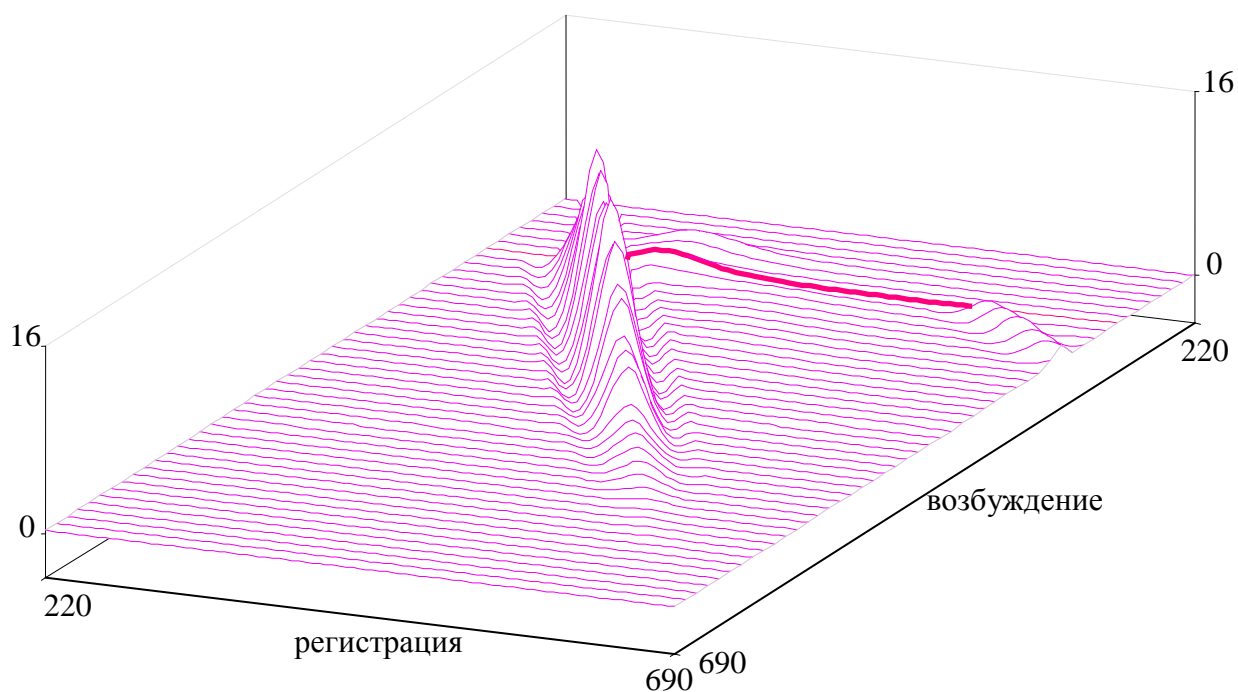
Для установления люминесцентных параметров (длины волн возбуждения люминесценции,  $\lambda_{\text{возб}}$ , люминесценции,  $\lambda_{\text{люм}}$ ) были сняты трехмерные спектры свечения растворов кодеина в 0,05 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и 0,1 М  $\text{HCl}$  (рис. 9, 10).

Максимумы полос возбуждения и люминесценции находятся при 300 и 345 нм соответственно.



$C = 1 \text{ г/дм}^3; 0,05 \text{ М } \text{H}_2\text{SO}_4$

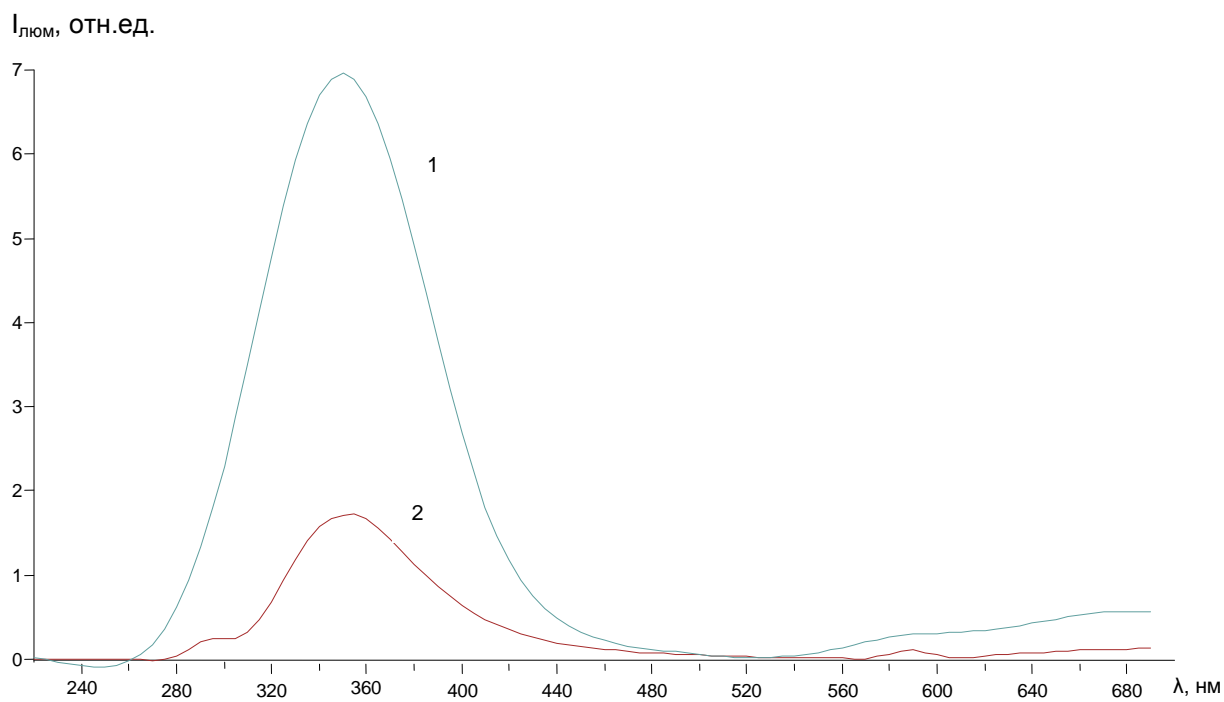
Рисунок 9 – Трехмерный спектр люминесценции раствора кодеина



$$C = 1 \text{ г/дм}^3; 0,1 \text{ М НСІ}$$

Рисунок 10 – Трехмерный спектр люминесценции раствора кодеина

В этих условиях зафиксированы линейные спектры люминесценции растворов кодеина (рис. 11).



$$C = 1 \text{ г/дм}^3, 0,05 \text{ М Н}_2\text{SO}_4 \text{ (1) и } 0,1 \text{ М НСІ (2)}$$

Рисунок 11 – Спектры люминесценции растворов кодеина ( $\lambda_{\text{возб}} = 300 \text{ нм}$ )

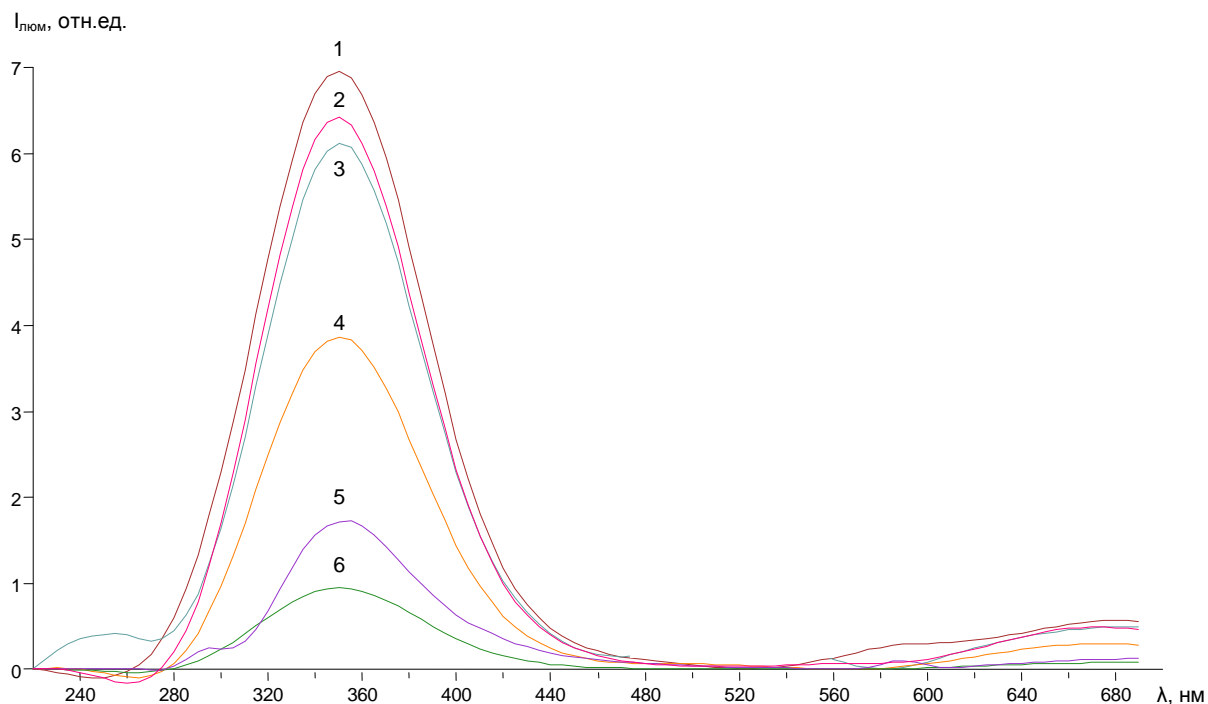


Интенсивность люминесценции кодеина в растворе  $H_2SO_4$  примерно в 4 раза выше, чем при использовании  $HCl$ . Данный факт можно предположительно объяснить эффектом «тяжелого атома» хлорид-ионов, приводящий к увеличению вероятности безызлучательной  $S_1 \rightarrow T_1$  интеркомбинационной конверсии и уменьшению интенсивности флуоресценции. Поэтому в дальнейших исследованиях использовали  $H_2SO_4$ . Правомерность такого выбора подтверждают данные табл. 17.

Таблица 17 - Результаты двумерного сканирования растворов кодеина (1 г/дм<sup>3</sup>)

№ опыта	Длина волны возбуждения $\lambda_{\text{возб}}$ , нм	Длина волны регистрации $\lambda_{\text{люм}}$ , нм	Интенсивность люминесценции $I_{\text{люм}}$ , отн. ед.	Средняя интенсивность люминесценции $I_{\text{люм}}$ , отн. ед.
0,05 М раствор $H_2SO_4$				
1	300	345	6,90	6,88
2			6,87	
3			6,91	
4			6,85	
5			6,88	
0,1 М раствор $HCl$				
1	300	345	1,69	1,61
2			1,55	
3			1,63	
4			1,51	
5			1,68	

Была изучена зависимость люминесценции кодеина от рН в среде  $H_2SO_4$ . На рис. 12 представлены соответствующие спектры, а в табл. 18 – значения интенсивности свечения кодеина в максимумах полос свечения.



рН = 1 (1), 4 (2), 7 (3), 9 (4), 11 (5) и 13 (6);  $C = 1 \text{ г/дм}^3$

Рисунок 12 – Спектры люминесценции растворов кодеина в  $H_2SO_4$  ( $\lambda_{\text{возб}} = 300 \text{ нм}$ )

Таблица 18 – Влияние рН среды на интенсивность люминесценции растворов кодеина в  $H_2SO_4$  ( $1 \text{ г/дм}^3$ )

рН	Длина волны регистрации $\lambda_{\text{люм}}$ , нм	Интенсивность люминесценции $I_{\text{люм}}$ , отн. ед.			Средняя интенсивность люминесценции, $\bar{I}_{\text{люм}}$ , отн. ед.
		1	2	3	
1	345	6,90	6,87	6,91	6,89
4	345	6,25	6,17	6,31	6,24

7	345	6,02	5,94	5,95	5,97
9	340	3,71	3,78	3,69	3,73
11	340	1,62	1,54	1,59	1,58
13	340	0,89	0,84	0,82	0,85

Из полученных результатов видно, что с изменением рН среды положение максимума люминесценции ( $\lambda_{\text{люм}} = 345$  нм) остается неизменным до рН = 7, в щелочной среде наблюдается небольшой сдвиг максимума в коротковолновую область ( $\lambda_{\text{люм}} = 340$  нм).

Интенсивность свечения растворов кодеина уменьшается при увеличении рН среды (рис. 13). Это можно объяснить образованием его неионизированной формы, в которой затруднен  $\pi, \pi^*$ -электронный переход, однако повышается вероятность  $n, \pi^*$ -перехода.

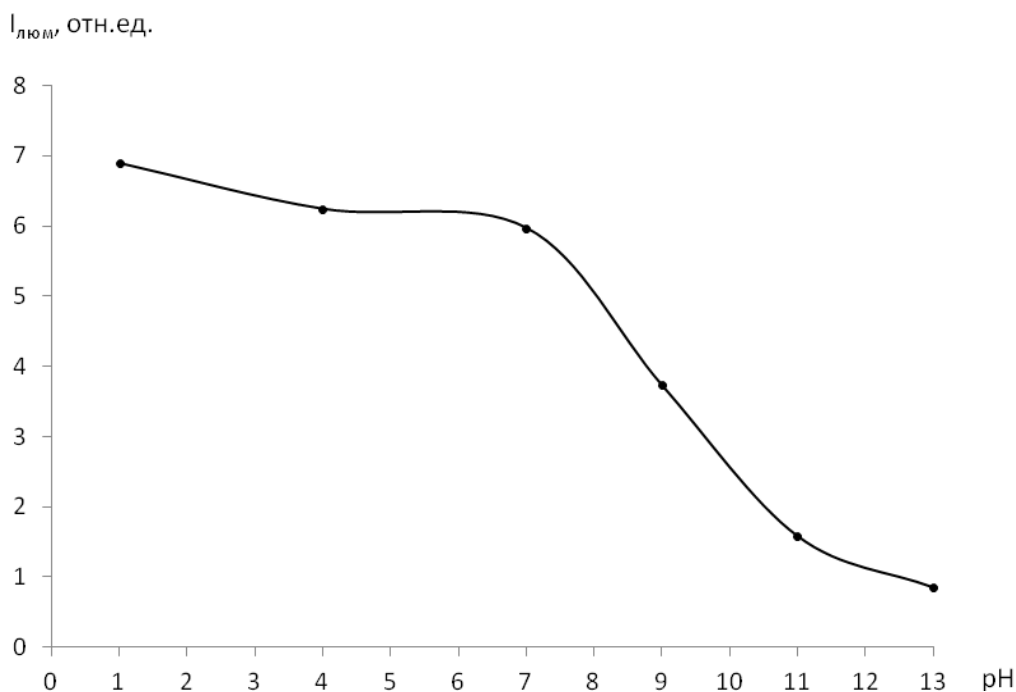


Рисунок 13 – Зависимость интенсивности люминесценции растворов кодеина в  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $1 \text{ г/дм}^3$ ) от рН среды ( $\lambda_{\text{возб}} = 300$  нм,  $\lambda_{\text{люм}} = 345$  нм)

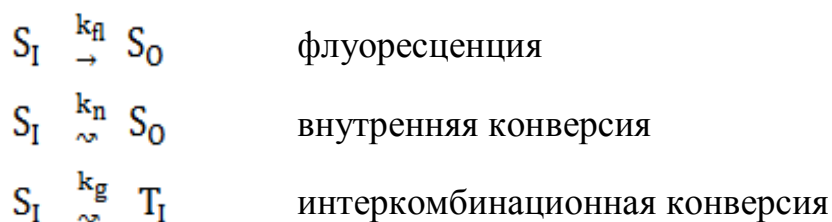
Таким образом, оптимальной средой проявления люминесцентных свойств кодеина является 0,05 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $\lambda_{\text{возб}} = 300$  нм;  $\lambda_{\text{люм}} = 345$  нм).

### 3.1.2 Определение относительного квантового выхода флуоресценции

Способность вещества к люминесценции в данной среде характеризуется величиной его квантового выхода. Квантовый выход флуоресценции ( $\varphi_{\text{fl}}$ ) непосредственно связан с вероятностями излучательных и безызлучательных электронных переходов. В отсутствии тушения флуоресценции посторонними примесями выражение для  $\varphi_{\text{fl}}$  можно записать в виде уравнения (4):

$$\varphi_{\text{fl}} = \frac{k_{\text{fl}}}{k_{\text{fl}} + k_{\text{n}} + k_{\text{g}}}, \quad (4)$$

где  $k_{\text{fl}}$ ,  $k_{\text{n}}$ ,  $k_{\text{g}}$  – константы скоростей излучательных (прямые линии) и безызлучательных (волнистые линии) электронных переходов [133]:



Из уравнения (4) следует, что для интенсивно флуоресцирующих веществ  $\varphi_{\text{fl}}$  близок к единице.

Определение относительного квантового выхода флуоресценции кодеина проводили по методике [134] с использованием в качестве стандартного флуоресцирующего вещества хинина бисульфата в 0,5 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$  с известным квантовым выходом флуоресценции ( $\varphi_{\text{фл}} = 0,55$ ). С этой целью готовили разбавленные растворы ( $\sim 5 \cdot 10^{-6}$  М) кодеина в 0,05 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и хинина бисульфата в 0,5 М в  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Оптические плотности ( $l = 1$  см) полученных растворов в

максимумах поглощения при 286 нм (кодеин) и 350 нм (хинина бисульфат) не превышали 0,01. Для получения достоверных значений оптических плотностей растворов использовали кварцевые кюветы с  $l = 10$  см. Оптимальные длины волн возбуждения флуоресценции ( $\lambda_{\text{возб}} = 300$  нм) и флуоресценции ( $\lambda_{\text{фл}} = 345$  нм) растворов кодеина опубликованы в работе [137], а хинина бисульфата ( $\lambda_{\text{возб}} = 366$  нм,  $\lambda_{\text{фл}} = 450$  нм) в [134]. Спектры флуоресценции растворов кодеина и хинина бисульфата регистрировали при длинах волн возбуждающего света 300 и 366 нм соответственно. С помощью компьютерной программы обработки находили площади под спектрами флуоресценции и рассчитывали относительный квантовый выход флуоресценции кодеина ( $\phi_{\text{фл}}$ ) по формуле (5):

$$\phi_{\text{фл}} = \frac{S_2 \times A_1}{S_1 \times A_2} \times 0,55, \quad (5)$$

где  $S_1, S_2$  – площади под спектрами флуоресценции, а  $A_1, A_2$  – оптические плотности растворов хинина бисульфата и кодеина соответственно.

Рассчитанный относительный квантовый выход флуоресценции кодеина составил 0,01.

### 3.1.3 Условия люминесцентного определения кодеина

#### *Прямое люминесцентное определение кодеина в растворах*

Относительно невысокий квантовый выход флуоресценции кодеина ( $\phi_{\text{фл}} = 0,01$ ) свидетельствует о том, что прямые люминесцентные определения возможны при значительных содержаниях последнего в растворах. Для выяснения концентрационного диапазона в найденных оптимальных условиях (раздел 3.1.1) был построен градуировочный график зависимости интенсивности свечения кодеина от его концентрации. Для его построения готовили градуировочные растворы кодеина в 0,05 М растворе  $\text{H}_2\text{SO}_4$ : в отдельные стеклянные флаконы вместимостью 15 мл помещали 25, 50, 100, 250, 500, 750 и

1000 мкл исходного раствора кодеина фосфата в 96%-ном этаноле ( $10 \text{ г/дм}^3$ ), упаривали досуха и растворяли сухие остатки в 10 мл 0,05 М раствора  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Измеряли интенсивность люминесценции каждого раствора при  $\lambda_{\text{возб}} = 300 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{люм}} = 345 \text{ нм}$ . На основании полученных данных строили градуировочный график зависимости  $\Delta I = f(C)$ , где -  $\Delta I$  разность интенсивности свечения градуировочных растворов и фонового раствора;  $C$  – концентрация кодеина в градуировочных растворах (рис. 14).

