

## Химико-токсикологическое исследование мочи на наличие тропикамида

- ТУМИЛОВИЧ Е.Ю.**<sup>1</sup> ассистент кафедры токсикологической химии  
**КАРПЕНКО Ю.Н.**<sup>1</sup> к.ф.н., доцент кафедры токсикологической химии  
**КУРДИНА Л.Н.**<sup>2</sup> к.х.н., зав. химико-токсикологической лабораторией  
**ДВОРСКАЯ О.Н.**<sup>1,2</sup> к.ф.н., доцент кафедры токсикологической химии, врач клинической лабораторной диагностики химико-токсикологической лаборатории ГУЗ КНД №1
- ПОРСЕВА Н.Ю.**<sup>1</sup> к.ф.н., доцент кафедры УЭФ ФДПО и ФЗО
- <sup>1</sup> — ГБОУ ВПО Пермская государственная фармацевтическая академия Росздрова, 614990, г.Пермь, ул. Екатерининская, 101; тел./факс: (8342)282-58-65. E-mail: kaftox@mail.ru  
<sup>2</sup> — ГУЗ Краевой наркологический диспансер №1, 614068 г.Пермь, ул. Орджоникидзе, 95б; тел.: (8342) 237-42-48.

Приведены данные статистики обнаружения тропикамида в образцах, представленных на анализ в химико-токсикологическую лабораторию Краевого наркологического диспансера №1 г.Перми в 2010 г. Рассмотрены вопросы химико-токсикологического анализа данного препарата. Определена возможность использования тонкослойной хроматографии как предварительного метода обнаружения тропикамида. Описаны оптимальные условия определения тропикамида методом газожидкостной хроматографии. **Ключевые слова:** тропикамид, тонкослойная хроматография, газо-жидкостная хроматография, жидкость-жидкостная экстракция

### Введение

По официальным данным, в РФ насчитывается около 555 тыс. наркоманов. В данную группу попадают лица, состоящие на учёте и проходящие курсы лечения и медико-социальной реабилитации в наркологических диспансерах. Однако существует и вторая, более многочисленная категория наркозависимых лиц — это эпизодически употребляющие, не считающие себя зависимыми и не обращающиеся за медицинской помощью. Ни в одной стране мира не существует учёта таких людей, поэтому применяется эпидемиологический расчёт, исходя из возрастной популяции. По этим методикам расчёта, в целом, количество наркозависимых в Российской Федерации оценивают ориентировочно в 3, а по некоторым данным, в 5 млн чел. Количество официально зарегистрированных наркоманов не отражает реальную кар-

тину распространения наркомании, которая на самом деле удручающа.

В настоящее время в РФ наблюдается тенденция к замене традиционных наркотиков на более доступные и уголовно ненаказуемые психоактивные вещества (ПАВ), которые можно свободно приобрести в аптеке. С сожалением приходится констатировать тот факт, что Пермский край не остается в стороне от общероссийских тенденций. В последнее время аналитические службы Пермского края, целью которых является анализ биообъектов на наличие наркотических средств и ПАВ, все чаще фиксируют случаи злоупотребления холинолитическим средством — тропикамидом.

Первый случай обнаружения тропикамида в биожидкостях, доставленных на анализ в химико-токсикологическую лабораторию ГУЗ Краевого наркологического диспансера №1 (г.Пермь), зафиксирован в июне 2010 г. В период с июня по декабрь 2010 г. зафиксировано 62 случая обнаружения тропикамида в биообъектах (моча). Тропикамид был обнаружен в моче, поступившей из следующих подразделений Краевого наркологического диспансера: 7 — из поликлинического отделения и 17 — из отдела наркологических экспертиз (ОНЭ), а также извне: по одному случаю — из стационара №7 Краевой клинической наркологической больницы и Наркологического диспансера №3 (г. Кудымкар) и 36 случаев — из отделения острых отравлений (ООО) МСЧ №9 им. М.А. Тверье (рис. 1).

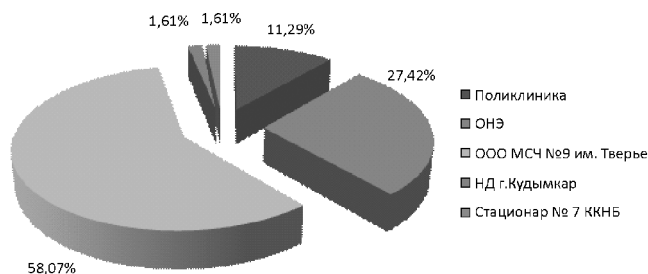


Рис. 1. Структура случаев обнаружения тропикамида в ХТЛ ГУЗ Краевой наркологический диспансер №1, г.Пермь в 2010 г.

