

УДК 543.544:340.67

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕНОБАРБИТАЛА И ЦИКЛОБАРБИТАЛА В КРОВИ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ — МАСС СПЕКТРОМЕТРИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОЭКСТРАКЦИИ

А.Б. Мелентьев
e-mail melentjev_a@mail.ru

Областное бюро судебно-медицинской экспертизы, г. Челябинск, Россия

Статья поступила 20 декабря 2003 г.

Введение

Фенобарбитал (5-этил-5-фенилбарбитуровая кислота) и циклобарбитал (5-этил-5-(циклогексен-1-ил)-барбитуровая кислота) широко распространенные лекарственные препараты, относящиеся к группе производных барбитуровой кислоты и оказывающие снотворное, успокаивающее и противосудорожное (фенобарбитал) действие [1]. Этими препаратами возможно злоупотребление, они вызывают психическую и физическую зависимость при длительном употреблении и могут использоваться совместно с наркотическими и психотропными веществами для усиления наркотического эффекта. Кроме того, в практике токсикологических отделений больниц и судебно-медицинской службы неоднократно встречались случаи передозировок указанных препаратов, иногда со смертельным исходом. Терапевтические, токсические и летальные концентрации в крови этих препаратов следующие: 10...25; 30...50 и 60...100 мкг/мл для фенобарбитала и 2...6; 10...15 и > 20 мкг/мл для циклобарбитала [2]. Наиболее известные методики определения барбитуратов в биожидкостях основаны на ультрафиолетовой спектроскопии [3], высокоэффективной жидкостной хроматографии [3—6] или капиллярном электрофорезе [7]. Трудности анализа производных барбитуровой кислоты методом газовой хроматографии (ГХ) связаны с невысокой летучестью этих соединений из-за наличия в их структуре двух полярных —NH групп. Это позволяет получить удовлетворительную воспроизводимость ГХ анализа барбитуратов без получения их производных только в узком интервале концентраций анализируемых веществ [8, 9]. Такие методики не пригодны для токсикологических анализов, так как не позволяют за одно определение проводить количественный анализ барбитуратов от терапевтических до летальных концентраций. Анализ барбитуратов методом ГХ обычно производится в виде их алкильных (метиловых, этиловых или пропиловых) эфиров [10—12]. Прямое введение в хроматограф образцов, содержащих такие активные агенты, как, тетраметиламмония гидроксид или диазометан, ведет к повреждению хроматографической системы, поэтому большинство этих методик предполагают после проведения алкилирования повторную экстракцию полученных продуктов в органический растворитель и операцию по его испарению. Эта сложная схема существенно увеличивает время подготовки пробы к анализу и делает эти методики малоприменимыми для срочных токсикологических анализов.

Целью данной работы явилась разработка методики определения фенобарбитала и циклобарбитала в крови, пригодной для токсикологических анализов с применением микроэкстракции, позволяющей существенно сократить время подготовки пробы к ГХ анализу.

1. Методика исследования

1.1. Материалы и реактивы

Йодметан и 25 % раствор гидроксида тетраметиламмония в метаноле приобретены у фирмы «ICN Biomedicals», остальные используемые реактивы квалификации чда. Фенобарбитал, циклобарбитал и гексабарбитал были фармацевтического качества.

1.2. Подготовка проб крови для анализа

К 1 мл крови добавляли 50 мкл раствора внутреннего стандарта в этаноле (гексабарбитал 0,02 мг/мл), 0,5 мл 1н раствора дигидрофосфата натрия и 5 мл этилацетата. Смесь встряхивали 5 минут на встряхивателе АБУ-6с и центрифугировали при 3000 об/мин. Верхний слой органического экстракта отделяли и пропускали через безводный сульфат натрия. Растворитель испаряли в потоке воздуха досуха. К сухому остатку добавляли 100 мкл диметилсульфоксида, 20 мкл 25 % раствора гидроксида тетраметиламмония в метаноле и после 2-х мин выдержки 40 мкл йодметана. После выдержки при комнатной температуре в течение 10 мин к смеси добавляли 100 мкл 1н раствора соляной кислоты и 500 мкл толуола. Смесь тщательно перемешивали и переносили в полипропиленовую пробирку объемом 1,5 мл с крышкой, пробирку закрывали и встряхивали 1 мин на встряхивателе. После отстаивания 1 мкл верхнего органического слоя анализировали методом газовой хроматографии —масс спектрометрии (ГХ/МС).