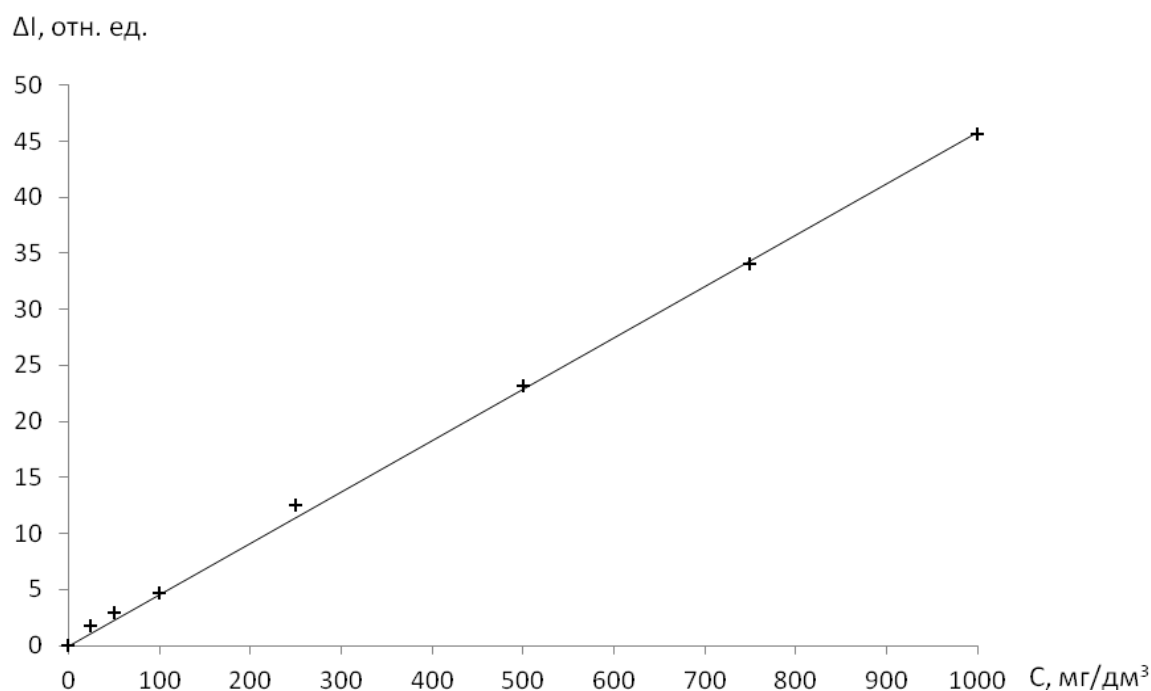


Рисунок 14 – Градуировочный график люминесцентного определения кодеина в водных растворах

Уравнение зависимости аналитического сигнала от концентрации кодеина имеет вид  $y = 0,046x$ , а коэффициент корреляции равен 0,9989. Предел обнаружения кодеина, рассчитанный по 3S-критерию, составил  $3 \text{ мг/дм}^3$  ( $n = 3$ ,  $P = 0,95$ ), а линейный диапазон определяемых содержаний  $25 - 1000 \text{ мг/дм}^3$ . Воспроизводимость результатов измерений  $S_r$  в указанном диапазоне содержаний кодеина не превышает 0,05 (рис. 15).

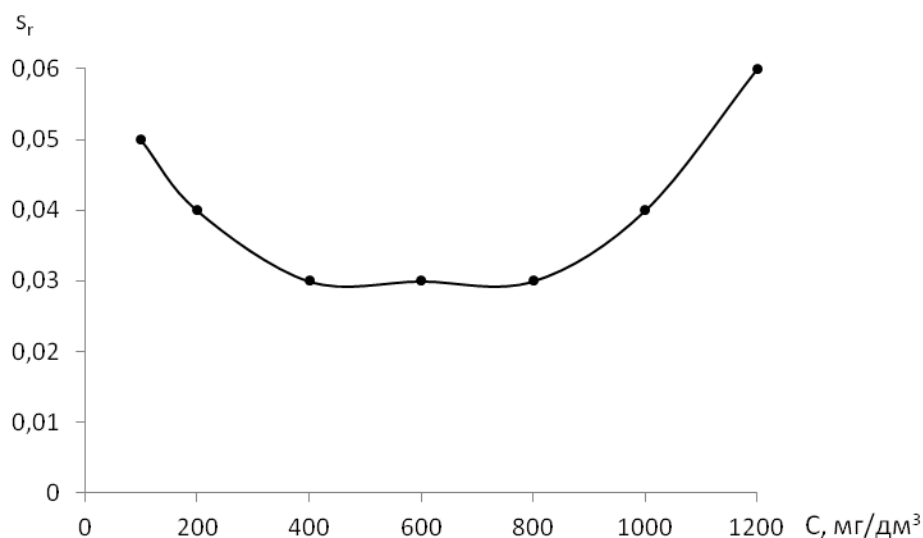


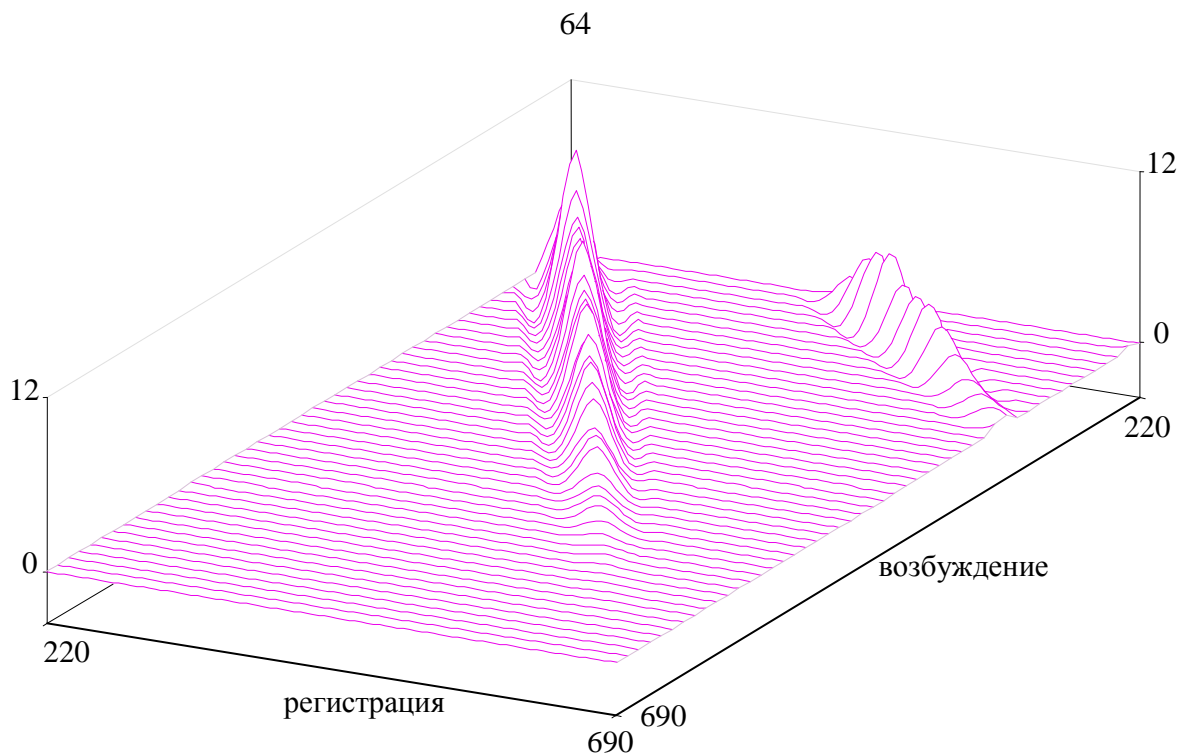
Рисунок 15 – Зависимость относительного стандартного отклонения ( $S_r$ ) от концентрации при люминесцентном определении кодеина в водных растворах

Таким образом, несмотря на относительно невысокий квантовый выход флуоресценции, прямые люминесцентные кодеина вполне возможны, например, при исследовании лекарственных препаратов или внутренних органов человека.

Одними из исследуемых нами объектов являлись лекарственные препараты. В их состав, кроме кодеина, входят кофеин, парацетамол, анальгин, пропифеназон. Поэтому необходимо было оценить влияние данных веществ на люминесценцию кодеина.

Были изучены трехмерные спектры люминесценции индивидуальных растворов парацетамола, пропифеназона, анальгина и кофеина, приготовленных из чистых веществ, путем растворения их точных навесок в 0,05 М  $H_2SO_4$ .

Анализ трехмерных спектров люминесценции парацетамола, анальгина, кофеина и пропифеназона показал, что исследуемые вещества люминесцируют на уровне фона, а наблюдаемые пики обусловлены в основном рассеянным излучением («блики импульсной лампы» [138]). В качестве примера, на рис. 16 приведен трехмерный спектр люминесценции анальгина.



$$C = 1 \text{ г/дм}^3; 0,05 \text{ М Н}_2\text{SO}_4$$

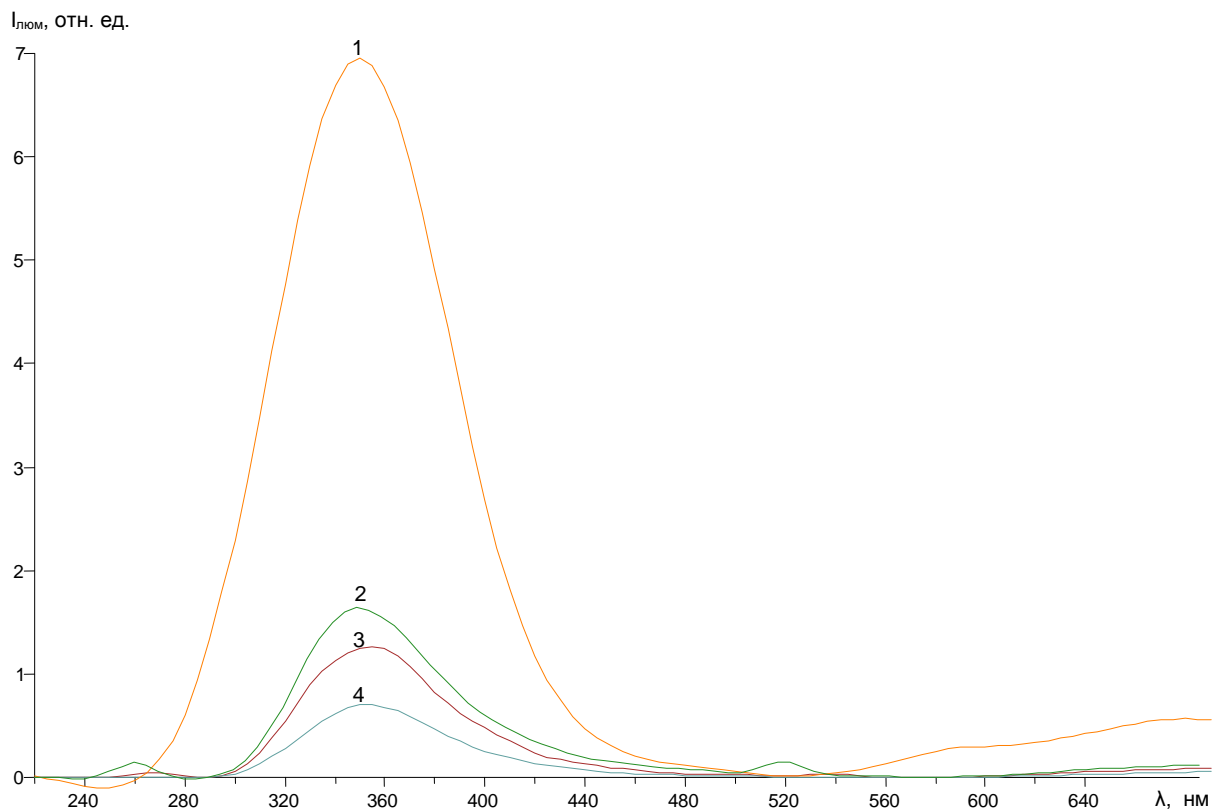
Рисунок 16 – Трехмерный спектр люминесценции раствора анальгина

Изучено влияние примесей парацетамола, анальгина, пропифеназона и кофеина на люминесценцию кодеина при таких соотношениях этих веществ, которые имеют место в лекарственных препаратах, а именно:

- анальгин : кофеин : кодеин = 37,5 : 6,25 : 1 («Пенталгин-Н»);
- парацетамол : пропифеназон: кофеин : кодеин = 37,5 : 31,25 : 6,25 : 1 («Пенталгин Плюс»);
- парацетамол : анальгин : кофеин : кодеин = 30 : 15 : 5 : 1 («Седальгин-Нео»).

Полученные спектры люминесценции представлены на рис. 17.





кодеин (1); анальгин : кофеин : кодеин = 37,5 : 6,25 : 1(2); парацетамол : пропифеназон: кофеин : кодеин = 37,5 : 31,25 : 6,25 : 1 (3); парацетамол : анальгин : кофеин : кодеин = 30 : 15 : 5 (4); 0,05 М Н<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Рисунок 17 – Спектры люминесценции модельных кодеинсодержащих смесей ( $\lambda_{\text{возб}} = 300$  нм,  $\lambda_{\text{люм}} = 345$  нм)

В спектрах люминесценции модельных смесей кодеина, кофеина, парацетамола и анальгина наблюдается лишь свечение кодеина, что определяет возможность его идентификации в присутствии сопутствующих компонентов. Вместе с тем, наблюдается уменьшение интенсивности свечения кодеина, возможно, за счет процессов перепоглощения энергии.

Таким образом, для корректного люминесцентного определения кодеина в лекарственных препаратах необходимо проводить предварительное разделение компонентов, например, ТСХ-разделение [74-76].

Полученные результаты были использованы для люминесцентного определения микрограммовых содержаний кодеина в исследуемых объектах.

*Экстракционно-флуориметрическое определение кодеина в растворах в виде ионного ассоциата с эозином*

Необходимость определения низких содержаний кодеина возникает, в частности, при его определении в биологических жидкостях человека (кровь, моча, слюна, потовые выделения) в рамках проведения соответствующих экспертиз: выявления морфина и его производных, «кодеиновой» зависимости. Концентрации кодеина в биологических жидкостях человека при проведении скрининговых исследований, подтверждающих его наличие при злоупотреблениях, составляют порядка  $n \cdot 10^2$  мкг/дм<sup>3</sup>. Как указывалось, в предыдущем разделе, прямое флуориметрическое определение таких содержаний кодеина в водных растворах сдерживается низкой интенсивностью его свечения ( $\Phi_{\text{фл}} = 0,01$ ).

Для повышения чувствительности люминесцентных измерений в аналитической практике используют реакции образования ионных ассоциатов с люминесцентными реагентами, характеризующимися высокими выходами свечения. Требуемая селективность, как правило, обеспечивается экстракцией образующихся ассоциатов в органическую фазу.

Молекула кодеина содержит  $=\text{NCH}_3$  группу с  $pK_a = 8,2$  [8], что обуславливает его нахождение в нейтральных и кислых водных растворах в виде слабо флуоресцирующего положительно заряженного иона. Последнее, в свою очередь, способствует образованию ионных ассоциатов катионов кодеина с отрицательно заряженными противоионами неорганической и органической природы.

Для флуориметрических определений низких содержаний кодеина в виде ионных ассоциатов интерес, прежде всего, представляют флуоресцирующие реагенты в анионной форме с высокими квантовыми выходами свечения. К ним, в частности, относятся триарилметановые (ксантоновые) красители ряда флуоресцеина. Такой универсальной популярностью и самим своим названием

флуоресцеин обязан своей яркой зеленой флуоресценции в растворах в полностью диссоциированном состоянии и высоким квантовым выходом ( $\phi_{\text{фл}} = 0,85$ ) [134].

Исходя из строения молекул (рис. 18) диссоциация красителей ряда флуоресцеина в растворах протекает в три ступени:

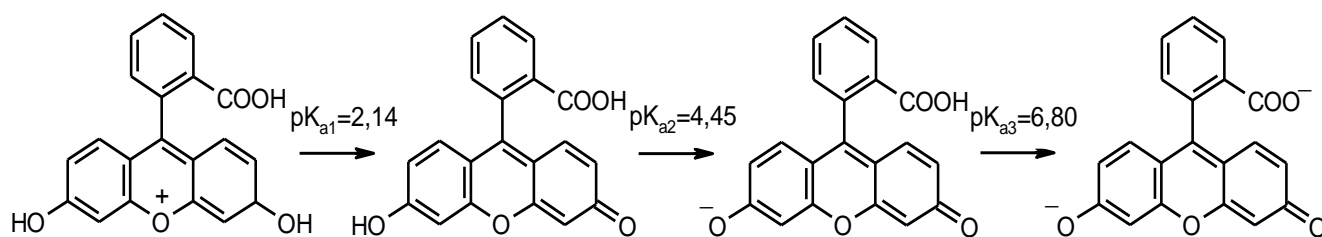


Рисунок 18 – Формы нахождения флуоресцеина в водных растворах и значения  $\text{pK}_a$  его ионизируемых групп

Для водных растворов флуоресцеина значения  $\text{pK}_a$  равновесий (6–8) составляют 2,14; 4,45; 6,80 соответственно [139]. Таким образом, согласно значению  $\text{pK}_{\text{a}3} = 6,80$ , полностью диссоциированная форма флуоресцеина  $\text{R}^{2-}$  существует в водных растворах при  $\text{pH} > 7$ .

В данном случае более привлекательным выглядит галогенпроизводное флуоресцеина – эозин, для которого значения  $\text{pK}_a$  равновесий (6–8) составляют – 2,0; 2,81; 3,75 соответственно [139]. Это определяет нахождение флуоресцирующей формы  $\text{R}^{2-}$  эозина в кислых растворах, что является более предпочтительным для его использования в качестве противоиона в ионном ассоциате с кодеином (рис. 19), несмотря на меньшее по сравнению с флуоресцеином значение квантового выхода флуоресценции ( $\phi_{\text{фл}} = 0,23$ ) [134].

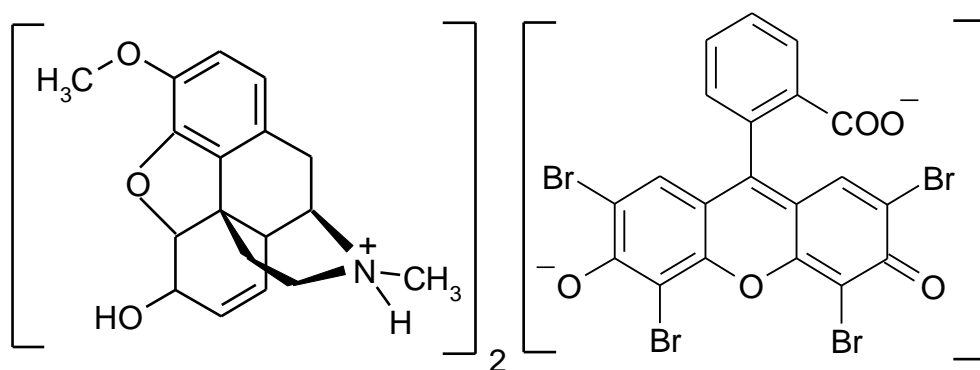


Рисунок 19 – Ионный ассоциат кодеина с эозином

Из ряда факторов, влияющих на образование и флуоресценцию ионного ассоциата кодеина с эозином, определяющими являются рН раствора, концентрации реагирующих компонентов и природа органического растворителя.

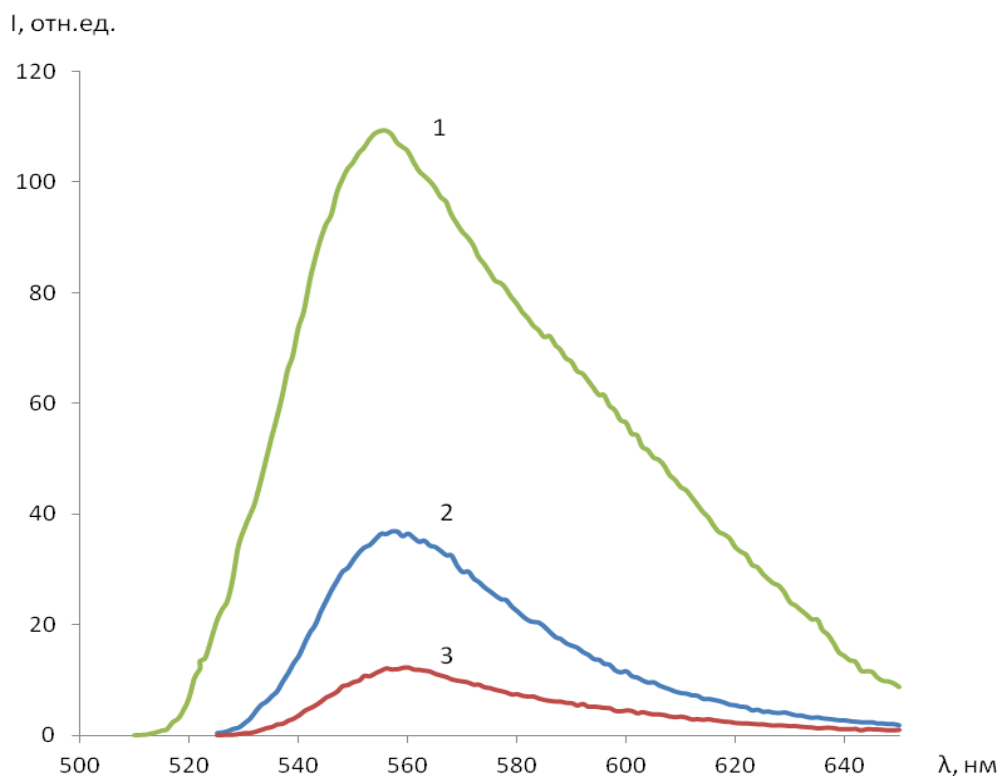
Для изучения условий экстракции ионного ассоциата были выбраны три органических растворителя: четыреххлористый углерод, хлороформ, толуол.