Анализ статистических данных позволяет сделать вывод о том, что тропикамид встречается в биожидкостях как в изолированном (чистом) виде, так и в сочетании с другими наркотическими средствами и лекарственными веществами: кодеином, дезоморфином, парацетамолом, анальгином, фенobarбиталом, кофеином и др. Чаще всего в образцах мочи, представленных на анализ в ХТЛ, тропикамид встречается в виде комбинации с морфином, что подтверждает факт совместного применения наркозависимыми лицами тропикамида с классическими наркотиками, например с героином. Лица, употребляющие тропикамид, являются частыми пациентами отделения острых отравлений МСЧ №9 им. М.А. Тверье.

Тропикамид (N-этил-альфа-(гидроксиметил)-N-(4-пиридинилметил) бензолацетамид) — белый кристаллический порошок, мало растворим в воде, хорошо растворим в этаноле и хлороформе. Константа диссоциации рКа 5,2. Температура плавления от 96°C до 97°C [8].

Тропикамид (мидриацил, мидриум) выпускается в виде глазных капель с содержанием действующего вещества 0,5% и 1,0%. Блокируя м-холинорецепторы сфинктера радужки и цилиарной мышцы глаза, тропикамид быстро и кратковременно расширяет зрачок и парализует аккомодацию. В терапевтических целях препарат применяется конъюнктивально при исследовании глазного дна, для оценки состояния хрусталика, перед проведением хирургических операций, а также в комплексной терапии воспалительных заболеваний глаз [1]. Процент всасывания активного вещества, поступающего через слезные каналы в нос, относительно высокий, в связи с чем возможны побочные эффекты, обусловленные системным действием: сухость слизистой оболочки полости рта, тахикардия, головная боль, тошнота, рвота, бледность, нарушения со стороны ЦНС и мышечная ригидность. При применении антихолинэргических ЛС у детей могут проявиться психотические реакции [1, 2, 4].

В доступной нам литературе отсутствуют сведения о методах определения тропикамида в биологических объектах. Поэтому в связи с нарастающим токсикологическим значением данного препарата разработка методик обнаружения и количественного определения тропикамида в биологических жидкостях является актуальной задачей.

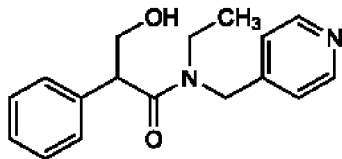


Рис. 2. Структурная формула тропикамида

## Материалы и методы

Для выбора условий определения тропикамида методами тонкослойной и газовой хроматографии, а также изучения условий его экстракции из модельных смесей мочи в качестве стандартного образца был использован препарат «тропикамид» в лекарственной форме глазные капли 1% (Polfa, Польша), соответствующий требованиям нормативной документации НД 42-9035-02.

Анализировали образцы мочи, доставленные на анализ в химико-токсикологическую лабораторию ГУЗ Краевого наркологического диспансера №1 (г.Пермь) на наличие наркотических средств и ПАВ.

Для обнаружения исследуемых веществ методом тонкослойной хроматографии использовали пластинки «Сорбфил» ПТСХ-П-В-УФ (ЗАО «Сорбполимер», Россия).

Идентификацию и количественное определение выделенного из биожидкостей тропикамида проводили с использованием газового хроматографа «Кристалл 2000М», оборудованного капиллярной колонкой НР-5 длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм и толщиной неподвижной жидкой фазы 0,25 мкм. Детектор — термоионный (ТИД). Обработка хроматографической информации осуществлялась с использованием программного обеспечения «Хроматек Аналитик 2.5».

Все используемые в работе растворители и реактивы имели чистоту степени «х.ч.».

## Результаты и обсуждение

### Идентификация тропикамида методом тонкослойной хроматографии

В качестве предварительного метода обнаружения тропикамида в экстрактах из мочи нами предложен метод тонкослойной хроматографии как наиболее доступный для идентификации веществ в условиях химико-токсикологической лаборатории. Анализ проводили на пластинках «Сорбфил» ПТСХ-П-В-УФ в системах растворителей, которые успешно используются в химико-токсикологическом анализе группы «лекарственных ядов»:

- диоксан—хлороформ—ацетон—25%-ный раствор аммиака (47,5:45:5:2,5) (1);
- толуол—ацетон—этанол—25%-ный раствор аммиака (45:45:7,5:2,5) (2);
- этилацетат—метанол—25%-ный раствор аммиака (17:2:1) (3).