1.3. ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Газохроматографический анализ образцов проводили на газовом хроматографе фирмы Hewlett Packard HP-5890 серии II с масс селективным детектором HP-5972 при следующих условиях: газохроматографическая колонка HP5 — MS длиной 30 м, 0,25 мкм, начальная температура колонки 80°C, выдержка 1,0 мин, увеличение температуры со скоростью 40 град/мин до 200 °C, дальнейшее увеличение температуры со скоростью 12,5 град/мин до 300 °C с выдержкой при конечной температуре 4 мин. Газ — носитель гелий. Режим постоянного потока «Constant flow» 1,4 мл/мин. Температура инжектора 250 °C, устройства сопряжения с детектором 285 °C. Ввод пробы без разделения потока со сбросом избытка через 1 мин. в отношении потоков 1:15 (Split/Splitless). Режим селективного ионного мониторинга по ионам 235, 169, 250 (гексабарбитал метиловый эфир), 232, 117, 175 (фенобарбитал метиловый эфир), 235, 169, 236 (циклобарбитал метиловый эфир). Первыми в списке приведены ионы, по пикам которых проводили количественное определение, остальные ионы использовали для определения качества идентификации анализируемых соединений. Регистрация ионного тока осуществлялась после задержки на выход растворителя через 6 мин после ввода пробы и заканчивалась через 7 мин после начала анализа.

1.4. Построение калибровочных кривых

Стандартные растворы фенобарбитала и циклобарбитала с концентрацией 10 мг/мл готовили растворением в этаноле порошков чистых субстанций. Рабочие растворы, содержащие по 4,0; 2,0; 0,2; 0,1; 0,04; и 0,02 мг/мл фенобарбитала и циклобарбитала готовили смешиванием и разбавлением в этаноле стандартных растворов анализируемых веществ. По 50 мкл рабочих растворов вводили в 1 мл «холостой» крови, проверенной ранее на отсутствие барбитуратов, для получения в образцах крови концентраций анализируемых веществ 200, 100, 10, 5, 2 и 1 мкг/мл. Все образцы были подвергнуты экстракции, дериватизации, микроэкстракции и анализу по описанной выше методике. Калибровочные кривые получены по методу наименьших квадратов.

2. Обсуждение результатов

В ходе подготовки анализируемых веществ к ГХ анализу происходит метилирование их полярных —NH групп. Схемы процессов приведены на рис. 1. За счет получения более летучих производных увеличивается линейный диапазон концентраций для количественного определения барбитуратов методом ГХ.

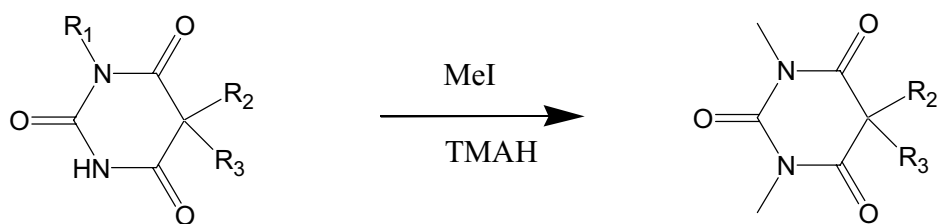


Рис. 1. Схема метилирования анализируемых веществ и внутреннего стандарта.

Гексабарбитал — $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{CH}_3$, $R_3 = \text{циклогексен-1-ил}$, фенобарбитал — $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{C}_2\text{H}_5$, $R_3 = \text{фенил}$,
циклобарбитал — $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{C}_2\text{H}_5$, $R_3 = \text{циклогексен-1-ил}$

Предел обнаружения фенобарбитала и циклобарбитала, определенный по кривым зависимости ионных отношений от концентрации анализируемых веществ, равен 1,0 мкг/мл для обоих соединений. При концентрации аналитов менее 1,0 мкг/мл из-за влияния фона некоторые ионные отношения уже не попадают в интервал $\pm 20\%$ от их среднего значения, что не позволяет надежно идентифицировать анализируемые соединения. Диапазон количественного определения равен 2,0...200 мкг/мл и охватывает область концентраций анализируемых барбитуратов от нижнего терапевтического уровня для циклобарбитала до верхнего летального уровня для фенобарбитала [2]. Внутри этого диапазона погрешность определения концентраций не превышает 15 %. Уравнения градуировочных графиков имеют вид: $Y = 0,129 + 1,27X$ для морфина и $Y = 0,009 + 1,06X$ для циклобарбитала, где Y — отношение концентраций анализируемых веществ и внутреннего стандарта, а X — отношение площадей пиков их целевых ионов. Коэффициенты корреляции калибровочных кривых равны 0,999 для фенобарбитала и 0,998 для циклобарбитала.