Для экстракционно-флуориметрического определения кодеина в виде ионного ассоциата с эозином в три делительные воронки вносили по 5 мл раствора кодеина ( $0,03 \text{ мг/дм}^3$ ), прибавляли по 1 мл фосфатной буферной смеси ( $\text{pH} = 7$ ), 4 мл  $0,03 \text{ мг/дм}^3$  водного раствора эозина и 10 мл толуола, хлороформа, четыреххлористого углерода соответственно. Содержимое делительной воронки взбалтывали в течение 15 мин. По истечении времени от водного слоя отделяли органический экстракт, и добавляли новую порцию фосфатной буферной смеси, для извлечения оставшегося эозина. Затем снимали спектры люминесценции на сканирующем спектрофлуориметре «CaryEclipse».

На рис. 20 представлены спектры люминесценции ионного ассоциата кодеина и эозина с использованием разных органических растворителей.

Установлено, что интенсивность флуоресценции ионного ассоциата кодеина с эозином в толуоле в 10 раз выше интенсивности его свечения в четыреххлористом углероде и в 3 раза – в хлороформе. Из полученных спектров

люминесценции можно сделать вывод, толуол, как растворитель, лучше всего подходит для образования ионного ассоциата.



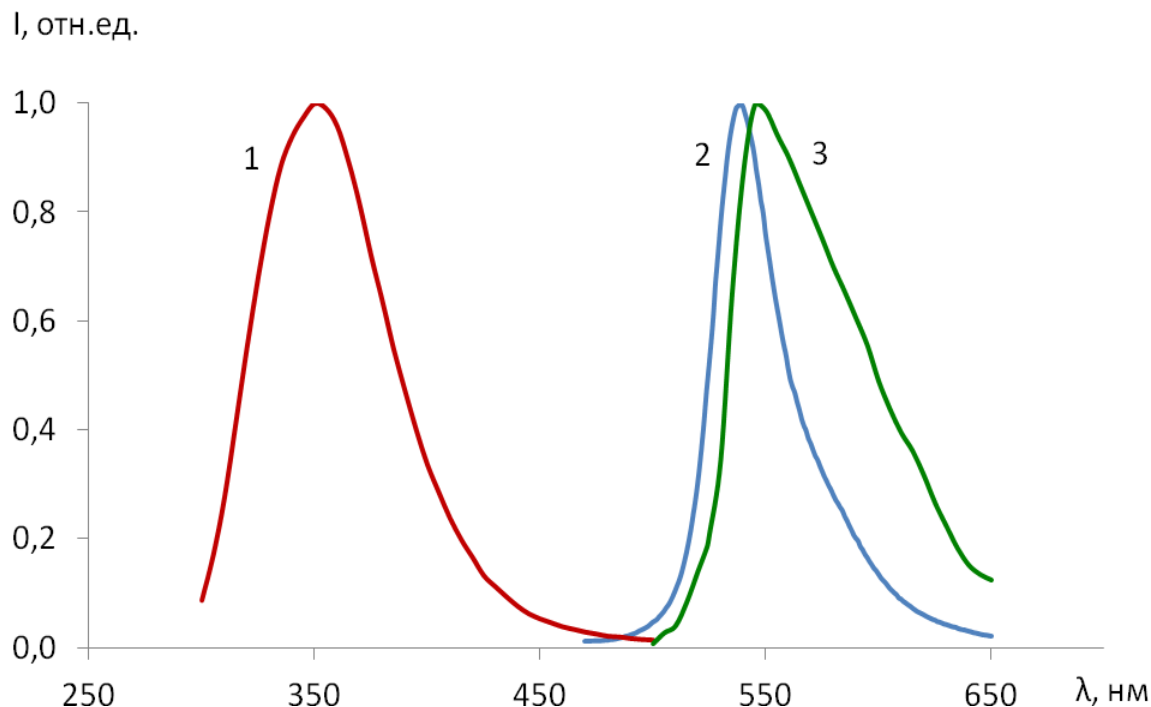
1 – в толуоле ( $\lambda_{\text{возб}} = 520$  нм,  $\lambda_{\text{люм}} = 550$  нм);

2 – в хлороформе ( $\lambda_{\text{возб}} = 520$  нм,  $\lambda_{\text{люм}} = 560$  нм);

3 – в четыреххлористом углероде ( $\lambda_{\text{возб}} = 520$  нм,  $\lambda_{\text{люм}} = 560$  нм)

Рисунок 20 – Спектры люминесценции ионного ассоциата кодеина с эозином в разных органических растворителях

На рис. 21 представлены нормированные спектры флуоресценции водных растворов кодеина, эозина и ионного ассоциата кодеина с эозином в толуоле. Наблюдается bathochromic shift максимума спектра флуоресценции ионного ассоциата кодеина с эозином в толуоле до 550 нм по сравнению с максимумом спектра флуоресценции эозина в водном растворе ( $\lambda_{\text{макс}} = 540$  нм). Интенсивность флуоресценции экстракта сохраняется в течение 24 часов.



1 – водный раствор кодеина ( $\lambda_{\text{в}} = 300$  нм);

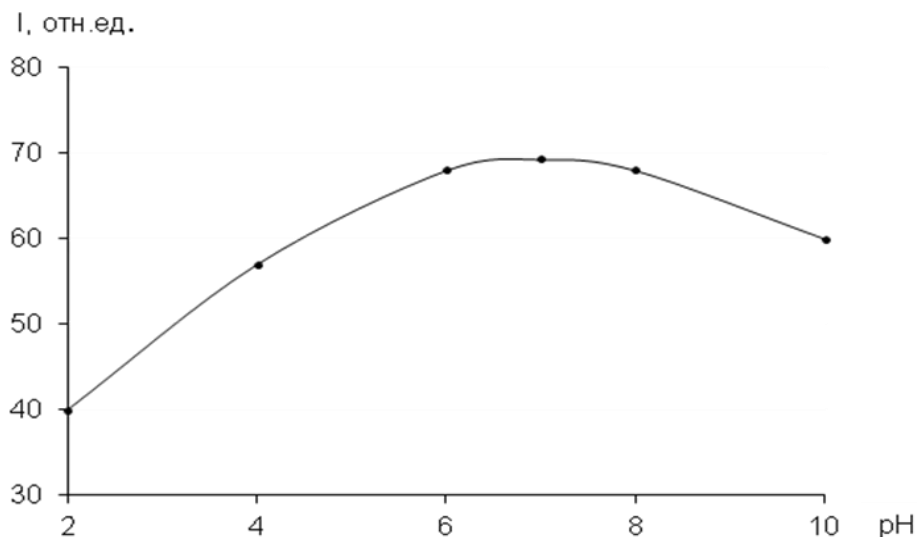
2 – водный раствор эозина ( $\lambda_{\text{в}} = 520$  нм);

3 - ионный ассоциат кодеина с эозином в толуоле ( $\lambda_{\text{в}} = 520$  нм)

Рисунок 21 – Нормированные спектры флуоресценции кодеина

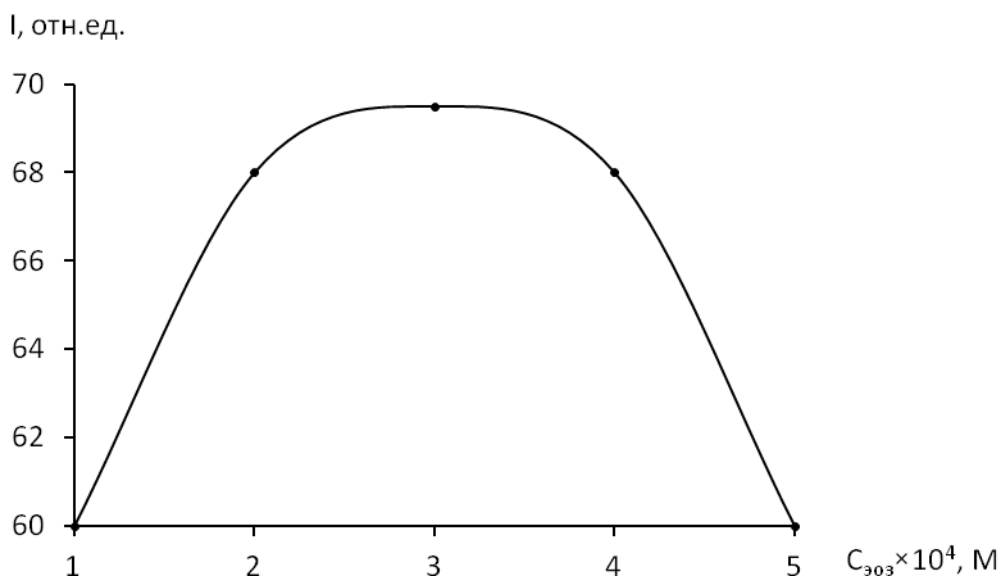
Максимальная интенсивность флуоресценции ионного ассоциата наблюдается при его экстракции толуолом из водных растворов с рН 6 - 8 (рис. 22), что соответствует диапазону рН нахождения положительно заряженного иона кодеина и отрицательно заряженной формы ( $R^{2-}$ ) эозина.

Для образования ионного ассоциата при микро- и нанограммовых содержаниях кодеина в водных растворах достаточно 2-8 кратных избытков эозина. Превышение границ отношений концентраций приводит к уменьшению интенсивности свечения за счет возрастания фонового сигнала (рис. 23).



$$C_{\text{код}} = C_{\text{эоз}} = 0,03 \text{ мг/дм}^3, \lambda_{\text{в}} = 520 \text{ нм}$$

Рисунок 22 – Зависимость интенсивности флуоресценции ионного ассоциата кодеина с эозином в толуоле от рН водного раствора



$$C_{\text{код}} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}, \text{pH} = 7, \lambda_{\text{в}} = 520 \text{ нм}$$

Рисунок 23 – Зависимость интенсивности флуоресценции ионного ассоциата кодеина от концентрации эозина в водном растворе

Для построения градуировочного графика (рис. 24) из исходного раствора кодеина фосфата в 96%-ном этаноле ( $10 \text{ г/дм}^3$ ) путем разбавления готовили

раствор с концентрацией  $1 \text{ мг/дм}^3$  и далее поступали как описано выше при подготовке градуировочных растворов. В ряд делительных воронок вносили от 20 до 500 нг кодеина в 5 мл раствора, по 1 мл фосфатной буферной смеси ( $\text{pH} = 7$ ), 4 мл  $0,1 \text{ мкг/мл}$  водного раствора эозина и 10 мл толуола. Содержимое делительных воронок перемешивали в течение 10 мин. После разделения фаз водную фазу отбрасывали. Для удаления эозина, перешедшего в органическую фазу, в делительные воронки вводили по 10 мл фосфатной буферной смеси и встряхивали 5 мин. После разделения фаз аликвоты (2 мл) органических фаз переносили в кварцевые кюветы и измеряли интенсивность флуоресценции градуировочных растворов и фона при  $\lambda_{\text{возб}} = 520 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{люм}} = 550 \text{ нм}$ .

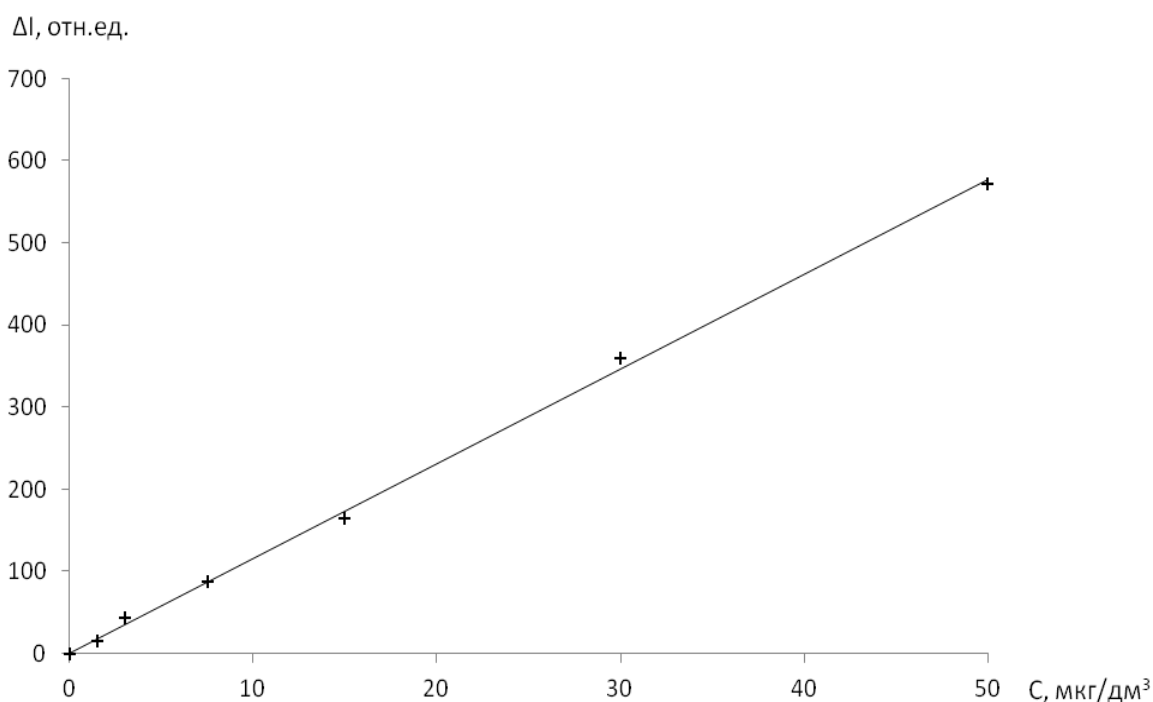


Рисунок 24 – Градуировочный график экстракционно-флуориметрического определения кодеина в водных растворах

Уравнение зависимости аналитического сигнала от концентрации кодеина имеет вид  $y = 11,547x$ , а коэффициент корреляции составляет 0,9987. Предел обнаружения кодеина, рассчитанный по  $3S$ -критерию, составил  $0,4 \text{ мкг/дм}^3$ , а линейный диапазон определяемых содержаний  $1,5 - 50 \text{ мкг/дм}^3$ . В указанном



диапазоне содержаний кодеина относительное стандартное отклонение  $S_r$  не превышает 0,06 (рис. 25).

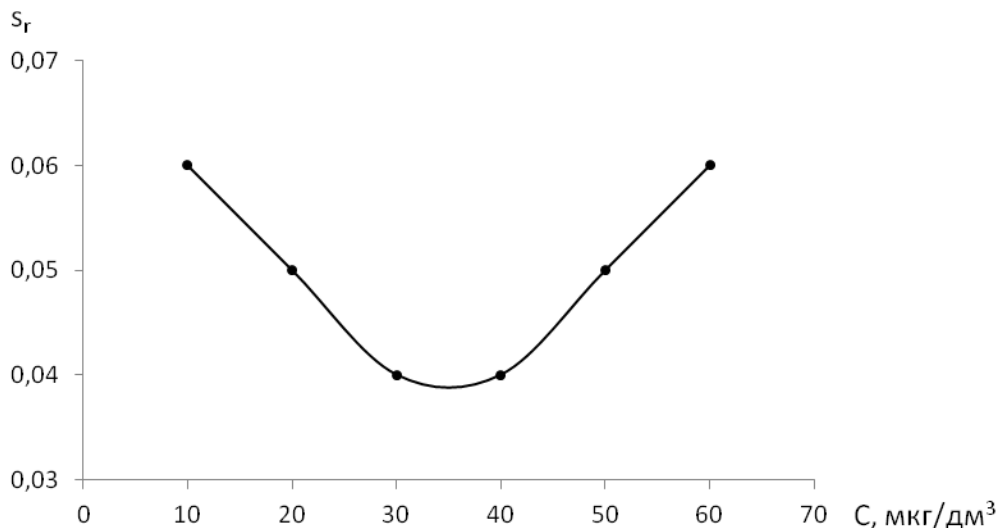


Рисунок 25 – Зависимость относительного стандартного отклонения ( $S_r$ ) от концентрации при экстракционно-флуориметрическом определении кодеина в водных растворах

Полученные результаты были использованы для разработки экстракционно-флуориметрической методики определения кодеина в моче человека.

### 3.2 Твердофазная спектрометрия кодеина

Из известных методов твердофазной спектрометрии (ЛС, СДО, СФ) наиболее привлекательным в данном случае является метод СДО. Привходящим фактором для этого предположения является весьма широкое использование предварительного ТСХ-разделения мешающих компонентов кодеинсодержащих препаратов с последующим элюированием хроматографической зоны кодеина в раствор [74-76]. Были определены условия для определения кодеина методом СДО непосредственно в фазе сорбента.

В СДО измеряют количество света, отраженного твердым образцом (9):

$$R = \frac{I}{I_0}, \quad (9)$$

где  $R$  – диффузное отражение,  $I_0$  – интенсивность падающего на образец света,  $I$  – интенсивность отраженного от образца света.

Наиболее общая теория СДО изложена Кубелкой и Мунком [140] и получила дальнейшее развитие в работах Рунова [141]. В настоящее время метод СДО весьма широко применяется для определения аналитов в твердой фазе [142].

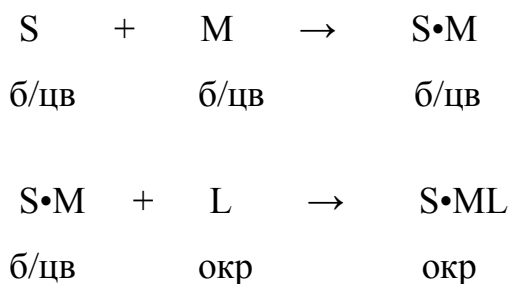
### 3.2.1 Условия определения кодеина методом спектрометрии диффузного отражения

Сорбционно-спектрометрические процедуры в данном случае предполагают концентрирование определяемого компонента, перевод его в окрашенное соединение и измерение коэффициента диффузного отражения сорбента ( $R$ ), который пересчитывают в функцию Гуревича – Кубелки – Мунка ( $\Delta F$ ) по уравнению (10):

$$\Delta F = \frac{(1-R)^2}{2R} - \frac{(1-R_0)^2}{2R_0}, \quad (10)$$

где  $R$  и  $R_0$  – коэффициенты диффузного отражения прореагировавшего образца и фона соответственно.

Основные стадии упомянутой выше процедуры: сорбция ( $S$ ) бесцветного определяемого компонента ( $M$ ), обработка сорбата ( $S \cdot M$ ) подходящим аналитическим реагентом ( $L$ ) для получения окрашенного соединения ( $S \cdot ML$ ).



Для получения окрашенного соединения сорбата с кодеином применяли реактив Драгендорфа (тетрайодовисмутат калия  $K[BiI_4]$ ), который широко используется для его обнаружения в тонком слое сорбента при проведении соответствующих экспертиз.

При взаимодействии кодеина с реактивом Драгендорфа в твердой фазе образуется ионный ассоциат (рис. 26) с характерной для него оранжевой окраской. При этом интенсивность окраски пятна возрастает по мере увеличения концентрации кодеина в исходном растворе (рис. 27).