Стандартный раствор тропикамида в хлороформе (концентрация 100 мкг/мл) наносили на стартовую зону хроматографических пластин. Время предварительного насыщения камеры 25 мин. Длина пробега фронта элюента 10 см. После элюирования хромато-

раммы высушивали и идентифицировали тропикамид в УФ-свете (254 нм) и реактивом Драгендорфа. Установлено, что значение  $hR_f$  тропикамида в данных системах составляет 753 (1), 522 (2) и 693 (3).

Поскольку наркозависимыми тропикамид чаще всего применяется в смеси с героином в одном шприце, для его предварительной идентификации возможно использование частной системы для опиатов (3). Учитывая универсальность и экспрессность определения токсикантов в системе растворителей (2), она может быть применена для обнаружения тропикамида.

При подборе реагентов для детектирования тропикамида на пластинках было установлено, что тропикамид не даёт аналитического эффекта с реактивами Марки (раствор формальдегида в концентрированной  $H_2SO_4$ ), Фреде (раствор аммония молибдата в концентрированной  $H_2SO_4$ ), Манделина (раствор ванадата аммония в концентрированной  $H_2SO_4$ ), FPN (хлорид железа (III) в смеси 60%-ного раствора хлорной кислоты, 70%-ного раствора азотной кислоты и воды), 10%-ным раствором железа (III) хлорида.

При выборе оптимальной схемы детектирования нами были апробированы следующие реагенты: реактивы Драгендорфа (модифицированный по Мунье), 1 моль/л растворы сульфата меди и калия йодида, 10%-ный раствор меди сульфата и 2%-ный раствор аммиака в соотношении 5:1. При последовательной обработке пластинки раствором сульфата меди и калия йодида в концентрации 1 моль/л тропикамид обнаруживается в виде тёмно-коричневой зоны на тёмно-жёлтом фоне. Однако эти зоны трудноразличимы при исследовании биопроб из-за наличия зон балластных веществ.

При обработке пластинки реактивом Драгендорфа тропикамид детектируется в виде зоны оранжево-коричневого цвета. Хотя данный реактив не является специфичным детектором по отношению к тропикамиду, он даёт чёткий аналитический эффект и имеет высокую чувствительность к анализируемому веществу.

Вследствие наличия в структуре вещества хромофорных групп тропикамид в УФ-свете (254 нм) детектируется в виде темно-синего пятна.

Предел обнаружения тропикамида при облучении УФ-светом составил 1 мкг в наносимом пятне, при визуализации реактивом Драгендорфа — 0,5 мкг.

#### *Качественное определение тропикамида методом ГЖХ*

Для подтверждающего исследования (для подтверждения) тропикамида в биожидкостях [5] нами предложен метод газо-жидкостной хроматографии на аппаратно-программном комплексе на базе хроматографа «Кристалл 2000М». По результатам предварительных испытаний по выбору оптимальных хроматографи-

ческих условий, проведённых с использованием стандартных растворов тропикамида (100 мкг/мл), было установлено, что на этапе подготовки пробы к газохроматографическому анализу необходима дериватизация выделенного из объекта тропикамида. Это обусловлено его низкой летучестью, что приводит к появлению на хроматограмме асимметричных пиков с низкой интенсивностью.

Поскольку тропикамид содержит в своей структуре свободную гидроксильную группу, был выбран вариант дериватизации ацетилизацией. Этот способ широко используется при химико-токсикологических исследованиях веществ со свободными фенольными или спиртовыми гидроксигруппами [6].

Дериватизацию выделенного из мочи тропикамида проводили с использованием в качестве дериватирующих агентов пентафторпропионового ангидрида (ПФПА) и уксусного ангидрида по следующим схемам:

1. 500 мкл хлороформного экстракта после изолирования переносили в хроматографическую вialsу и упаривали до сухого остатка. К сухому остатку добавляли 150 мкл пентафторпропионового ангидрида (ПФПА) и 100 мкл пентафторпропанола, выдерживали в термостате 30 мин при 60°C;

2. 500 мкл хлороформного экстракта после изолирования переносили в хроматографическую вialsу и упаривали до сухого остатка. К сухому остатку добавляли 50 мкл этилацетата и 50 мкл уксусного ангидрида, выдерживали вialsу в термостате 30 мин при 60°C.