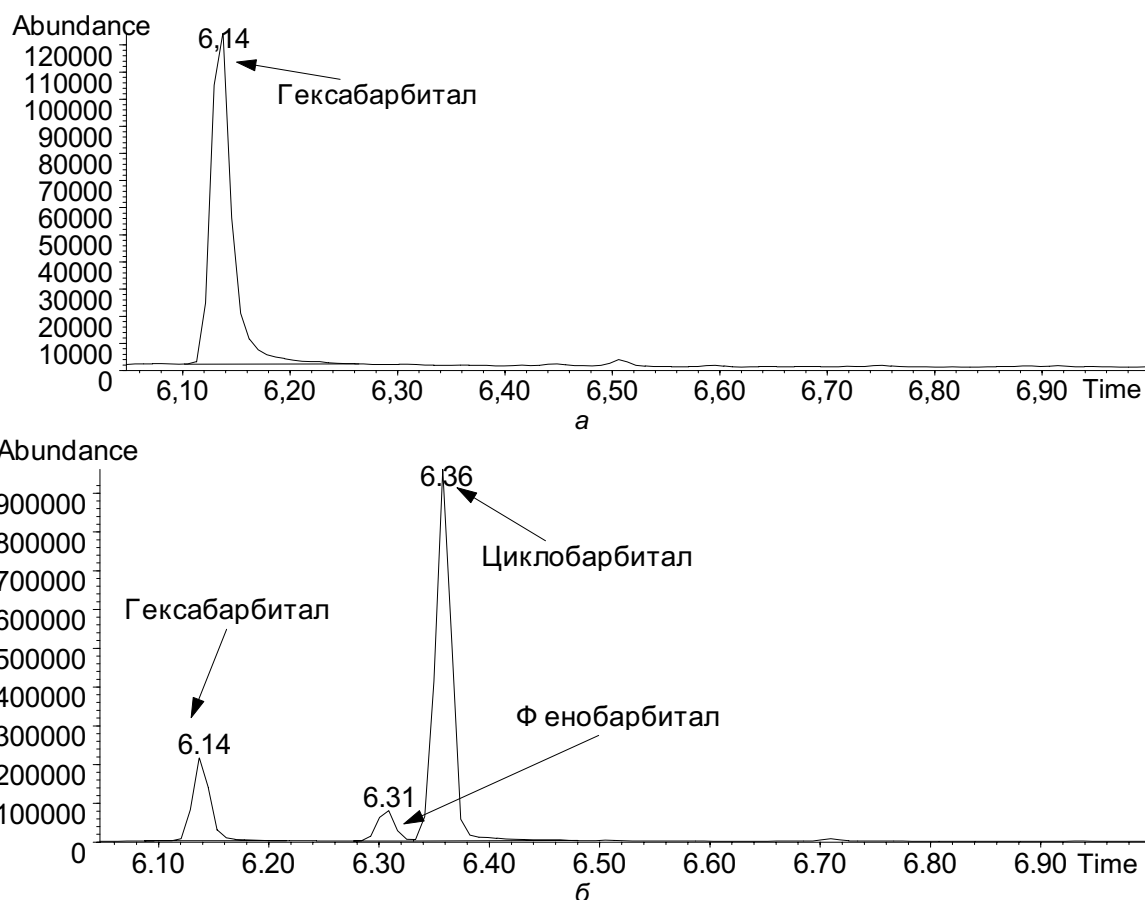


Рис. 2. Хроматограммы образцов «холостой» пробы крови (а) и крови субъекта, отравившегося барбитуратами (б)

На рис. 2 приведены хроматограммы по полному ионному току экстрактов «холостой» крови и экспертного образца с концентрациями фенобарбитала 2,0 мкг/мл и циклобарбитала 8,1 мкг/мл. В таблице приведены результаты тестирования методики на правильность и воспроизводимость. Максимальные внутрисерийные относительные погрешности определения фенобарбитала и циклобарбитала равны 9,96 % для концентрации 10 мкг/мл и 11,1 % для концентрации 100 мкг/мл. Межсерийные относительные погрешности не превышают 4,75 % для концентрации 10 мкг/мл и 2,4 % для концентрации 100 мкг/мл. Образцы после микроэкстракции, подготовленные для ГХ анализа, рекомендуется проанализировать в течение 1 суток. Если анализ образцов планируется в более поздние сроки, то для того, чтобы избежать разложения йодметана, рекомендуется удалить из пробирки нижний водный слой. Образец в толуоле можно хранить в закрытой пробирке в бытовом холодильнике в темноте до 1 недели.

Сравнение продолжительности подготовки серии из трех проб (контрольный, холостой и анализируемый образцы) с микроэкстракцией и стандартной экстракцией после метилирования показало, что полный анализ от отбора проб до получения результата при стандартной экстракции занимает более 2,5-х часов, а по предлагаемому методу 1,5 часа. Выигрыш времени анализа более одного часа весьма существенен при срочных клинических и токсикологических анализах в больницах скорой помощи.