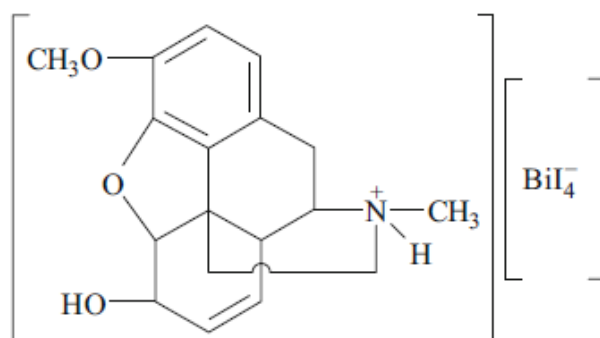


Рисунок 26 – Ионный ассоциат кодеина с реактивом Драгендорфа

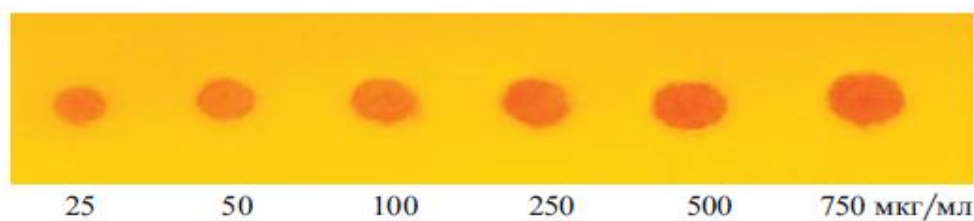


Рисунок 27 – Окраска пятен кодеина при различных его концентрациях на хроматографической пластинке после обработки реактивом Драгендорфа

Для получения спектра диффузного отражения ионного ассоциата кодеина с реактивом Драгендорфа на линию старта хроматографической пластинки наносили 0,2 мл раствора кодеина в 96%-ном этаноле ( $500 \text{ мг/дм}^3$ ). Нанесенную на пластинку пробу подсушивали на воздухе, а затем пластинку переносили в

камеру для хроматографирования, насыщенную парами растворителей (ацетон-хлороформ-аммиак в соотношении 24:12:1). После продвижения фронта растворов на 10 см выше линии старта пластинку вынимали из камеры, подсушивали на воздухе и опрыскивали реактивом Драгендорфа. В области проявленной зоны кодеина непосредственно в твердой фазе измеряли коэффициент диффузного отражения ( $R$ ) в диапазоне длин волн 380 – 720 нм. Также в указанном диапазоне длин волн измеряли коэффициент диффузного отражения фона пластинки. Пересчитывали коэффициент диффузного отражения в функцию Гуревича-Кубелки-Мунка  $\Delta F$  по формуле (10), строили спектр диффузного отражения в координатах  $\Delta F - \lambda$ .

Спектр диффузного отражения поверхностного ионного ассоциата кодеина с реактивом Драгендорфа представляет собой широкую бесструктурную полосу с максимумом при 520 нм (рис. 28).

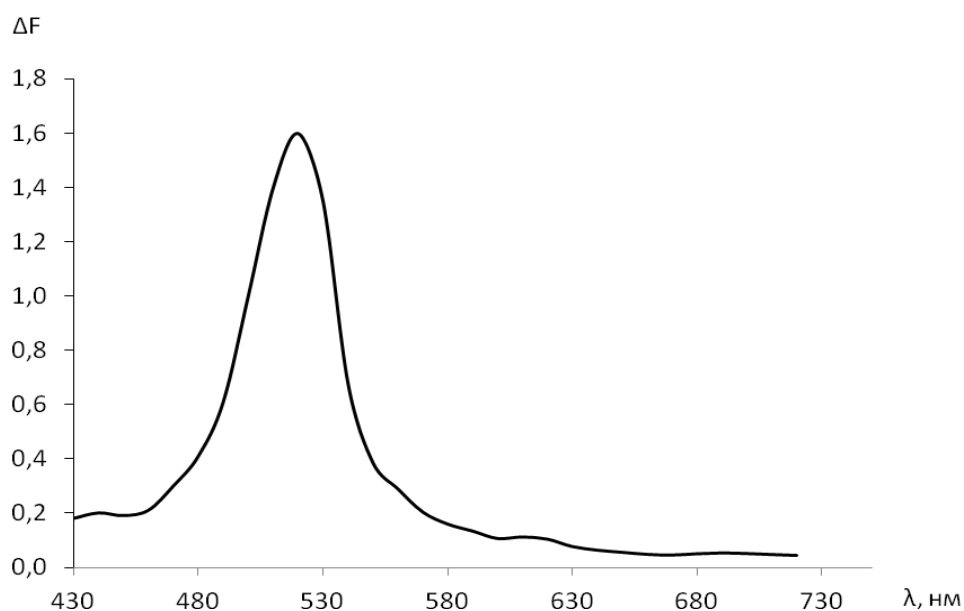


Рисунок 28 – Спектр диффузного отражения поверхностного ионного ассоциата кодеина с реактивом Драгендорфа

На рис. 29 приведена зависимость  $\Delta F$  от концентрации реактива Драгендорфа при содержании кодеина в исходном растворе 250 мг/дм<sup>3</sup>. При

концентрациях реактива Драгендорфа в диапазоне от  $1,2 \cdot 10^{-2}$  до  $2,0 \cdot 10^{-2}$  М наблюдается максимальное и постоянное значение аналитического сигнала.

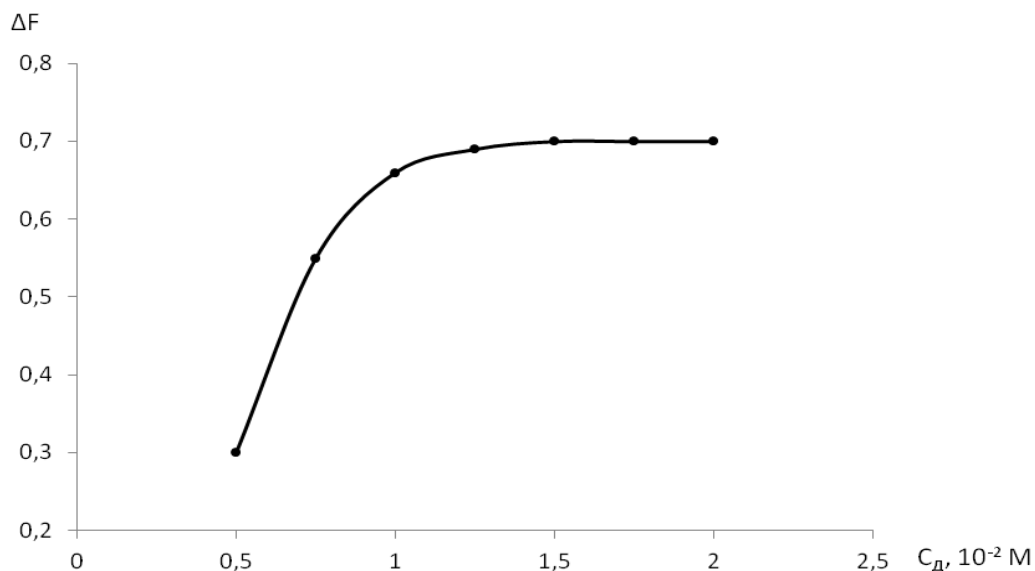


Рисунок 29 – Зависимость  $\Delta F$  от концентрации реактива Драгендорфа ( $C_{Д}$ ) при содержании кодеина в исходном растворе  $250 \text{ мг/дм}^3$

После проявления хроматографической пластинки интенсивность окраски пятна и величина  $\Delta F$  остается постоянной в течение 60 мин.

Для построения градуировочного графика (рис. 30) из исходного раствора кодеина в 96%-ном этаноле ( $10 \text{ г/дм}^3$ ) путем разбавления готовили градуировочные растворы следующих концентраций 25, 50, 100, 250, 500, 750,  $1000 \text{ мг/дм}^3$ . На хроматографические пластинки наносили по 200 мкл полученных растворов, повторяли вышеописанную операцию ТСХ и измеряли соответствующие значения  $R$  и  $R_0$  при 520 нм.

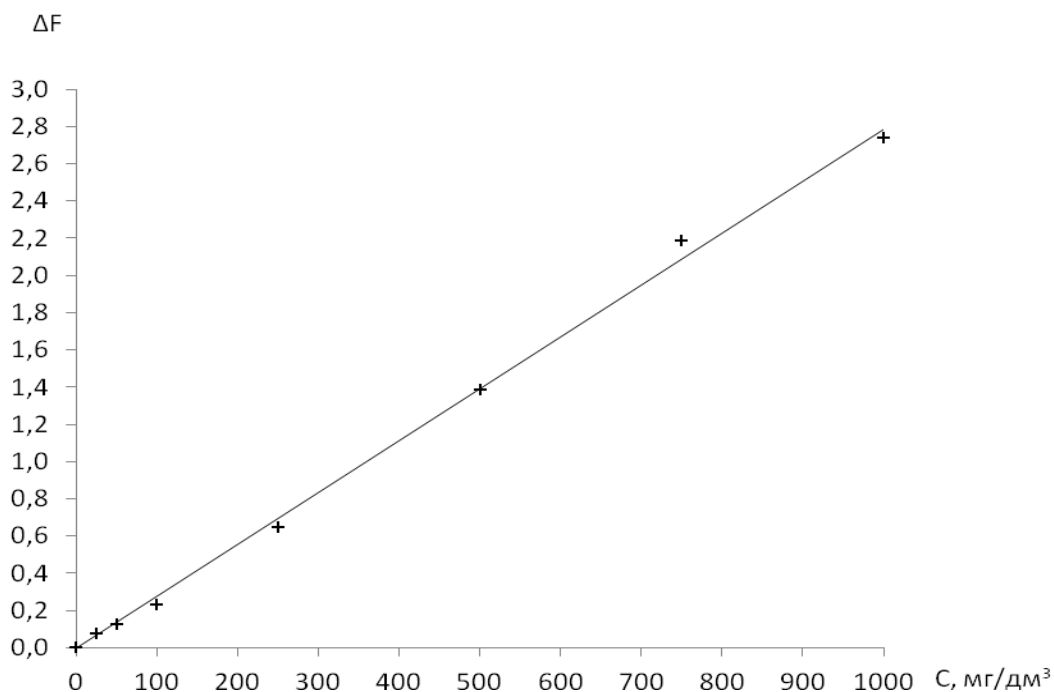


Рисунок 30 – Градуировочный график определения кодеина в водных растворах методом спектрометрии диффузного отражения

Уравнение зависимости аналитического сигнала от концентрации кодеина имеет вид  $y = 0,0028x$ , а коэффициент корреляции составляет 0,9979. Предел обнаружения кодеина, рассчитанный по 3S-критерию, составляет 9 мг/дм<sup>3</sup> ( $n = 3$ ,  $P = 0,95$ ). Градуировочный график линеен в диапазоне 25-1000 мг/дм<sup>3</sup> кодеина. В указанном концентрационном диапазоне кодеина относительное стандартное отклонение  $S_r$  не превышает 0,06 (рис. 31).

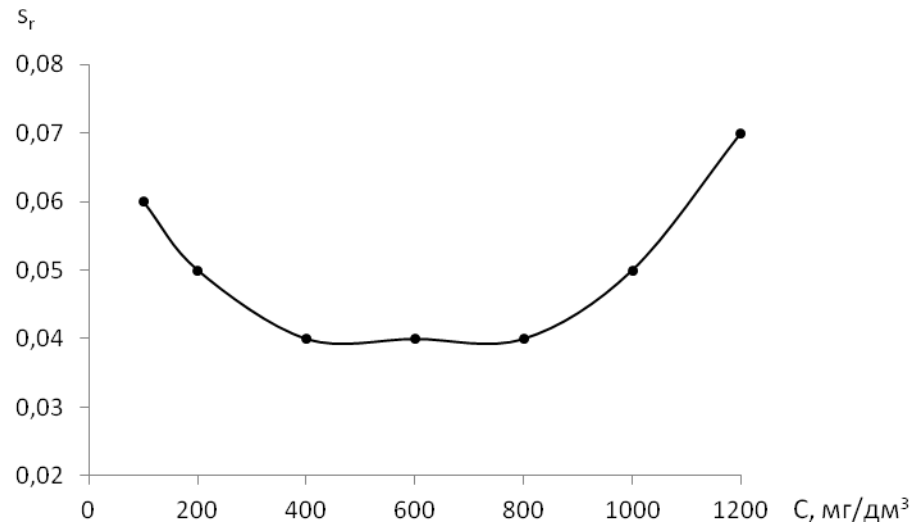


Рисунок 31 – Зависимость относительного стандартного отклонения ( $S_r$ ) от концентрации при определении кодеина в водных растворах методом спектрометрии диффузного отражения

Полученные результаты были использованы для разработки СДО-методики определения кодеина в лекарственных препаратах.

## **ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ МЕТОДИК МОЛЕКУЛЯРНО-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОДЕИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ**

### **4.1 Методика люминесцентного определения кодеина в лекарственных препаратах**

Результаты исследований (раздел 3.1.3) показали возможность прямого люминесцентного определения кодеина в растворах. В то же время, установлено мешающее влияние сопутствующих компонентов в объектах исследования, что предполагает их предварительное отделение. С этой целью для выделения кодеина использовали методику пробоподготовки порошков сложного состава, используемую для обнаружения веществ опиной группы [33]. Данная методика предусматривает получение «кислых» и «щелочных» экстрактов из лекарственных препаратов.

Для этого таблетку лекарственного препарата тщательно измельчали в фарфоровой чашке, переносили в делительную воронку на 100 мл, растворяли в 10 мл 0,01 М HCl и настаивали в течение 30 минут при периодическом перемешивании. Далее экстрагировали диэтиловым эфиром трижды порциями по 10, 5, 5 мл в течение 15 мин. Объединенные экстракты, так называемый «кислый» экстракт из лекарственных препаратов, в соответствии со свойствами экстрагирующихся компонентов содержат фенобарбитал и напроксен [8].

Водный остаток подщелачивали 25%-ным раствором аммиака до pH 10 и экстрагировали хлороформом трижды порциями по 5 мл в течение 15 мин. Органические фазы фильтровали через бумажные фильтры (красная лента) и выпаривали досуха при комнатной температуре. Так называемый «щелочной» экстракт содержит кодеин, анальгин, пропифеназон, парацетамол и кофеин [8]. «Щелочной» экстракт использовали для определения кодеина.



«Щелочной» экстракт растворяли в 5 мл хлороформа. На стеклянную хроматографическую пластинку наносили 0,2 мл исследуемого раствора в виде полосы шириной 2 см. Правее на расстоянии 2 см на линию старта наносили каплю раствора «свидетеля» (исходный раствор кодеина в 96%-ном этаноле, 10 г/дм<sup>3</sup>). Подсушивали пластинку на воздухе, а затем переносили в камеру для хроматографирования, насыщенную парами растворителей ацетон – хлороформ – 25%-ный раствор аммиака (24 : 12 : 1). Данная система растворителей широко применяется в практике работы судебно-химического отделения для разделения веществ основного характера. В этой системе достигается эффективное разделение кодеина и сопутствующих ему в «щелочных» экстрактах веществ (табл. 19).

Таблица 19 – Значения  $R_f$  кодеина и сопутствующих компонентов в системе растворителей ацетон – хлороформ – 25%-ный раствор аммиака (24:12:1)

Компонент	$R_f$
Кодеин	0,23±0,02
Парацетамол	0,71±0,02
Анальгин	0,65±0,03
Кофеин	0,66±0,02
Пропифеназон	0,60±0,03

После продвижения фронта растворителей на 10 см выше линии старта пластинку вынимали из камеры, подсушивали на воздухе, опрыскивали реактивом Драгендорфа только в области «свидетеля». Кодеин проявляется в виде характерного для этого алкалоида пятна оранжевого цвета.

Для количественного определения кодеина фрагмент пластинки с зоной кодеина параллельный проявленному пятну «свидетеля» элюировали 5 мл 0,05 М раствора  $H_2SO_4$ , фильтровали и измеряли интенсивность люминесценции

раствора в найденных оптимальных условиях ( $\lambda_{\text{возб}} = 300$  нм,  $\lambda_{\text{люм}} = 345$  нм). Концентрацию кодеина определяли по градуировочному графику.

Схема методики представлена на рис. 32.

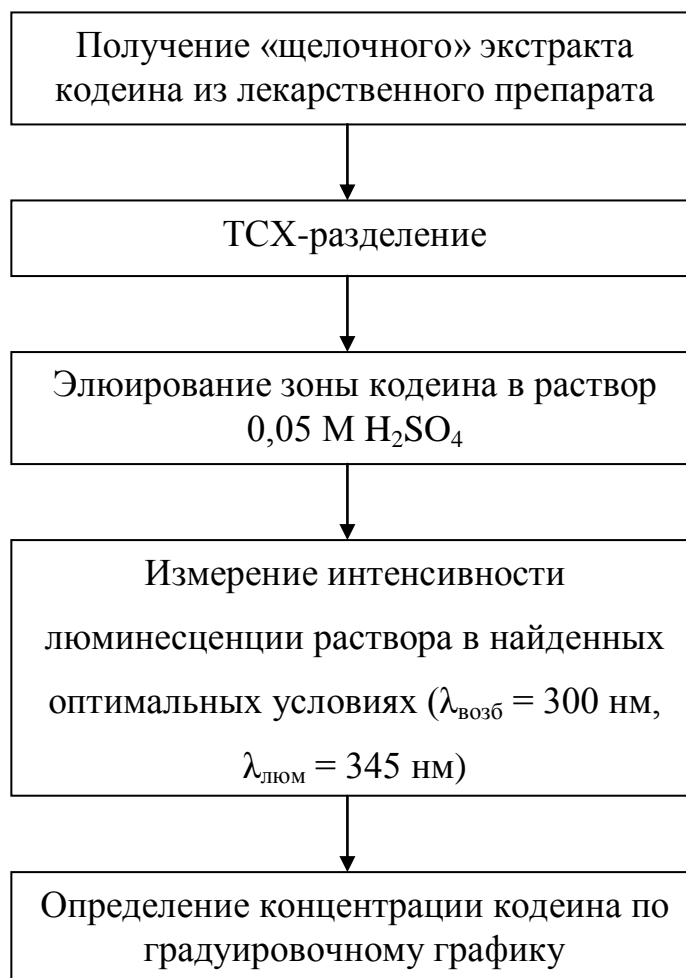


Рисунок 32 – Схема методики определения кодеина в лекарственных препаратах методом ЛС

Для построения градуировочного графика (рис. 33) из исходного раствора кодеина в 96%-ном этаноле ( $10 \text{ г/дм}^3$ ) готовили градуировочные растворы следующих концентраций 40, 100, 250, 500, 1000, 1200 мкг/мл. Для этого отбирали по 40; 100; 250; 500; 1000, 1200 мкл исходного раствора в отдельные стеклянные флаконы, упаривали досуха в токе теплого воздуха (не более  $40^\circ\text{C}$ ).

Затем сухие остатки растворяли в 10 мл 0,01 М HCl и проводили пробоподготовку аналогично исследуемым образцам.

Далее на хроматографические пластинки наносили по 0,2 мл полученных экстрактов, повторяли вышеописанные операции ТСХ и измеряли соответствующие значения интенсивности люминесценции.

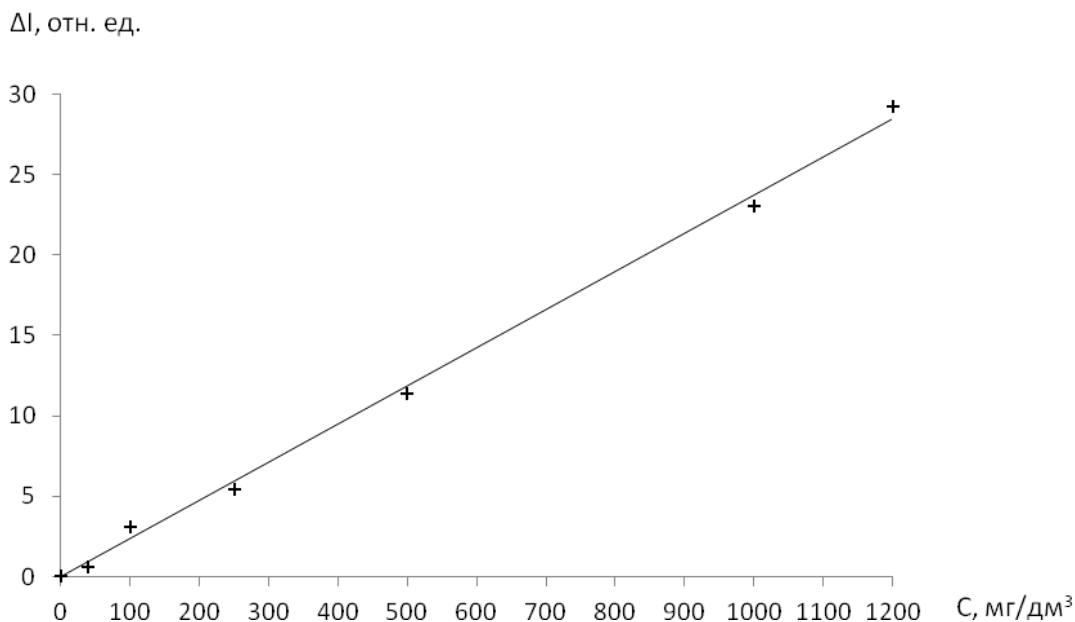


Рисунок 33 – Градуировочный график люминесцентного определения кодеина в лекарственных препаратах

Линейность градуировочного графика доказана в диапазоне концентраций от 40 до 1200 мг/дм<sup>3</sup>. Уравнение зависимости аналитического сигнала от концентрации кодеина имеет вид  $y = 0,024x$ , коэффициент корреляции 0,9972. Предел обнаружения, рассчитанный по 3S-критерию, составил 7 мг/дм<sup>3</sup> ( $n = 3$ ,  $P = 0,95$ ).