После термостатирования смеси выпаривали при комнатной температуре в токе азота и растворяли в 200 мкл этилацетата; 1 мкл раствора вводили в испаритель газового хроматографа. Анализ проводили в следующих условиях: температура испарителя — 260°C; температура детектора — 280°C; температурная программа термостата колонки: 160°C — 2 мин, прогрев до 240°C со скоростью 20°C в минуту, выдержка при конечной температуре — 9 мин; режим с делением потока 10:1; скорость газа-носителя (азот) — 1,5 мл/мин [7].

Установлено, что при использовании указанных вариантов дериватизации образуются летучие продукты, хорошо разделяющиеся в разработанных условиях. Время удерживания пентафторпропионового производного тропикамида на хроматограмме составило 8,70 мин, ацетильного производного — 11,96 мин. Для дериватизации тропикамида можно рекомендовать оба варианта, хотя интенсивность хроматографического пика пентафторпропионового производного несколько выше при прочих равных условиях анализа.

## Изолирование тропикамида из мочи

Для разработки оптимального варианта изолирования тропикамида из мочи нами были изучены условия его экстракции из водных растворов органическими растворителями на стандартном растворе вещества (100 мкг/мл). В качестве экстрагентов использовали диэтиловый эфир, хлороформ, хлористый метилен, смесь хлороформ—бутанол 6:1. Для создания определённого значения рН в растворе использовали универсальные буферные смеси Бриттона—Робинсона [3].

Установлено, что оптимальными экстрагентами для извлечения тропикамида из водных растворов являются хлороформ и смесь хлороформ—бутанол 6:1. Значительный процент экстракции исследуемого вещества из водных растворов достигается в широком диапазоне рН среды от 4 до 12 (60,56% — 93,37%). При использовании хлороформа максимальный выход тропикамида составляет 93,37% при рН=9; при использовании смеси хлороформ—бутанол извлекается до 90,11% тропикамида (рН=10).

На следующем этапе была изучена экстракция тропикамида из модельных смесей мочи (концентрация тропикамида 10 мкг/мл). Поскольку наиболее полно тропикамид экстрагировался из водных растворов в нейтральной и щелочной средах, извлечение проводили в диапазоне рН 6—12 хлороформом и смесью хлороформ—бутанол (6:1). Необходимое значение рН контролировали по универсальному индикатору с помощью кислоты хлористоводородной разведённой и раствора аммиака 10%. Экстракцию проводили из 10 мл модельной смеси мочи однократно (порция экстрагента — 10 мл), время экстракции — 5 мин. Органическую фазу отделяли, фильтровали через бумажный фильтр с безводным натрием сульфатом. Полученное извлечение упаривали до сухого остатка в токе тёплого воздуха и растворяли в 1000 мкл хлороформа. 500 мкл полученного экстракта исследовали методом ГЖХ в разработанных условиях.

В результате проведённых исследований установлено, что максимальное количество тропикамида извлекается из мочи смесью хлороформ—бутанол 6:1 при рН 9 (71,6%). При изолировании хлороформом извлекается до 56% исследуемого вещества.

Таким образом, при направленном химико-токсикологическом анализе мочи для обнаружения тропикамида оптимально использование в качестве экстрагента смеси хлороформ—бутанол в соотношении 6:1. Поскольку в ненаправленном анализе для извлечения веществ основного характера преимущественно используют хлороформ при рН среды 9—10, то при наличии тропикамида в пробе он будет обнаруживаться в щелочной фракции.

Для апробации предложенных методик идентификации тропикамида были проанализированы 4 образца мочи, доставленные на исследование в хими-

ко-токсикологическую лабораторию ГУЗ Краевого наркологического диспансера №1 г.Перми.