Описанная методика используется в Челябинском областном бюро судебно-медицинской экспертизы около шести месяцев в экспертизах при подозрении на отравление барбитуратами. Она может быть также использована в клинко-токсикологическом анализе, когда от продолжительности и достоверности анализа зависит жизнь и здоровье пациентов

Правильность и воспроизводимость методики определения фенобарбитала и циклобарбитала в крови ($P = 0,95$; $n = 6$)

Серия определений	Вещество	Найдено,* мкг/мл	Коэффициент вариации, %	Найдено,** мкг/мл	Коэффициент вариации, %
1	Фенобарбитал	10,86 ± 0,87	9,96	99,1 ± 8,8	11,1
	Циклобарбитал	9,72 ± 0,29	3,72	95,9 ± 6,4	8,29
2	Фенобарбитал	10,59 ± 0,60	7,07	98,0 ± 6,5	8,24
	Циклобарбитал	10,22 ± 0,47	5,76	100,6 ± 2,6	3,29
3	Фенобарбитал	10,22 ± 0,64	7,78	100,9 ± 5,7	7,06
	Циклобарбитал	10,69 ± 0,54	6,37	98,8 ± 1,2	1,47

Примечание: * Введено 10,0 мкг/мл (нижний контроль), ** Введено 100,0 мкг/мл (верхний контроль)

Заключение

Разработана методика определения фенобарбитала и циклобарбитала в крови методом ГХ/МС, предназначенная для токсикологических анализов. Предел обнаружения анализируемых веществ равен 1,0 мкг/мл. Интервал количественного определения 2,0...200,0 мкг/мл. Максимальные внутрисерийные погрешности не превышают 11,1 %, а межсерийные 4,75 %. Методика может быть рекомендована для клинко-токсикологических и судебно-химических анализов.

Список литературы

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства.— М.: Медицина, 1984. Т. 1. 624 с.
2. Meyer F.P. Indicative therapeutic and toxic drug concentrations in plasma: Tabulation // Int. J. Clin. Pharmac. Therap., 1994. V. 32. № 2. P. 71—81.
3. Moffat A.C. Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material. — London: Pharmaceutical press, 1986. 1173 p.
4. Еремин С.К., Изотов Б.Н., Веселовская Н.В. Анализ наркотических средств. — М.: Мысль, 1993. 260 с.
5. Tanaka E., Terada M., Tanno K., Misawa S., Wakasugi C. Forensic analysis of 10 barbiturates in human biological samples using a new reversed-phase chromatographic column packed with 2-µm porous microspherical silica-gel // Forensic. Science Int., 1997. V. 85. № 1. P. 73—82.

6. Martinavarro-Dominguez A., Capella-Peiro M.-E., Gil-Agusti M., Marcos-Tomas J.V., Esteve-Romero J. Therapeutic Drug Monitoring of Anticonvulsant Drugs by Micellar HPLC with Direct Injection of Serum Samples // *Clinical Chemistry*, 2002. V. 48. № 10. P. 1696—1702.
7. Thormann W., Meier P., Marcolli C., Binder F. Analysis of barbiturates in human serum and urine by high-performance capillary electrophoresis-micellar electrokinetic capillary chromatography with on-column multi-wavelength detection // *J. Chromatogr.*, 1991. V. 545. № 2. P. 445—460.
8. Pocci R., Dixit V., Dixit V.M. Solid-phase extraction and GC/MS confirmation of barbiturates from human urine // *J. Anal. Toxicol.*, 1992. V. 16. № 1. P. 45—47.
9. Namera A., Yashiki M., Okada K., Iwasaki Y., Ohtani M., Kojima T. Automated preparation and analysis of barbiturates in human urine using the combined system of PrepStation and gas chromatography-mass spectrometry // *J. Chromatogr. B., Biomed. Sci. Appl.*, 1998. V. 706. № 2. P. 253—259.
10. Onge L.M.St., Dolar E., Anglim M.A., Least Jr C.J. Improved determination of phenobarbital, primidone, and phenytoin by use of a preparative instrument for extraction, followed by gas chromatography // *Clinical Chemistry*, 1979. V. 25. № 8. P. 1373—1376.
11. Barbour A.D. GC/MS analysis of propylated barbiturates // *J. Anal. Toxicol.*, 1991. V. 15. № 4. P. 214—215.
12. Kushnir M.M., Urry F.M. Use of a statistically designed experimental approach to optimize the propylketal derivatization of barbiturates // *J. Chromatogr. Sci.*, 2001. V. 39. № 4. P. 129—136.