Оценку правильности результатов определения кодеина проводили методом «введено-найдено». Результаты определения кодеина в модельных растворах приведены в табл. 20. Как видно из табл. 20, получены удовлетворительные результаты, а относительное стандартное отклонение  $S_r$  не превышает 0,06.

Таблица 20 – Результаты определения кодеина люминесцентным методом в модельных растворах ( $n = 5$ ,  $P = 0,95$ )

Содержание кодеина, мг/дм <sup>3</sup>		S	S <sub>r</sub>
Введено	Найдено ( $C \pm \delta$ )		
100	96 ± 7	5,8	0,06
300	307 ± 19	15,4	0,05
500	511 ± 25	20,4	0,04
700	685 ± 34	27,4	0,04
900	882 ± 55	44,1	0,05
1100	1121 ± 84	67,3	0,06

Для апробации разработанной методики люминесцентного определения кодеина в лекарственных препаратах были взяты таблетки (тб) лекарственных препаратов «Пенталгин Плюс», «Пенталгин Н» и «Седалгин-Нео». Результаты определения кодеина представлены в табл. 21.

Таблица 21 – Результаты люминесцентного определения кодеина в лекарственных препаратах ( $n = 5$ ,  $P = 0,95$ )

Наименование препарата	Содержание кодеина, мг/тб		S	S <sub>r</sub>
	Рецептурные данные	Найдено		
Пенталгин Плюс	8,0	8,3 ± 0,6	0,5	0,06
Пенталгин Н	8,0	8,4 ± 0,5	0,4	0,05
Седалгин-Нео	10,0	9,6 ± 0,5	0,4	0,04

Как видно из табл. 21, предлагаемая методика люминесцентного определения кодеина позволяет получать данные по содержанию кодеина в фармацевтических препаратах, сопоставимые с рецептурными данными (массы

таблеток в эксперименте составляли: Пенталгин Плюс – 800 мг, Пенталгин Н – 727 мг, Седальгин-Нео – 667 мг). Использование доступных реактивов и простого аналитического оборудования выгодно отличает данную методику на фоне известных методик ВЭЖХ-анализа кодеинсодержащих препаратов, что позволяет рекомендовать её для использования в практике экспертных учреждений, например, при анализе вещественных доказательств, поступающих на судебно-химическое исследование.

#### **4.2 Методика определения кодеина в лекарственных препаратах методом спектрометрии диффузного отражения**

В разделе 3.2.1 определены условия определения кодеина методом СДО в твердой фазе. Последнее существенно сказывается на экспрессности измерений, поскольку отпадает необходимость в процедуре элюирования хроматографической зоны кодеина в раствор. Представлялось логичным применить полученные результаты к анализу кодеинсодержащих лекарственных препаратов.

Выделение кодеина из лекарственных препаратов проводили по методике [33], аналогично выделению кодеина из лекарственных препаратов для люминесцентного определения.

«Щелочной» экстракт растворяли в 5 мл хлороформа, 0,2 мл полученного раствора наносили на линию старта хроматографической пластинки Sorbfil. Правее на расстоянии 2 см на линию старта наносили каплю раствора «свидетеля» (исходный раствор кодеина в 96%-ном этаноле, 10 г/дм<sup>3</sup>). Подсушивали пластинку на воздухе, а затем переносили в камеру для хроматографирования, насыщенную парами растворителей ацетон – хлороформ – 25%-ный раствор аммиака (24 : 12 : 1). После продвижения фронта растворов на 10 см выше линии старта пластинку вынимали из камеры, подсушивали на воздухе и опрыскивали реактивом Драгендорфа (кислотный раствор иодвисмутата калия). В области

проявленной зоны кодеина непосредственно в твердой фазе измеряли коэффициент диффузного отражения ( $R$ ) при длине волны 520 нм. Также при указанной длине волны измеряли коэффициент диффузного отражения фона пластинки ( $R_0$ ). Пересчитывали  $R$  в функцию Гуревича-Кубелки-Мунка. Концентрацию кодеина определяли по градуировочному графику.

Схема методики представлена на рис. 34.

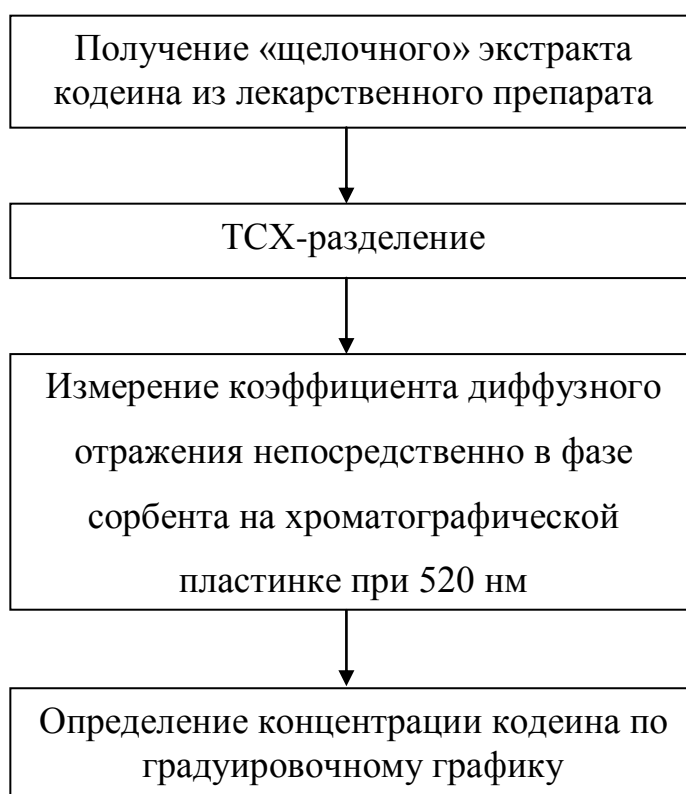


Рисунок 34 – Схема методики определения кодеина в лекарственных препаратах методом СДО

Для построения градуировочного графика (рис. 35) из исходного раствора кодеина в 96%-ном этаноле ( $10 \text{ г/дм}^3$ ) готовили градуировочные растворы следующих концентраций: 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1200  $\text{мг/дм}^3$ . Для этого отбирали по 50; 100; 250; 500; 1000, 1200 мкл исходного раствора в отдельные стеклянные флаконы, упаривали досуха в токе теплого воздуха (не более  $40^\circ\text{C}$ ).

Затем сухие остатки растворяли в 10 мл 0,01 М HCl и проводили пробоподготовку аналогично исследуемым образцам.

Далее на хроматографические пластинки наносили по 0,2 мл полученных градуировочных растворов, повторяли вышеописанные операции ТСХ и измеряли соответствующие значения коэффициента диффузного отражения.

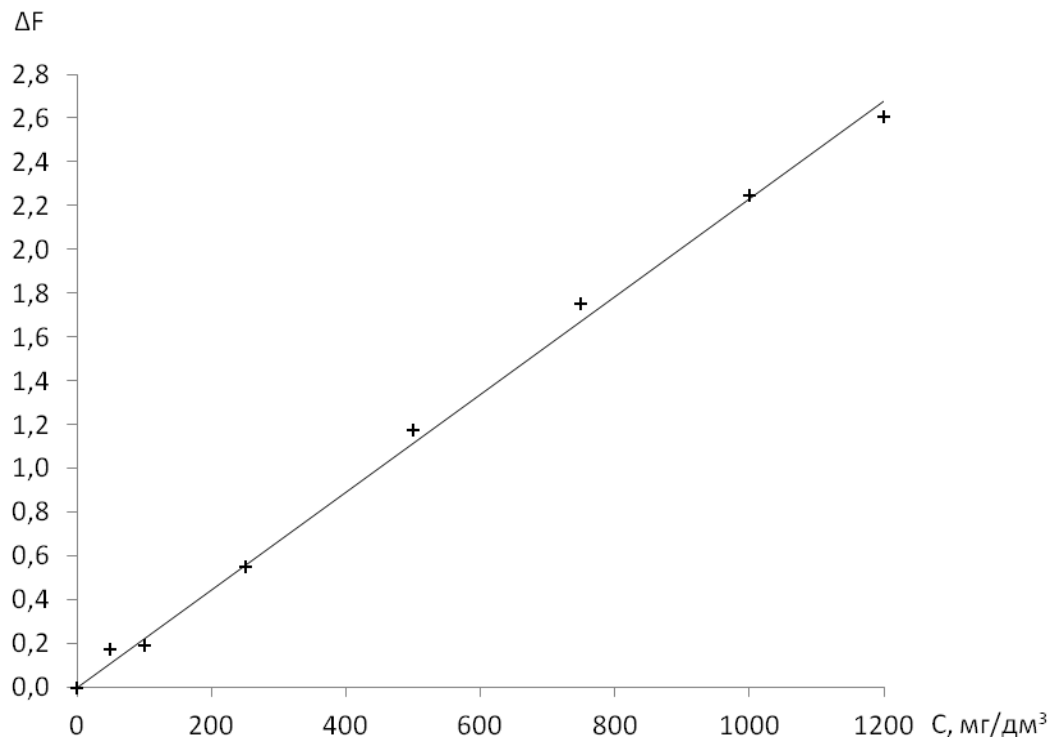


Рисунок 35 – Градуировочный график определения кодеина в лекарственных препаратах методом спектрометрии диффузного отражения

Линейность градуировочного графика доказана в диапазоне концентраций от 50 до 1200 мг/дм<sup>3</sup>. Уравнение зависимости аналитического сигнала от концентрации кодеина имеет вид  $y = 0,0022x$ , а коэффициент корреляции составляет 0,9968. Предел обнаружения кодеина, рассчитанный по 3S-критерию, составляет 15 мг/дм<sup>3</sup> ( $n = 3$ ,  $P = 0,95$ ).

Оценку правильности результатов определения кодеина проводили методом «введено-найдено». Результаты определения кодеина в модельных растворах

приведены в табл. 22. Как видно из табл. 22 получены удовлетворительные результаты, а относительное стандартное отклонение  $S_r$  не превышает 0,07.

Таблица 22 – Результаты определения кодеина методом спектрометрии диффузного отражения в модельных растворах ( $n = 5$ ,  $P = 0,95$ )

Содержание кодеина, мг/дм <sup>3</sup>		S	S <sub>r</sub>
Введено	Найдено (C ± δ)		
100	95 ± 8	6,7	0,07
300	282 ± 21	16,9	0,06
500	512 ± 32	25,6	0,05
700	718 ± 36	28,7	0,04
900	920 ± 57	46,0	0,05
1100	1076 ± 80	64,6	0,06

В таблице 23 представлены результаты апробации разработанной методики на образцах лекарственных препаратов «Пенталгин Н», «Пенталгин Плюс» и «Седалгин-Нео».

Таблица 23 – Результаты определения кодеина в лекарственных препаратах методом спектрометрии диффузного отражения ( $n = 5$ ,  $P = 0,95$ )

Наименование препарата	Содержание кодеина, мг/тб		S	S <sub>r</sub>
	Рецептурные данные	Найдено		
Пенталгин Плюс	8,0	7,7 ± 0,5	0,4	0,05
Пенталгин Н	8,0	8,2 ± 0,5	0,4	0,05
Седалгин-Нео	10,0	10,2 ± 0,5	0,4	0,04



Предлагаемая методика позволяет получать данные по содержанию кодеина в фармацевтических препаратах, сопоставимые с рецептурными данными, а измерение аналитического сигнала в твердой фазе позволило значительно сократить время анализа.

#### **4.3 Методика люминесцентного определения кодеина в органах человека**

В судебно-химических исследованиях при подозрении на отравление неизвестным ядом согласно приказу №346 от 12 мая 2010 г. «Об утверждении порядка организации и производства судебно-медицинских экспертиз в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации» судебно-медицинские эксперты направляют комплекс внутренних органов. Наиболее часто исследуемым объектом в этом случае является печень.

Для выделения кодеина из образцов печени нами был использован один из наиболее доступных и широко применяемых способов пробоподготовки в токсикологической практике – метод выделения веществ подкисленной водой (метод А.А. Васильевой) [13, 14, 34].

Навеску органа (20 г) измельчали, тщательно перемешивали. К полученной пробе добавляли 40 мл 0,01 М раствора HCl и настаивали 2 часа при периодическом перемешивании. Жидкую фазу отделяли центрифугированием (2500 об/мин) в течение 30 мин, а к твердой фазе добавляли 20 мл 0,01 М HCl и повторяли операции, описанные выше. Объединенные водные растворы трижды экстрагировали диэтиловым эфиром порциями по 20, 15, 15 мл в течение 15 минут. Эфирные экстракты отбрасывали («кислый» экстракт).

Водные растворы последовательно экстрагировали порциями по 15 мл смесью хлороформ – бутанол (9:1) при pH 8, хлороформом (pH 10), диэтиловым эфиром (pH 13). Органические фазы объединяли, фильтровали через бумажный фильтр («красная лента») и упаривали досуха при комнатной температуре в

чашках Петри. «Щелочной» экстракт растворяли в 5 мл хлороформа и использовали для определения кодеина.

Для очистки «щелочного» экстракта от сопутствующих компонентов использовали ТСХ на стеклянных пластинках с закрепленным слоем силикагеля (табл. 24). Для этого на линию старта хроматографической пластинки наносили 0,2 мл исследуемого раствора в виде полосы (2 см). Правее на расстоянии 2 см на линию старта наносили каплю раствора «свидетеля» (исходный раствор кодеина в 96%-ном этаноле, 10 мг/мл). Пятна нанесенных растворов подсушивали на воздухе, а затем пластинку переносили в камеру для хроматографирования, насыщенную парами растворителей ацетон – хлороформ – 25%-ый раствор аммиака в соотношении 24:12:1. В данной системе достигается эффективное разделение кодеина и его метаболита – морфина. После продвижения смеси на 10 см выше линии старта пластинку вынимали из камеры, подсушивали на воздухе и опрыскивали реактивом Драгендорфа в области раствора «свидетеля». При этом пятно кодеина приобретало характерную для этого алкалоида оранжевую окраску ( $R_f = 0,23 \pm 0,02$ ).

Таблица 24 –Значения  $R_f$  кодеина и морфина в системе растворителей ацетон – хлороформ – 25%-ый раствор аммиака (24:12:1)

Компонент	$R_f$
Кодеин	0,23±0,02
Морфин	0,09±0,02

Фрагмент пластинки параллельный проявленному пятну элюировали с пластинки 5 мл 0,05 М раствора серной кислоты, фильтровали и снимали спектр люминесценции раствора. Максимум люминесценции кодеина регистрировали при  $\lambda_{\text{возб}} = 300$  нм,  $\lambda_{\text{люм}} = 345$  нм. Концентрацию кодеина определяли по градуировочному графику.

Схема методики представлена на рис. 36.

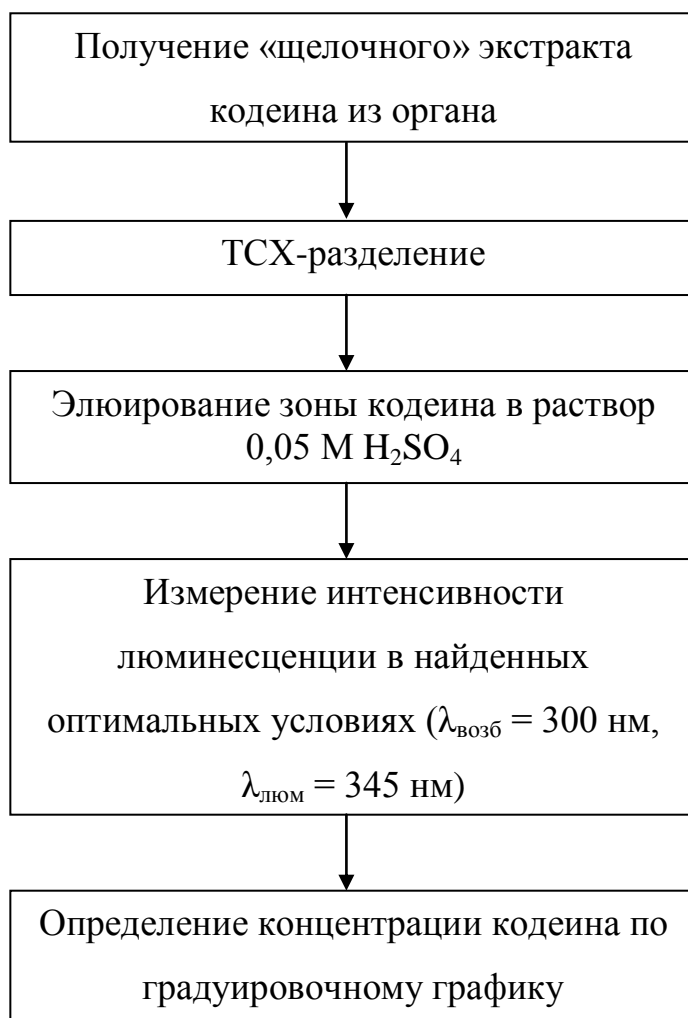


Рисунок 36 – Схема методики люминесцентного определения кодеина в органах человека

Градуировочный график (рис. 37) строили по модельным образцам печени с содержанием кодеина 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 0,75 мг/г. Для этого к навескам 20 г мелко измельченной печени, предварительно проверенной на отсутствие наркотических и лекарственных веществ, прибавляли 20; 40; 100; 200; 400; 1000; 1500 мкл исходного раствора кодеина в 96%-ном этаноле (10 г/дм<sup>3</sup>), перемешивали, выдерживали в течение 24 часов в холодильнике, далее проводили пробоподготовку аналогично исследуемым образцам.

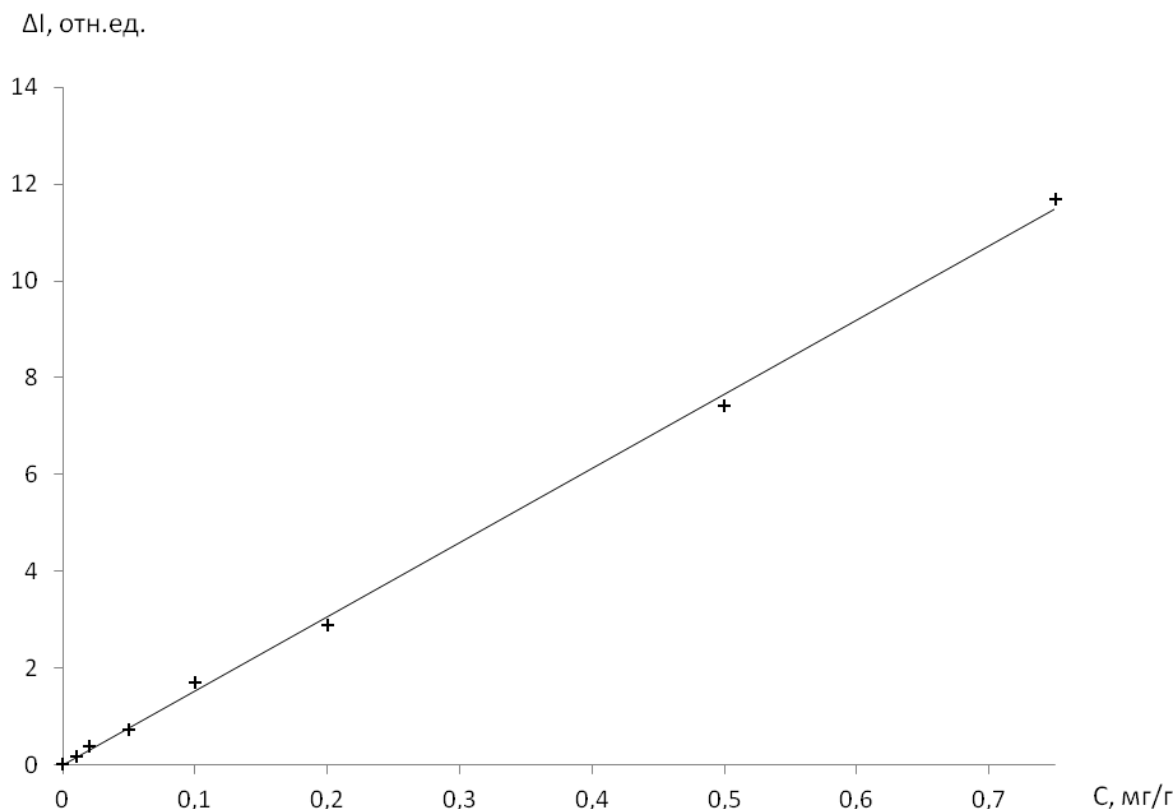


Рисунок 37 – Градуировочный график люминесцентного определения кодеина в печени

Линейность градуировочного графика доказана в диапазоне концентраций от 0,01 до 0,75 мг/г. Уравнение зависимости аналитического сигнала от концентрации кодеина имеет вид  $y = 15,337x$ , коэффициент корреляции составляет 0,9988. Предел обнаружения кодеина, рассчитанный по 3S-критерию, составляет  $3 \cdot 10^{-3}$  мг/г ( $n = 3, P = 0,95$ ).