К 10 мл мочи прибавляли 25%-ный водный раствор аммиака до рН 9—10 и экстрагировали 10 мл хлороформа. Органическую фазу отделяли в делительной воронке и фильтровали через бумажный фильтр с безводным сульфатом натрия. Полученный экстракт выпаривали досуха, растворяли в 1000 мкл хлороформа, 500 мкл наносили на стартовую зону (2) хроматографической пластины, на стартовую зону (1) наносили хлороформный раствор метчика тропикамида. Пластинку элюировали в системе толуол — ацетон — этанол — 25%-ный раствор аммиака (45:45:7,5:2,5). Время насыщения камеры — 25 мин. Длина пробега фронта элюента 10 см. После высушивания пластинку детектировали в УФ-свете при 254 нм, отмечали зоны поглощения тёмно-синего цвета в зонах расположения метчика тропикамида (1) и исследуемой зоне (2). Далее пластинку обрабатывали реактивом Драгендорфа, при этом наблюдали появление оранжево-коричневых зон окрашивания в исследуемых зонах и на уровне пятен метчика тропикамида с  $hR_f$  523. Таким образом, наличие зон поглощения в УФ-свете и окрашенных зон на уровне пятна метчика позволяет сделать предварительный вывод о наличии в исследуемой моче тропикамида.

500 мкл экстракта после дериватизации исследовали методом газовой хроматографии на приборе «Кристалл 2000М». Хроматограммы представлены на рис. 3, 4.

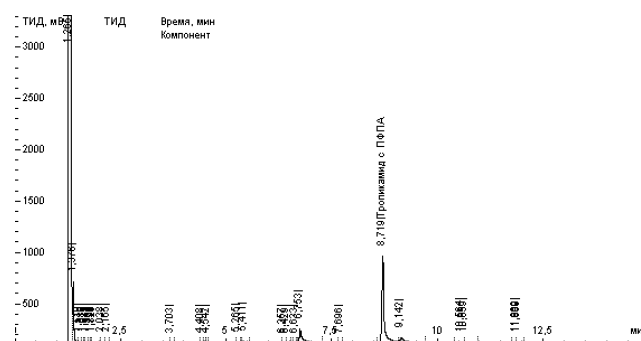


Рис. 3. Хроматограмма производного тропикамида с ПФФА

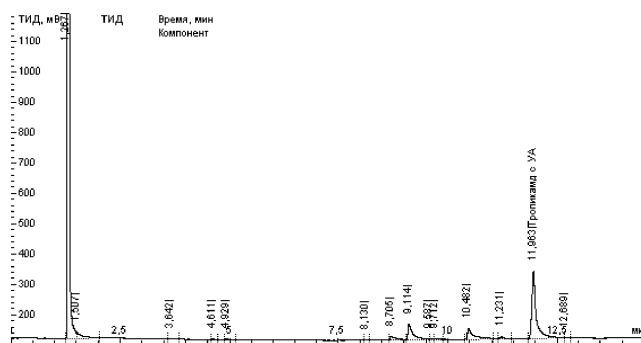


Рис. 4. Хроматограмма деривата тропикамида с уксусным ангидридом

*Исследование образцов мочи наркозависимых лиц, употребляющих героин и тропикамид, методом ТСХ*

Были исследованы 5 образцов мочи наркозависимых лиц, содержащих морфин и тропикамид. Обязательным шагом при определении опиатов в моче является кислотный гидролиз.

Необходимо было определить пригодность условий экстракции опиатов для извлечения тропикамида, а также возможность его гидролитического разложения в процессе изолирования. Для этого образцы мочи подвергали изолированию по следующей методике: к 10 мл мочи прибавляли 1 мл концентрированной хлористоводородной кислоты, флакон плотно закрывали и выдерживали 20 мин на кипящей водяной бане. После охлаждения к гидролизату прибавляли 25%-ный водный раствор аммиака до рН 9—10 и экстрагировали 10 мл смеси хлороформ—бутанол (6:1). Органическую фазу отделяли в делительной воронке и фильтровали через бумажный фильтр с безводным сульфатом натрия. Полученный экстракт выпаривали досуха, растворяли в 500 мкл хлороформа и наносили на стартовые зоны (2) трёх хроматографических пластин. На стартовые зоны (1) первой и второй пластин наносили хлороформный раствор метчика морфина, а на стартовую зону (1) третьей пластинки — хлороформный раствор метчика тропикамида. Все 3 пластинки одновременно элюировали в системе этилацетат — метанол — 25%-ный раствор аммиака 17:2:1. Время насыщения камеры — 25 мин. Длина пробега фронта элюента — 10 см. После высушивания все пластинки детектировали в УФ-свете при 254 нм. На всех пластинках отмечали зоны поглощения тёмно-синего цвета в зонах расположения метчика тропикамида (1) и исследуемой зоне (2). Далее первую пластинку капельно обрабатывали реактивом Марки, вторую — реактивом Фреде, при этом наблюдали появление окрашенных пятен в зонах (1) и (2): красно-фиолетового цвета на первой и сине-фиолетового — на второй с  $hR_f$   $20 \pm 2$ , соответствующим морфину. Третью пластинку обрабатывали реактивом Драгендорфа, при этом наблюдали появление оранжево-коричневых пятен в исследуемых зонах и на уровне пятен метчика морфина с  $hR_f$   $20 \pm 2$  и тропикамида с  $hR_f$  693.