Оценку правильности результатов люминесцентного определения кодеина в печени проводили методом «введено-найдено». С этой целью исследовали модельные образцы печени с концентрациями кодеина 0,05; 0,09; 0,3; 0,7 мг/г. Результаты определения кодеина в модельных образцах приведены в табл. 25. Как видно из табл. 25, получены удовлетворительные результаты, а относительное стандартное отклонение  $S_r$  не превышает 0,07.

Таблица 25 – Результаты определения кодеина люминесцентным методом в модельных образцах печени ( $n = 5$ ,  $P = 0,95$ )

Содержание кодеина, мг/г		S	S <sub>r</sub>
Введено	Найдено (C±δ)		
0,050	0,046 ± 0,004	0,003	0,07
0,090	0,087 ± 0,005	0,004	0,05
0,30	0,29 ± 0,01	0,01	0,03
0,70	0,72 ± 0,05	0,04	0,06

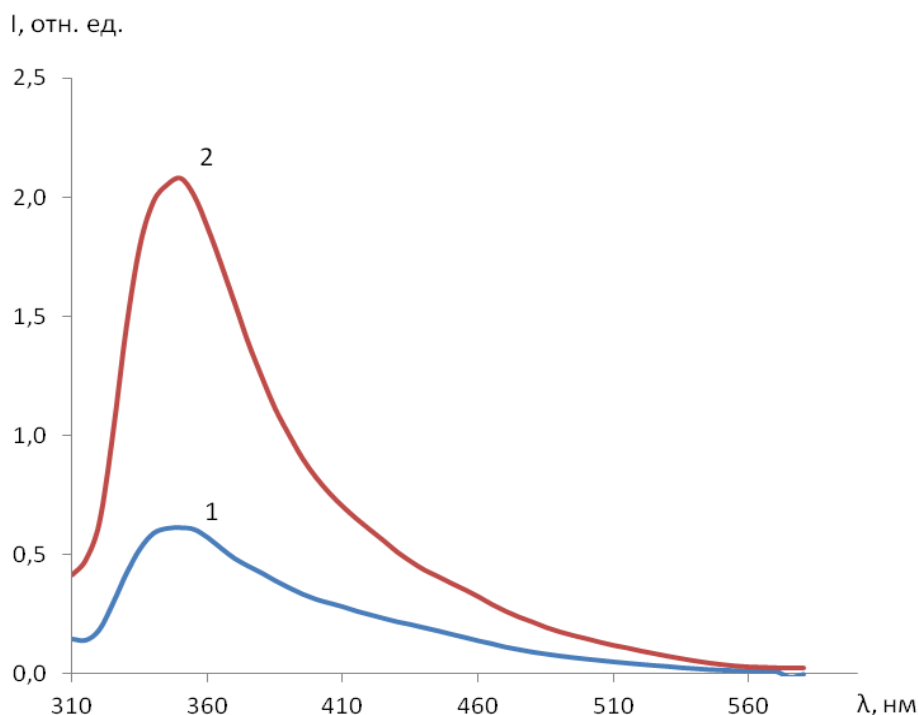
Для апробации разработанной методики люминесцентного определения кодеина в органах человека был взят случай реального отравления кодеинсодержащими препаратами. В табл. 26 приведены сравнительные результаты определения кодеина методами ЛС и ВЭЖХ-УФ.

Таблица 26 – Результаты определения кодеина в экспертных образцах методами ЛС и ВЭЖХ ( $P = 0,95$ ;  $n = 3$ )

Экспертный образец	Содержание кодеина (C ± δ), мг/г	
	Метод ЛС	Метод ВЭЖХ-УФ
Печень	0,040 ± 0,005	0,035 ± 0,005
Стенка желудка	0,133 ± 0,009	0,126 ± 0,012

Как видно из табл. 26, результаты люминесцентного определения кодеина в экспертных образцах удовлетворительно совпадают с данными независимого метода ВЭЖХ-УФ.

На рис. 38 представлены спектры люминесценции экстрактов из экспертных образцов с максимумом люминесценции кодеина при  $\lambda_{\text{люм}} = 345$  нм.



1 – экстракт из печени,  $C_{\text{код}} = 0,040$  мг/г;

2 – экстракт из стенки желудка,  $C_{\text{код}} = 0,133$  мг/г

Рисунок 38 – Спектры люминесценции экстрактов из экспертных образцов

#### 4.4 Методика экстракционно-флуориметрического определения кодеина в моче человека

Необходимость экспрессного неинвазивного определения опиатов в моче человека, в т.ч. кодеина, возникает при проведении соответствующих экспертиз: тестировании лиц на употребление наркотических средств, выявлении «кодеиновой» зависимости.

Моча является специфическим объектом в судебно-химических исследованиях, так как многие вещества, выводящиеся почками, могут обнаруживаться в виде неизмененных соединений или их метаболитов более длительное время, чем в крови. Как правило, тест остается положительным в течение нескольких дней после последнего приема наркотика.

Концентрации кодеина в моче человека при проведении скрининговых исследований, подтверждающих его наличие при злоупотреблениях, составляют порядка  $n \cdot 10^2$  мкг/дм<sup>3</sup>. Ранее (раздел 3.1.3) нами была показана возможность экстракционно-флуориметрического определения 1,5-50 мкг/дм<sup>3</sup> кодеина в водных растворах. Представляло интерес изучить применимость полученных результатов к анализу мочи человека.

Пробоподготовку образцов мочи человека проводили по адаптированной к условиям флуориметрического детектирования кодеина методике в соответствии с рекомендациями [31]. Для устранения мешающего влияния морфина использовали свойство кодеина экстрагироваться из слабо щелочных водных растворов диэтиловым эфиром. При этом морфин образует морфинат и остается в водной фазе. Это свойство используется для разделения алкалоидов в ходе их определения [13].

В пробирку вместимостью 20 мл вносили 10 мл мочи и 1 мл концентрированной HCl. Пробирку закрывали пробкой с металлическим фиксатором и подвергали кислотному гидролизу на глицериновой бане при температуре 100 °С в течение 30 минут. Раствор в пробирке охлаждали, добавляли 1,7 мл 50%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, перемешивали, выдерживали 10 минут, а затем фильтровали через бумажный фильтр «красная лента». Фильтр промывали 5 мл воды, подкисленной хлороводородной кислотой до pH 2. Фильтраты объединяли, переносили в делительную воронку и экстрагировали трижды 5 мл смеси хлороформ - изопропанол (9 : 1) в течение 5 минут. Водный слой отделяли, нейтрализовали раствором гидрокарбоната натрия, добавляли 10%-ный раствор аммиака до pH 8,5, экстрагировали дважды 5 мл диэтилового эфира в течение 5 минут. Органическую фазу отделяли, фильтровали через фильтр «белая лента» с безводным сульфатом натрия и выпаривали до сухого остатка в токе теплого воздуха (60 °С). Сухой остаток («щелочной» экстракт) растворяли в 5 мл 0,05 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. К полученному раствору приливали 1 мл фосфатной буферной смеси (pH = 7), 4 мл водного раствора эозина (0,1

мг/дм<sup>3</sup>) и 10 мл толуола. Содержимое делительной воронки перемешивали в течение 10 минут. После разделения фаз водную фазу отбрасывали. Для удаления эозина, перешедшего в органическую фазу, в делительную воронку вводили 10 мл фосфатной буферной смеси и встряхивали 5 минут. После разделения фаз аликвоту (2 мл) органической фазы переносили в кварцевую кювету и измеряли интенсивность флуоресценции при 550 нм. Концентрацию кодеина в моче определяли по градуировочному графику.

Схема методики представлена на рис. 39.

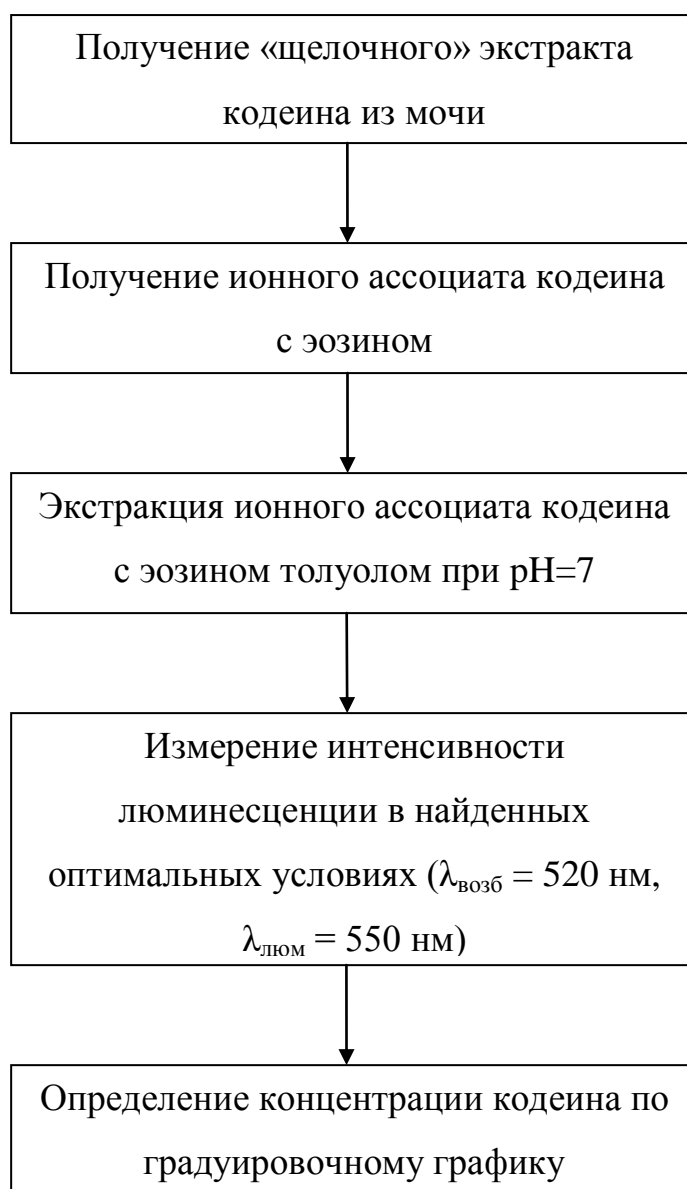


Рисунок 39 – Схема методики экстракционно-флуориметрического определения кодеина в моче человека



Для построения градуировочного графика (рис. 40) готовили модельные образцы мочи с содержанием кодеина 30; 60; 90; 120; 180; 240; 320 мкг/дм<sup>3</sup>. Для этого в отдельные пробирки отбирали аликвоты раствора кодеина в 96%-ном этаноле (0,01 г/дм<sup>3</sup>): 30; 60; 90; 120; 180; 240; 320 мкл соответственно. Упаривали досуха в токе теплого воздуха (не более 40 °С). К сухим остаткам прибавляли 10 мл мочи, предварительно проверенной на отсутствие наркотических и лекарственных веществ. Пробы перемешивали и выдерживали в течение 2 часов в холодильнике. Далее проводили пробоподготовку аналогично исследуемым образцам.

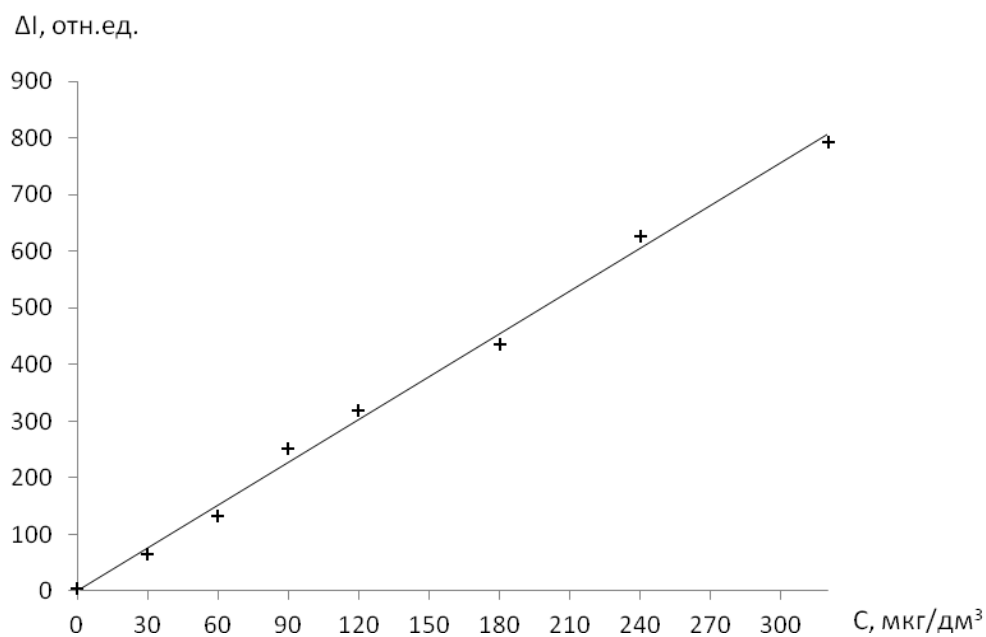


Рисунок 40 – Градуировочный график экстракционно-флуориметрического определения кодеина в моче

Линейность градуировочного графика доказана в диапазоне концентраций от 30 до 320 мкг/дм<sup>3</sup>. Уравнение зависимости аналитического сигнала от концентрации кодеина имеет вид  $y = 2,5228 x$ , а коэффициент корреляции составляет 0,9959. Предел обнаружения кодеина, рассчитанный по 3S-критерию, составляет 6 мкг/дм<sup>3</sup> ( $n = 3, P = 0,95$ ).

Оценку правильности результатов экстракционно-флуориметрического определения кодеина проводили методом «введено-найдено» в образцах мочи человека, не содержащих кодеина (табл. 27). С этой целью готовили модельные образцы мочи с концентрациями кодеина 50, 100, 150, 200, 250, 300 мкг/дм<sup>3</sup>, проводили пробоподготовку и исследование вышеописанным способом.

Таблица 27 – Результаты определения кодеина экстракционно-флуориметрическим методом в модельных образцах мочи (n = 5, P = 0,95)

Содержание кодеина, мкг/дм <sup>3</sup>		S	S <sub>r</sub>
Введено	Найдено (C ± δ)		
50	47 ± 3	2,8	0,06
100	96 ± 6	4,8	0,05
150	156 ± 8	6,2	0,04
200	192 ± 9	7,7	0,04
250	262 ± 13	10,4	0,04
300	315 ± 20	15,8	0,05

Как видно из табл. 27, результаты экстракционно-флуориметрического определения кодеина в моче человека характеризуются правильностью и достаточно высокой воспроизводимостью, а относительное стандартное отклонение S<sub>r</sub> не превышает 0,06.

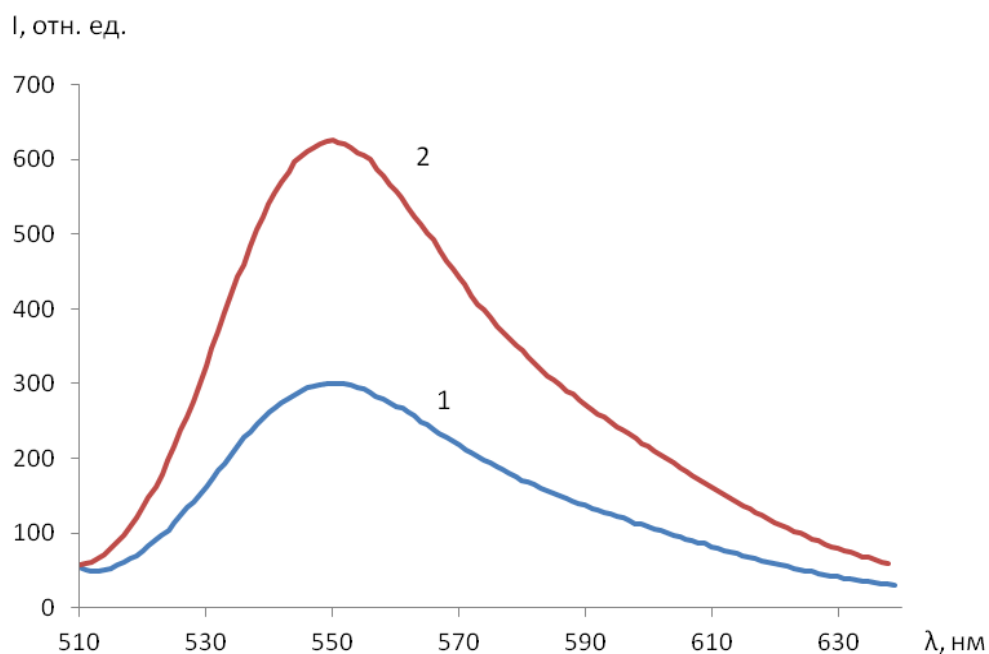
Для апробации методики экстракционно-флуориметрического определения кодеина использовали экспертные образцы мочи потребителей опиатов. В табл. 28 приведены сравнительные результаты определения кодеина экстракционно-флуориметрическим (Э/фл) методом и независимым методом ГХ-МС.

Таблица 28 – Результаты определения кодеина в экспертных образцах мочи человека экстракционно-флуориметрическим (Э/фл) и ГХ-МС – методами ( $n = 3$ ;  $P = 0,95$ )

Экспертный образец (№)	Содержание кодеина ( $C \pm \delta$ ), мкг/дм <sup>3</sup>	
	Метод Э/фл	Метод ГХ-МС
1	120 ± 14	124 ± 11
2	248 ± 21	242 ± 17

Как видно из табл. 28, результаты определения кодеина в экспертных образцах экстракционно-флуориметрическим методом удовлетворительно совпадают с данными независимого метода ГХ-МС.

На рис. 41 представлены спектры люминесценции экстрактов из экспертных образцов с максимумом люминесценции ионного ассоциата кодеина с эозином при  $\lambda_{\text{люм}} = 550$  нм.



1 – экстракт из мочи,  $C_{\text{код}} = 120$  мкг/дм<sup>3</sup>;

2 – экстракт из мочи,  $C_{\text{код}} = 248$  мкг/дм<sup>3</sup>

Рисунок 41 – Спектры люминесценции экстрактов из экспертных образцов

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Давая общую характеристику разработанным молекулярно-спектрометрическим методикам определения кодеина в исследуемых объектах, как нам представляется, следует отметить следующее.

В известной нам литературе отсутствуют сведения об использовании методов люминесценции и спектроскопии диффузного отражения, равно как и соответствующих методик, для определения кодеина в лекарственных препаратах, внутренних органах и моче человека. Поэтому, учитывая высокую чувствительность и экономичность этих методов при относительной простоте инструментария, а также успешную апробацию разработанных аналитических процедур на реальных образцах, можно рассматривать последние, как хорошее дополнение к существующим процедурам при решении определенных задач в практике учреждений соответствующего профиля. Таковыми могут быть, например, разовые анализы, априорная оценка содержания кодеина в исследуемых образцах перед проведением серийных весьма затратных ГХ-МС, ВЭЖХ, ГЖХ и других определений или отсутствие соответствующего инструментария. Ниже приводятся некоторые аргументы в пользу этого утверждения.

*Лекарственные препараты.* В Государственном реестре лекарственных средств Российской Федерации приведен весьма внушительный перечень кодеинсодержащих препаратов отечественных и зарубежных производителей [24]. Необходимость определения кодеина в лекарственных препаратах возникает при проверке подлинности последних, терапевтическом мониторинге пациентов, а также при проведении судебно-химических исследований для установления фактов использования кодеинсодержащих препаратов для нелегального синтеза наркотических средств, в частности, дезоморфина. Наиболее распространенным методом анализа лекарственных препаратов является ВЭЖХ, который включен в

отечественную и ряд зарубежных фармакопей [106-109]. Пределы ВЭЖХ-обнаружения кодеина в лекарственных препаратах составляют порядка  $n \cdot 10^1$  -  $n \cdot 10^2$  мг/дм<sup>3</sup> [113, 114, 117, 118], что вполне достаточно для его количественного определения. Однако ВЭЖХ-определения, как правило, сопряжены с использованием в качестве подвижных фаз токсичных метанола и ацетонитрила. В известных экстракционно-фотометрических методиках определения кодеина в лекарственных препаратах (пределы обнаружения  $n \cdot \text{мг/дм}^3$ ) в качестве органической фазы используется хлороформ [13, 127-129]. В разработанных нами методиках определения кодеина в лекарственных препаратах методами люминесценции в растворах (предел обнаружения 40 мг/дм<sup>3</sup>) и спектроскопии диффузного отражения в твердой фазе (предел обнаружения 50 мг/дм<sup>3</sup>) не используются опасные органические растворители, а селективность достигается с помощью ТСХ-разделения.

*Внутренние органы человека.* Необходимость определения кодеина во внутренних органах человека возникает при проведении судебно-химических исследований для подтверждения диагноза отравления препаратами опийной группы. Для этих целей в основном используются хроматографические методы (ГЖХ, ВЭЖХ) [82, 143]. Пределы обнаружения кодеина составляют  $n \cdot 10^{-2}$  -  $n \cdot 10^{-1}$  мкг/г при обычных содержаниях последнего в образцах  $n \cdot 10^1$  -  $n \cdot 10^2$  мкг/г. Предел обнаружения кодеина разработанной люминесцентной методики составляет 3 мкг/г, что вполне достаточно для проведения альтернативных определений.

*Моча человека.* Моча человека является специфическим объектом в судебно-химических исследованиях при проведении соответствующих экспертиз: выявления морфина и его производных, дезоморфина, «кодеиновой» зависимости. Концентрации кодеина в моче человека при проведении скрининговых исследований, подтверждающих его наличие при злоупотреблениях, составляют порядка  $n \cdot 10^2$  мкг/дм<sup>3</sup>. Данная чувствительность, в частности, достигается ГХ-МС методом [93, 94, 97, 98, 101]. Однако, как правило, требуется проведение дополнительных операций получения дериватов с помощью реакций

ацилирования или силилирования. Реактивы, применяемые для этих целей, довольно дороги и труднодоступны. На этом фоне методика экстракционно-флуориметрического определения (30 – 320 мкг/дм<sup>3</sup>) кодеина выглядит вполне привлекательной.

## ВЫВОДЫ

1. Изучены спектроскопические свойства кодеина в растворах и твердой фазе. Оптимальными условиями люминесценции кодеина в водных растворах являются: 0,05 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ;  $\lambda_{\text{возб}} = 300$  нм;  $\lambda_{\text{люм}} = 345$  нм. Определен относительный квантовый флуоресценции кодеина в водных растворах, который составил 0,01. Впервые изучены условия образования, экстракции и флуоресценция кодеина в виде его ионного ассоциата с эозином (рН = 6 - 8;  $C_{\text{эоз}} = 1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$  М; органическая фаза толуол;  $\lambda_{\text{возб}} = 520$  нм;  $\lambda_{\text{люм}} = 550$  нм). Найдены условия количественного определения кодеина в виде его ионного ассоциата с реактивом Драгендорфа в фазе сорбента путем измерения коэффициента диффузного отражения при  $\lambda = 520$  нм.

2. В найденных оптимальных условиях установлена возможность определения кодеина методами люминесценции (в растворах) и спектрометрии диффузного отражения (в твердой фазе). Пределы обнаружения кодеина составляют 3 мг/дм<sup>3</sup> и 9 мг/дм<sup>3</sup> соответственно. Для определения низких содержаний кодеина в растворах предложено использовать флуоресценцию экстракта его ионного ассоциата с эозином в толуоле. Предел обнаружения кодеина составляет 0,4 мкг/дм<sup>3</sup>.

3. Предложены схемы пробоподготовки исследуемых объектов, адаптированные к виду и условиям измерения аналитического сигнала, для выделения кодеина и минимизации мешающего влияния сопутствующих компонентов при его последующем определении. Для лекарственных препаратов и внутренних органов человека использован метод ТСХ-разделения. Мешающее влияние компонентов при анализе мочи человека, в частности морфина, минимизировали процедурой экстракции кодеина диэтиловым эфиром.

4. Разработаны методики определения кодеина в лекарственных препаратах методами люминесценции (40 – 1200 мг/дм<sup>3</sup>) и спектроскопии

диффузного отражения (50 – 1200 мг/дм<sup>3</sup>). Разработана люминесцентная методика определения кодеина во внутренних органах человека – печени, стенке желудка (0,01 – 0,75 мг/г). Разработана экстракционно-флуориметрическая методика определения кодеина в моче человека (30 – 320 мкг/дм<sup>3</sup>). Относительные стандартные отклонения при проведении соответствующих измерений не превышают 0,07.

5. Разработанные методики успешно апробированы на реальных экспертных образцах лекарственных препаратов, внутренних органов и мочи человека.



**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Машковский, М. Д. Лекарственные средства / М. Д. Машковский. – М.: Новая волна, 2014. – 1216 с.
2. 20<sup>th</sup> WHO model list of essential medicines. – World Health Organization, 2017 – 58 p.
3. Постановление правительства Российской Федерации от 30 июня 1998г. № 681 «Об утверждении перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации».
4. Демидова, О. В. Предварительное сообщение о 68 случаях злоупотребления дезоморфином / О. В. Демидова, С. О. Мохначев // Наркология. – 2011. – № 11. – С. 96-97.
5. Улезко, Т. А. Дезоморфиновая наркомания / Т. А. Улезко // Наркология. – 2011. – № 10. – С. 54-57.
6. Катаев, С. С. Определение дезоморфина в моче / С. С. Катаев, Н. Б. Зеленина, Е. А. Шилова // Проблемы экспертизы в медицине. – 2007. – № 1. – С. 32-36.
7. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 17 мая 2012г. № 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 активные вещества".
8. Moffat, A. C. Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material / A. C. Moffat, M. D. Osselton, B. Widdop. – London: The Pharmaceutical Press, 2011. – 2480 p.
9. Веселовская, Н. В. Наркотики. Свойства, действие, фармакокинетика, метаболизм / Н. В. Веселовская, А. Е. Коваленко. – М.: Триада-Х, 2000. – 204 с.

10. Руденко, Б. А. Химико-аналитическое определение наркотических и допинговых средств / Б. А. Руденко, А. Е. Коваленко, К. А. Галузин, Г. И. Руденко, Д. А. Кардонский, Д. А. Гришин, А. А. Еганов. – М.: Нарконет, 2007. – 368 с.
11. Быков, Г. В. История органической химии. Открытие важнейших органических соединений / Г. В. Быков. – М.: Наука, 1978. – 379 с.
12. Мелентьева, Г. А. Фармацевтическая химия / Г. А. Мелентьева, Л. А. Антонова. – М.: Медицина, 1985. – 480 с.
13. Крамаренко, В.Ф. Токсикологическая химия / В.Ф. Крамаренко. – Киев: Выща школа, 1989. – 447 с.
14. Швайкова, М. Д. Токсикологическая химия / М. Д. Швайкова. – М.: Медицина, 1975. – 373 с.
15. Орехов, А. Н. Химия алкалоидов / А.Н. Орехов. – М.: РАН, 1955. – 868 с.
16. UV and IR spectra pharmaceutical substances / Edited by H. -W. Dibbern, R. M. Müller, E. Wirbitzki. – Aulendorf: ECV, 2002. – 1764 p.
17. Еремин, С. К. Анализ наркотических средств / С. К. Еремин, Б. Н. Изотов, Н. В. Веселовская. – М.: Мысль, 1993. – 271 с.
18. Софронов, А. Г. Опиатная наркомания / А. Г. Сафронов. - СПб.: Изд. Воен.-мед. акад., 1998. - 57 с.
19. Пятницкая, И. Н. Наркомании: руководство для врачей / И. Н. Пятницкая. - М.: Медицина, 1994. - 541 с.
20. Бориневич, В. В. Наркомании: клиника, патогенез и лечение морфинизма, кодеинизма, опиоманий и других опийных наркоманий / В. В. Бориневич. - М.: Б.и., 1963. - 275 с.
21. Демина, М.В. Особенности клиники и терапии кодеиновой зависимости / М. В. Демина // Вопросы наркологии. – 2005. – № 4-5,– С. 76-79.
22. Шевцова, Ю.Б. О зависимости от лекарственных средств, содержащих кодеин / Ю. Б. Шевцова // Наркология. – 2007. – № 6. – С. 68-70.

23. Справочник Видаль 2016. Лекарственные препараты в России. – М.: Видаль Рус, 2016. – 1240 с.
24. Регистр лекарственных средств России. [Электронный ресурс]: <http://www.rlsnet.ru>. – М.: группа компаний РЛС, 2018.
25. Winek, C. L. Winek's drug and chemical blood-level data 2001 / C. L. Winek, W. W. Wahba, C. L. Jr. Winek, T. W. Balzer // *Forensic Sci. Int.* – 2001. – Vol. 122. – P. 107-23.
26. Uges, D. R. A. TIAFT reference blood level list of therapeutic and toxic substances / D. R. A. Uges // *TIAFT bulletin of the international association of forensic toxicologist.* – 1996. – Vol. 26, № 1. – 16 p.
27. Gerostamoulos, J. Involvement of codeine in drug-related deaths / J. Gerostamoulos, M. P. Burke, O. H. Drummer // *Am J Forensic Med Pathol.* – 1996. – Vol. 17, № 4. – P. 327-35.
28. Nakamura, G. R. Antemortem conversion of codeine to morphine in man / G. R. Nakamura, E. C. Griesemer, T. T. Noguchi // *J Forensic Sci.* – 1976. – Vol. 21, № 3. – P. 518-24.
29. Maurer, H.H. Systematic toxicological analysis of drugs and their metabolites by gas chromatography-mass-spectrometry / H.H. Maurer // *J. Chromatogr.* – 1992. – V. 580. – P. 3-41.
30. Drummer, O.H. Capillary gas chromatographic drug screen for use in forensic toxicology / O.H. Drummer, S. Horomidis, S. Kourtis, M.L. Syrjanen, P. Tippett // *J. Anal. Toxicol.* – 1994. – V. 18. – P. 134-138.
31. Мелентьев, А. Б. Практическое руководство по скринингу лекарственных, наркотических средств и их метаболитов методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором для целей судебной токсикологии / А. Б. Мелентьев. – Челябинск, 2001. – Ч.1. – 62 с.
32. Мелентьев, А. Б. Влияние pH среды водной фазы на экстракцию веществ с различными кислотно-основными свойствами / А. Б. Мелентьев // *Судебно-медиц. экспертиза.* – 2003. – № 2. – С. 40-43.

33. Бушуев, Е. С. Современные проблемы химико-токсикологического анализа наркотических средств и психотропных веществ / Е. С. Бушуев, Р. В. Бабаханян, В. Н. Куклин. – СПб.: Изд-во НИИХ СПбГУ, 2003. – 127 с.
34. Раменская, Г. В. ТСХ-скрининг токсикологически значимых соединений, изолируемых экстракцией и сорбцией / Г. В. Раменская, Г. М. Родионова, Н. И. Кузнецова, А. Е. Петухов. – М.: ГЕОТАР-Медиа, 2010. – 240 с.
35. Калетина, Н. И. Токсикологическая химия / Н. И. Калетина. – М.: ГЕОТАР-Медиа, 2007. – 1008 с.
36. Токсикологическая химия / Под ред. Р. У. Хабриева, Н. И. Калетиной. – М.: ГЕОТАР-Медиа, 2010. – 752 с.
37. Мелентьев, А. Б. Химико-токсикологических анализ органов и тканей с использованием метода пробоподготовки «Кэтчерс» / А. Б. Мелентьев, Г. А. Латышева // Сборник тезисов конференции АСТЕ'2013. – М.: Издат. группа «Граница», 2013. – С. 20-22.
38. Simpson, D. Screening for drugs of abuse (II): cannabinoids, lysergic acid diethylamide, buprenorphine, methadone, barbiturates, benzodiazepines and other drugs / D. Simpson, R. A. Brainthnaite, D. R. Jarvie, M. J. Stewart, S. Walker, I. W. Watson, B. Widdop // *Ann. Clin. Biochem.* – 1997. – V. 34. – P. 460-510.
39. Drummer, O. H. Chromatographic screening techniques in systematic toxicological analysis / O. H. Drummer // *J. Chromatogr.* – 1999. – V.733. – P.27-45.
40. Recommended methods for the detection and assay of heroin, cannabinoids, cocaine, amphetamine, methamphetamine and ring-substituted amphetamine derivatives in biological specimens – New York: United Nations. Division of Narcotic Drugs, 1995. – 36 p.
41. Romberg, R. W. Comparison of the hydrolysis rates of morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide with acid and beta-glucuronidase / R. W. Romberg, L. Lee // *J. Analyt. Toxicol.* – 1995. – V. 19. – P. 157-162.

42. Maurer, H. H. Mass-spectral and GC data of drugs, poisons, pesticides, pollutants and their metabolites/ H. H. Maurer, K. Pflieger, A. A. Weber. – Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, 1992. – 3220 p.

43. Foltz, R. L. GC/MS assays for abused drugs in body fluids / R. L. Foltz, A. F. Fentiman, R. B. Foltz. – Washington: NIDA research monograph series, 1980. – 198 p.

44. Fish, F. Hydrolysis of morphine glucuronide / F. Fish, T. S. Hayes // J. Forensic. Sci. – 1974. – V. 19. – P. 676-683.

45. Paul, B. D. Simultaneous identification and quantitation of codeine and morphine in urine by capillary gas chromatography and mass spectroscopy / B. D. Paul, L. D. Mell, J. M. Mitchell, J. Irving, A. J. Novak // J.Analyt.Toxicol. – 1985. – V. 9. – P. 222-226.

46. Тернон, М. Новые методы иммуноанализа / М. Тернон, Д. Р. Банхем, К. А. Колкотт. М.: Мир, 1991. – 145 с.

47. Bowie, L. J. Simultaneous determination of monoacetylmorphine, morphine, codeine and other opiates by GC/MS / L. J. Bowie, P. B. Kirkpatrick // J. Analyt. Toxicol. – 1989. – V. 13. – P.326-329.

48. Изотов, Б. Н. Анализ опиатов в моче / Б. Н. Изотов, Н. В. Веселовская, С. Б. Лисовская. – М.: ММА им. И.М. Сеченова Минздрава РФ, 2002 г. – 79 с.

49. Cone, E. J. Assay for codeine, morphine and ten potential urinary metabolites by gas chromatography-mass fragmentography / E. J. Cone, W. D. Darwin, W. F. Buchwald // J. Chromatogr. – 1983. – V. 275. – P. 307-318.

50. Wu Chen, N. B. Simultaneous quantification of morphine and codeine in biological samples by electron impact mass fragmentography / N. B. Wu Chen, M. I. Schaffer, R. L. Lin, R. J. Stein // J. Analyt. Toxicol. – 1982. – V. 6. – P.231-234.

51. Катаев, С. С. Применение твердофазной экстракции в исследовании крови на наркотические и лекарственные вещества / С. С. Катаев, О. Н. Дворская // Суд.-мед. эксперт. – 2012. – № 4. – С. 38-42.

52. Tai, S. S.-C. The certification of morphine and codeine in a human urine standard reference material / S. S.-C. Tai, R. G. Christensen, R. C. Paule, L.C. Sander, M. J. Welch // *J. Analyt. Toxicol.* – 1994. – Vol. 18. – P. 7-12.

53. Fuller, D. C. A simplified procedure for the determination of free codeine, free morphine and 6-monoacetylmorphine in urine / D. C. Fuller, W. H. Andersen // *J. Analyt. Toxicol.* – 1992. – Vol. 16. – P. 315-318.

54. Goldberger, B. A. Disposition of heroin and its metabolites in heroin-related deaths / B. A. Goldberger, E. J. Cone, T. M. Grant, Y. H. Caplan, B. S. Levine, J. E. Smialek // *J. Analyt. Toxicol.* – 1994. – Vol. 18. – P. 22-28.

55. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 12 мая 2010 г. №346н «Об утверждении порядка организации и производства судебно-медицинских экспертиз в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации».

56. Harvey, D. *Modern analytical chemistry* / D. Harvey. – Boston: McGraw-Hill, 2000. – 798 p.

57. Vitha, M. F. *Chromatography: principles and instrumentation* / M. F. Vitha – Hoboken: Wiley, 2017. – 280 p.

58. de Zeeuw, R. A. Thin-layer chromatographic R<sub>f</sub> values of toxicologically relevant substances on standardized systems / R. A. de Zeeuw. – Wienheim-New York: VCH, 1992. – 308 p.

59. Stead, A. H. Standardized thin-layer chromatographic systems for the identification of drugs and poisons / A. H. Stead, R. Gill, T. Wright, J. P. Gibbs, A. C. Moffat // *Analyst.* – 1982. – Vol. 107. – P. 1106-1168.

60. Горбачева, Н. А. Применение ТСХ-анализа при судебно-химическом исследовании мочи на опиаты / Н. А. Горбачева, А. М. Орлова // *СМЭ.* – 2003. – № 3. – С. 34-38.

61. Nair, N. K. Analysis of illicit heroin: an effective TLC system for separating 8 opiates and 5 adulterants / N. K. Nair, V. Navaratnam, V. Rajananda // *J. Chromatogr.* – 1986. – V. 366, № 6. – P. 363-372.

62. van Welsum, R. A. A simplified procedure for the identification of drugs from the illicit street market by thin-layer chromatography / R. A. van Welsum // *J. Chromatogr.* – 1973. – V. 78, № 1. – P. 237-240.

63. Budd, R. D. Screening and confirmation of opiates by thin layer chromatography / R. D. Budd, D. F. Mathis, W. J. Leung // *Clinical Toxicology.* – 1980. – V. 16. – P. 61-66.

64. Kaistha, K. K. TLC techniques for the identification of narcotics, barbiturates and CNS stimulants in drug abuse urine screening program / K. K. Kaistha, J. H. Jaffe // *J. of Pharmaceutical Sciences.* – 1972. – V. 61. – P.679-688.

65. Steele, J. A. Solvent systems for the identification of opiates in narcotic seizures by thin-layer chromatography / J. A. Steele // *J. Chromatogr.* – 1965. – V.19. – P. 300-303.

66. Blass, K. G. A simple, rapid thin-layer chromatographic drug screening procedure / K. G. Blass, R. J. Thibert, T. F. Draisey // *J. Chromatogr.* – 1974. – V. 95. – P. 75-79.

67. Gough, T. A. Identification of major drugs of abuse using chromatography / T. A. Gough, P. B. Baker // *J. Chromatogr. Sci.* – 1982. – V. 20. – P. 289-329.

68. Engelke, B. F. Thin-layer chromatography combined with color test reactions for preliminary identification of papaveraceous alkaloids / B. F. Engelke, P. G. Vincent // *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* – 1979. – V. 62. – P. 538-544.

69. Masoud, A. N. Systematic identification of drugs of abuse II: TLC / A. N. Masoud // *J. of Pharmaceutical Sciences.* – 1976. – V. 65. – P. 1585-1589.

70. Mule, S. J. Identification of narcotics, barbiturates, amphetamines, tranquillizers and psychotomimetics in human urine / S. J. Mule // *J. Chromatogr.* – 1969. – V. 39. – P. 302-309.

71. Информационное письмо об определении морфина при судебно-химическом исследовании трупного материала. М.: Минздрав СССР, 1991. – 11 с.

72. Wallace, J. E. A sensitive thin-layer chromatographic technique for determining morphine in urine / J. E. Wallace, J. D. Biggs, J. H Merritt, H. E. Hamilton, K. Blum // *J. Chromatogr.* – 1972. – V. 71. – P. 135-140.

73. Шаршунова, М. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии / М. Шаршунова, В. Шварц, Ч. Михалец. – М.: Мир, 1980. – Т.1. – 210 с.

74. Паньжин, В. С. Применение ТСХ для контроля качества многокомпонентных препаратов «Пенталгин ФС» и «Пенталгин Н» / В. С. Паньжин, Е. В. Будко, Г. Б. Голубицкий // *Заводская лаборатория. Диагностика материалов.* – 2009. – Т. 75, № 8. – С. 25-27.

75. Dimitrovska, A. Determination of propyphenazone, paracetamol, caffeine and codeine phosphate with thin-layer chromatography / A. Dimitrovska, S. Trajkovic-Jolevska, A. Nancovska, M. Ilievska // *Bulletin of the chemists and technologists of Macedonia.* – 1995. – Vol. 14, № 1. – P. 39-41.

76. Тыжигирова, В. В. Анализ комбинированных лекарственных препаратов / В. В. Тыжигирова. – Иркутск: ИГМУ, 2016. – 108 с.