Таким образом, наличие зон поглощения в УФ-свете и окрашенных зон на уровне пятен метчиков морфина и тропикамида позволяет сделать предварительный вывод о наличии в исследуемой моче морфина и тропикамида.

### Заключение

По результатам хроматографического исследования установлено, что предлагаемая методика проведения ТСХ эффективна, позволяет надёжно идентифи-

цировать морфин и тропикамид при совместном присутствии, полученные результаты воспроизводимы. Хроматографические характеристики разделяемых веществ оптимальны, что даёт возможность разделить морфин и тропикамид, а также отделить их от примесей соэкстрактивных веществ. Следует отметить, что тропикамид в условиях гидролиза опиатов не разрушается в присутствии концентрированной хлористоводородной кислоты.

### Выводы

1. Разработаны условия идентификации тропикамида методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Сорбфил»: осуществлён выбор подвижных фаз и схемы детектирования.
2. Определены оптимальные условия качественного анализа тропикамида методом газо-жидкостной хроматографии на хроматографе «Кристалл 2000М» и предложены методики дериватизации вещества.
3. С учётом изученных условий экстракции разработана методика преаналитической подготовки мочи для исследования на наличие тропикамида методами ТСХ и ГЖХ.
4. Установлена возможность совместного определения тропикамида и морфина в моче в частной системе для опиатов методом тонкослойной хроматографии при химико-токсикологических исследованиях.

### Список литературы

1. Государственный реестр лекарственных средств: официальное издание: В 2 т. / Под ред. Н.В. Юргеля и др. — М., 2008. Т. 2: Типовые клинико-фармакологические статьи. — 1028 с.
2. Личко А.Е., Битенский В.С. Подростковая наркология: Руководство для врачей. — Л.: Медицина, 1991. — 304 с.
3. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. — 4-е изд-е, перераб. и доп. — М.: Химия, 1971. — С. 238—239.
4. Мохначев С.О., Рохлина М.Л., Усманова Н.Н. О злоупотреблении циклопентолатом (цикломедом) // Наркология. — 2010. — №10. — С. 40—44.
5. Об организации проведения химико-токсикологических исследований при аналитической диагностике наличия в организме человека алкоголя, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ: приказ №40 Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 27 января 2006 г. [Электронный ресурс] // КонсультантПлюс: Высшая школа.
6. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсиантов: учеб. пособие / под ред. Н.И. Калетиной. — М.: Гэотар-Медиа, 2008. — С. 355—381, 540.
7. Тумилович Е.Ю., Карпенко Ю.Н., Дворская О.Н. Определение компонентов препарата Триган Д в моче при химико-токсикологическом анализе // Наркология. — 2009. — №9. — С. 46—51.
8. Moffat A.C., Osselton M.D., Widdop B. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons [Electronic Edition]. — London: Pharmaceutical Press, 2004.

**CHEMICAL-TOXICOLOGICAL DETERMINATION OF TROPICAMIDE IN URINE**

**TUMILOVICH E.Yu.<sup>1</sup>, KARPENKO Yu.N.<sup>1</sup>, DVORSKAYA O.N.<sup>1,2</sup>, PORSEVA N.Yu.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> – Perm State Pharmaceutical Academy, 614990, Perm, Ekaterininskaya st. 101. Tel.: (8-342)282-58-65, E-mail: kaftox@mail.ru

<sup>2</sup> – Regional narcological dispensary №1, 614068 Perm, Orgonikidse st. 95b. Tel.: (8-342)237-42-48

The article presents the statistics of detection tropicamide in samples submitted for analysis to the chemical-toxicological laboratory of Regional narcological dispensary №1, Perm in 2010 yr. Several questions of forensic analysis of this drug are discussed. Possibility of using TLC for preliminary determination of Tropicamide was studied. We also selected optimal conditions for determination of tropicamide by gas-liquid chromatography.

Key words: tropicamide, thin-layer chromatography, gas-liquid chromatography, liquid-liquid extraction