77. Золотов, Ю. А. Основы аналитической химии. Кн. 1. Общие вопросы. Методы разделения / Ю. А. Золотов [и др.]. – М.: Высшая школа, 2004. – 361 с.

78. Царев, Н. И. Практическая газовая хроматография / Н. И. Царев, В. И. Царев, И. Б. Катраков – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2000. – 156 с.

79. Lee, H. M. Determination of morphine and codeine in blood and bile by gas chromatography with a derivatization procedure / H. M. Lee, C. W. Lee // *J. Analyt. Toxicol.* – Vol. 15, № 4. – P. 182-187.

80. Edlund, P. O. Determination of opiates in biological samples by glass capillary gas chromatography with electron-capture detection / P. O. Edlund // *J. Chromatogr. A.* – Vol. 206, № 1. – P. 109-116.

81. Raikos, N. Analysis of anaesthetics and analgesics in human urine by headspace SPME and GC / N. Raikos, G. Theodoridis, E. Alexiadou, H. Gika, H.



Argiriadou, H. Parlapani, H. Tsoukali // *J. Sep. Sci.* – 2009. – V. 32, № 7. – P. 1018-1026.

82. Nakamura, G. R. Determination of morphine and codeine in post-mortem specimens / G. R. Nakamura, E. L. Way // *Analyt. Chem.* – 1975. – Vol. 47, № 4. – P. 775-778.

83. Seno, H. Gas chromatography with surface ionization detection: a highly sensitive method for determining underivatized codeine and dihydrocodeine in body fluids / H. Seno, H. Hattori, S. Kurono, T. Yamada, T. Kumazawa, A. Ishii, O. Suzuki // *J. of Chromatography B Biomed Appl.* – 1995. – Vol. 672, № 2. – P. 189-195.

84. Lau, O. -W. Simultaneous determination of some active ingredients in cough-cold syrups by gas-chromatography / O. -W. Lau, Y. -M. Cheung // *Analyst.* – 1990. – V. 115. – P. 1349-1353.

85. Dechene, E. B. Gas chromatographic analysis of acetylsalicylic acid, phenacetin, caffeine and codeine in APC and codeine tablets / E. B. Dechene, L. H. Booth, M. J. Caughey // *J. Pharm. Pharmacol.* – 1969. – Vol. 21, № 10. – P. 678-680.

86. Vu-Duc, T. Simultaneous detection and quantitation of O-6-monoacetylmorphine, morphine and codeine in urine by gas chromatography with nitrogen specific and/or flame ionization detection / T. Vu-Duc, A. Vernay // *Biomed. Chromatogr.* – 1990. – Vol. 4, № 2. – P.65-69.

87. Хмельницкий, Р. А. Хромато-масс-спектрометрия / Р. А. Хмельницкий, Е. С. Бродский. – М.: Химия, 1984. – 216 с.

88. Лебедев, А. Т. Масс-спектрометрия для анализа объектов окружающей среды / А. Т. Лебедев. – М.: Техносфера, 2013. – 632 с.

89. Meatherall, R. GC-MS quantitation of codeine, morphine, 6-acetylmorphine, hydrocodone, hydromorphone, oxycodone, and oxymorphone in blood / R. Meatherall // *J. Analyt. Toxicol.* – 2005. – Vol. 29, № 5. – P.301-308.

90. Geier, A. Evaluation of a solid-phase extraction procedure for the simultaneous determination of morphine, 6-monoacetylmorphine, codeine and

dihydrocodeine in plasma and whole blood by GC/MS / A. Geier, D. Bergemann, L. von Meyer // *Int. J. Legal Med.* – 1996. – Vol. 109, № 2. – P. 80-83.

91. Musshoff, F. Evaluation of a method for simultaneous quantification of codeine, dihydrocodeine, morphine, and 6-monoacetylmorphine in serum, blood, and postmortem blood / F. Musshoff, T. Daldrup // *Int. J. Legal Med.* – 1993. – Vol. 106, № 2. – P. 107-109.

92. Watson, D. G. Analysis of unconjugated morphine, codeine, normorphine and morphine as glucuronides in small volumes of plasms from children // D. G. Watson, Q. Su, J. M. Midgley, E. Doyle, N. S. Morton // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 1995. – Vol. 13, № 1. – P. 27-32.

93. Meatherall, R. GC-MS confirmation of codeine, morphine, 6-acetylmorphine, hydrocodone, hydromorphone, oxycodone, and oxymorphone in urine / R. Meatherall // *J. Analyt. Toxicol.* – 1999. – Vol. 23, № 3. – P. 177-186.

94. Sumandeeep, R. Rapid analysis of urinary opiates using fast gas chromatography-mass spectrometry and hydrogen as a carrier gas / R. Sumandeeep, R. K. Garg, A. Singla // *Egyptian J. Forensic Sci.* – 2014. – Vol. 4. – P. 100-107.

95. Weinmann, W. Automated solid-phase extraction and two-step derivatisation for simultaneous analysis of basic illicit drugs in serum by GC/MS / W. Weinmann, M. Renz, S. Vogt, S. Pollak // *Int. J. Legal Med.* – 2000. – Vol. 113, № 4. – P. 229-235.

96. Hofmann, U. Highly sensitive gas chromatographic-tandem mass-spectrometric method for the determination of morphine and codeine in serum and urine in the femtomolar range / U. Hofmann, S. Seefried, E. Schweizer, T. Ebner, G. Mikus, M. Eichelbaum // *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* – 1999. – Vol. 727, № 1-2. – P. 81-88.

97. Paul, B. D. A practical approach to determine cutoff concentrations for opiate testing with simultaneous detection of codeine, morphine, and 6-acetylmorphine in urine / B. D. Paul, E. T. Shimomura, M. L. Smith // *Clin. Chem.* – 1999. – Vol. 45, № 4. – P. 510-519.

98. Broussard, L. A. Improved gas chromatography-mass spectrometry method for simultaneous identification and quantification of opiates in urine as propionyl and oxime derivatives / L. A. Broussard, L. C. Presley, M. Tanous, C. Queen // *Clin. Chem.* – 2001. – Vol. 47, № 1. – 127-129.

99. Воронин, А. В. Идентификация морфина и кодеина методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии в химико-токсикологических исследованиях / А. В. Воронин, И. Ф. Шаталаев, Т. В. Воеводина, П. П. Пурыгин // *Вестник СамГУ, Естественнонаучная серия.* – 2007. – Т. 56, № 6. – С. 385-392.

100. Мелентьев, А. Б. Определение морфина и кодеина в крови в виде их пропионовых эфиров методом газовой хроматографии масс-спектрометрии / А. Б. Мелентьев // *Журнал аналитической химии.* – 2004. – Т. 59, № 6. – С. 637-641.

101. Broussard, L. A. Simultaneous identification and quantitation of codeine, morphine, hydrocodone, and hydromorphone in urine as trimethylsilyl and oxime derivatives by gas chromatography-mass-spectrometry / L. A. Broussard, L. C. Presley, T. Pittman, R. Clouette, G. H. Wimbish // *Clin. Chem.* – 1997. – Vol. 43, № 6. – P. 1029-1032.

102. Дериватизация в ГХ/МС-анализе лекарственных и наркотических веществ, имеющих токсикологическое значение: материалы к семинару судебно-медицинских экспертов. – М.: РЦСМЭ; БСМЭ МЗ МО, 2002. – 86 с.

103. Giorgi, S. N. A 5-year stability study of common illicit drugs in blood / S. N. Giorgi, J. E. Meeker // *J. Analyt. Toxicol.* – 1995. – Vol. 19, № 6. – P. 392-398.

104. Snyder, L. R. Introduction to modern liquid chromatography / L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. W. Dolan. – Hoboken: Wiley, 2010. – 912 p.

105. Костарной, А. В. Использование высокоэффективной жидкостной хроматографии для анализа многокомпонентных лекарственных препаратов / А. В. Костарной, Г. Б. Голубицкий, Е. М. Басова, Е. В. Будко, В. М. Иванов // *Журнал аналитической химии.* – 2008. – Т. 63, № 6. – С. 566-580.

106. XII Государственная фармакопея Российской Федерации. Часть 1. – М.: изд-во «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2008. – 704 с.

107. European Pharmacopoeia. 8<sup>th</sup> edition. – Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care, 2013. – 3655 p.

108. The Japanese Pharmacopoeia. 17<sup>th</sup> edition. – Tokyo: The Ministry of Health, Labour and Welfare, 2016. – 2629 p.

109. The Pharmacopeia of the United States of America, thirty-second revision and the National Formulary, twenty-seventh edition (USP32 – NF27) [CD]. – Rockville: The United States Pharmacopoeial Convention, 2009.

110. Вергейчик, Е. Н. ВЭЖХ в анализе сложных лекарственных препаратов, содержащих пропифеназон / Е. Н. Вергейчик, Н. С. Онегова // Фармация. – 2001. – № 3. – С. 24-26.

111. Dienes-Nagy, A. Method for quantification of morphine and its 3- and 6-glucuronides, codeine, codeine glucuronide and 6-monoacetylmorphine in human blood by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry for routine analysis in forensic toxicology / A. Dienes-Nagy, L. Rivier, C. Giroud, M. Augsburger, P. Mangin // J. Chromatogr. A. – 1999. – Vol. 854, № 1-2. – P. 109-118.

112. Zuccaro, R. Simultaneous determination of heroin, 6-monoacetylmorphine, morphine, and its glucuronides by liquid chromatography-atmospheric pressure ionspray-mass spectrometry / R. Zuccaro, R. Ricciarello, S. Pichini, R. Pacifici, I. Altieri, M. Pellegrini, G. D'Ascenzo // J. Analyt. Toxicol. – 1997. – Vol. 21, № 4. – P. 268-277.

113. Manassra, A. Simultaneous HPLC analysis of pseudophedrine hydrochloride, codeine phosphate, and triprolidine hydrochloride in liquid dosage forms / A. Manassra, M. Khamis, M. El-Dakiky, Z. Abdel-Qader, F. Al-Rimawi // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2010. – Vol. 54, № 4. – P. 991-993.

114. Maslarska, V. Simultaneous determination and validation of paracetamol and codeine phosphate in pharmaceutical preparation by RP-HPLC / V. Maslarska, J.

Tencheva // *Int. J. Pharmacy and Pharmaceutical Sci.* – 2013. – Vol. 5, № 2. – P. 417-419.

115. Bjork, M. K. Determination of 19 drugs of abuse and metabolites in whole blood by high-performance liquid chromatography-tandem-mass-spectrometry / M. K. Bjork, M. K. Nielsen, L. O. Markussen, H. B. Klinke, K. Linnet // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2010. – Vol. 396, № 7. – P. 2393-2401.

116. Liao, Q. Rapid simultaneous determination of codeine and morphine in plasma using LC-ESI-MS/MS: application to a clinical pharmacokinetic study / Q. Liao, Y. Deng, Z. Xie, B. Pan, L. Zhang // *J. Sep. Sci.* – 2009. – V. 32, № 2. – P. 202-211.

117. Kartal, M. LC method for the analysis of paracetamol, caffeine and codeine phosphate in pharmaceutical preparations / M. Kartal // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2001. – Vol. 26, № 5-6. – P. 857-864.

118. Altun, M. L. LC method for the analysis of acetylsalicylic acid, caffeine and codeine phosphate in pharmaceutical preparations / M. L. Altun, T. Ceyhan, M. Kartal, T. Atay, N. Ozdemir, S. Cevheroglu // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2001. – Vol. 25, № 1. – P. 93-101.

119. Weingarten, B. Determination of codeine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection / B. Weingarten, H. Y. Wang, D. M. Roberts // *J. Chromatogr. A.* – 1995. – Vol. 696, № 1. – P. 83-92.

120. Logan, B. K. Rapid screening for 100 basic drugs and metabolites in urine using cation exchange solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array detection / B. K. Logan, D. T. Stafford, I. R. Tebbett, C. M. Moore // *J. Analyt. Toxicol.* – 1990. – Vol. 14, № 3. – P.154-159.

121. Gerostamoulos, J. Simultaneous determination of 6-monoacetylmorphine, morphine and codeine in urine using high-performance liquid chromatography with combined ultraviolet and electrochemical detection / J. Gerostamoulos, K. Crump, I. M. McIntyre, O. H. Drummer // *J. Chromatogr.* – 1993. – Vol. 617, № 1. – P. 152-156.

122. Ларионова, С. Г. Оптимизация условий анализа таблеток сложного состава анальгезирующего и спазмолитического действия / С. Г. Ларионова, Н. Н.

Нечаева, Е. Б. Нечаева, П. В. Назаренко, Г. А. Нестерова // Фармация. – 2002. – Т. 51, № 1. – С. 16-19.

123. Садек, П. Растворители для ВЭЖХ / П. Садек. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2006. – 704 с.

124. Liaw, W. J. Determination of morphine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection: application to human and rabbit pharmacokinetic studies / W. J. Liaw, S. T. Ho, J. J. Wang, J. H. Li // J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. – 1998. – Vol. 714, № 2. – P. 237-245.

125. Голубицкий, Г. Б. Количественный анализ таблеток «Пенталгин Н» методами градиентной и изократической жидкостной хроматографии / Г. Б. Голубицкий, Е. В. Будко, В. М. Иванов // Журнал аналитической химии. – 2006. – Т. 61, № 1. – С. 74-79.

126. Lau, I. –W. High-performance liquid chromatographic determination of active ingredients in cough-cold syrups with indirect conductometric detection / I. –W. Lau, C. –S. Mok // J. Chromatogr. A. – 1995. – Vol. 693, № 1. – P. 45-54.

127. Farsam, H. Spectrophotometric determination of codeine in pharmaceutical preparations / H. Farsam, H. H. Yahya-Saeb, A. Fawzi // Int. J. Pharm. – 1981. – Vol. 7, № 4. – P. 343-348.

128. Fazel, S. A new procedure for the determination of codeine in pharmaceutical preparations / S. Fazel, H. Furoozandeh // DARU J. Pharm. Sci. – 1990. – Vol. 1, № 2. – P. 95-101.

129. Elsayed, M. A.-H. Spectrophotometric determination of acetaminophen, salicylamide and codeine phosphate in tablets / M. A.-H. Elsayed, S. F. Belal, A.-F. M. Elwalily, H. Abdine // Analyst. – 1979. – Vol. 104. – P. 620-625.

130. Криминалистическое исследование наркотических веществ кустарного изготовления. – М.: ВНИИСЭ, 1982. – 230 с.

131. Лобачев, А. Л. Анализ многокомпонентных смесей на примере лекарственного средства «Пенталгин» методами ТСХ и ИК-Фурье-спектроскопии

/ А. Л. Лобачев, Н. А. Редькин, Ю. В. Трифонова // Вестник СамГУ. – 2014. – № 10. – С. 164-173.

132. Schulz, H. Determination of alkaloids in capsules, milk and ethanolic extracts of poppy (*Papaver Somniferum* L.) by ATR-FT-IR and FT-Raman spectroscopy / H. Schulz, M. Baranska, R. Quilitzsch, W. Schutze // *Analyst.* – 2004. – V. 129. – P. 917-920.

133. Гришаева, Т.И. Методы люминесцентного анализа / Т.И. Гришаева. – СПб.: Проффессионал, 2003. – 226 с.

134. Паркер, С. Фотолюминесценция растворов / С. Паркер. – М.: Мир, 1972. – 512 с.

135. Chalmers, R.A. Spectrofluorimetric analysis of mixture of the principal opium alkaloids / R.A. Chalmers, G.A. Wadds // *Analyst.* – 1970. – V. 95. – P. 234-241.

136. Duerkop, A. Sensitive terbium probes for luminescent determination of both alkaline phosphate and codeine phosphate / A. Duerkop, D. Aleksandrova, Y. Scripinets, A. Yegorova, E. Vityukova // *Annals of the New York Academy of Science.* – 2008. – V. 1130. – P. 172-178.

137. Немихин, В. В. Изучение спектролюминесцентных свойств кодеина с целью его определения в некоторых лекарственных препаратах / В. В. Немихин, С. В. Качин, Т. С. Шахворостова // *Журнал Сибирского Федерального университета.* – 2012. – Т. 5, № 3. – С. 289-295.

138. Анализаторы жидкости типа «Флюорат-02». Модификация «Флюорат-02-Панорама». Руководство по эксплуатации. – СПб.: ООО «Люмэкс», 2004. – 39 с.

139. Мчедлов-Петросян, Н. О. Флуоресцеиновые красители в растворах – хорошо изученные системы? / Н. О. Мчедлов-Петросян // *Вісник Харківського національного університету. Хімія.* – 2004. – Вип. 11 (34), № 626. – С. 221-312.

140. Kubelka, P. Ein Beitrag zur Optik der Farbanstriche / P. Kubelka, F. Munk // *Z. Tech. Phys.* – 1931. – Bd. 12. – S. 593-601.

141. Рунов, В.К. Оптические сорбционно-молекулярно-спектроскопические методы анализа. Методические вопросы количественных измерений в спектроскопии диффузного отражения / В.К. Рунов, В.В. Тропина // Журн. аналит. химии. – 1996. – Т. 51, № 1. – С. 71-77.

142. Саввин, С.Б. Сорбционно-спектроскопические и тест-методы определения ионов металлов на твердой фазе ионообменных материалов / С. Б. Саввин, В.П. Дедкова, О.П. Швоева // Успехи химии. – 2000. – Т. 69, № 3. – С. 203-217.

143. Барсегян, С.С. Определение морфина и кодеина при судебно-химических исследованиях с применением одноквадрупольного масс-селективного детектора, сопряженного с ВЭЖХ-системой / С.С. Барсегян, Е.А. Пурвина, Е.М. Саломатин, Т.А. Свиридова, Т.Н. Федорова // Судебно-медицинская экспертиза. – 2012. - №6. – С. 33-37.



**ПРИЛОЖЕНИЯ**

## Приложение 1

Краевое государственное бюджетное  
учреждение здравоохранения  
"Красноярское краевое бюро  
судебно-медицинской экспертизы"  
(КГБУЗ ККБСМЭ)

пр. Мира, д. 35, г. Красноярск, 660049  
Тел.: (391) 227-17-39  
Факс: (391) 227-25-71  
E-mail: [sme@sme.krsk.ru](mailto:sme@sme.krsk.ru), [krsk@sudmed.info](mailto:krsk@sudmed.info)  
http: [www.sme.krsk.ru](http://www.sme.krsk.ru)

ОКПО/ОГРН 21890699/1032402947378  
ИНН/КПП 2466064557/246601001

от \_\_\_\_\_ № \_\_\_\_\_  
на № \_\_\_\_\_  
г \_\_\_\_\_ 7

УТВЕРЖДАЮ

Начальник КГБУЗ «ККБСМЭ»

А.В. Донской



«05» \_\_\_\_\_ 2018 г.

## АКТ

о внедрении в практику работы судебно-химического отделения КГБУЗ «Красноярское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы» результатов научно-исследовательской работы

Результаты диссертационной работы Немихина В.В. «Определение кодеина в лекарственных препаратах и биологических объектах методами молекулярной спектроскопии» внедрены в практику судебно-химического отделения КГБУЗ «Красноярское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы» с 9.01.2018г. Разработанные в диссертации методики определения кодеина в лекарственных препаратах и биологических объектах используются в судебно-химическом отделении при выполнении судебно-химических экспертиз и исследований.

Зав. судебно-химическим  
отделением, к.х.н.

Г. А. Слащенин

## Приложение 2

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ  
Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»



**Институт цветных металлов и  
материаловедения**

660041, Красноярск, пр. Свободный, 79  
Телефон: (391) 206-36-98 Факс: (391) 244-86-25  
E-mail: [vnbar79@mail.ru](mailto:vnbar79@mail.ru)

На 15.03.2018 № 041  
от \_\_\_\_\_

**Справка**

о внедрении в учебный процесс Института цветных металлов и материаловедения Сибирского федерального университета результатов диссертационной работы Немихина Василия Васильевича «Определение кодеина в лекарственных препаратах и биологических объектах методами молекулярной спектроскопии»

Результаты диссертационной работы Немихина Василия Васильевича «Определение кодеина в лекарственных препаратах и биологических объектах методами молекулярной спектроскопии» используются преподавателями при чтении лекций и проведении семинарских занятий при подготовке магистров по программе «Химия окружающей среды, химическая экспертиза и экологическая безопасность».

Кроме того, аспиранты института (специальность 02.00.02 – аналитическая химия) при проведении научных исследований применяют предложенные в работе методологические решения по повышению чувствительности и селективности аналитических измерений, а также оптимизации способов пробоподготовки сложных биологических объектов.



*В.Н. Баранов*

В.Н. Баранов

Сагалаков С.А.  
(391)2062109

[Ssagalakov@sfu-kras.ru](mailto:Ssagalakov@sfu-kras.ru)