

## ОПТИМИЗАЦИЯ ПОДГОТОВКИ ПРОБ ДЛЯ ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА БАРБИТУРАТОВ МЕТОДОМ ВЭЖХ

### *Optimization of the sample preparation for the chemical-toxicological analysis of barbiturates by the HPLC method.*

Харчу И. Д.<sup>1</sup>, Касьян И. Г.<sup>2</sup>, Касьян А. К.<sup>2</sup>, Симонова Л. Л.<sup>1</sup>

Кафедра фармацевтической и токсикологической химии, ОУ ГУМФ им. Николае Тестемицану<sup>1</sup>;  
Научный Центр по Исследованию Лекарств, ОУ ГУМФ им. Николае Тестемицану<sup>2</sup>

#### **Rezumat:**

Optimizarea preparării probelor pentru analiza chimico-toxicologică a barbituricilor prin metoda HPLC.

În lucrarea dată au fost studiate unele procedee simple de preparare a probelor de material biologic pentru dozarea ulterioară a barbituricilor prin metoda HPLC. Ca procedeu optim se propune deproteinizarea cu amestec metanol – 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (95:5). Acest procedeu în ansamblu cu analiza HPLC-UV asigură regăsirea barbituricilor cel puțin 97% din plasma sanguină și o linearitate înaltă a dependenței de calibrare în întregul diapazon studiat al concentrațiilor (până la 160 mg/l) cu limita de cuantificare circa 1 mg/l.

**Cuvinte cheie:** Barbiturice, analiza chimico-toxicologică, prepararea probelor, HPLC.

#### **Abstract:**

In the present work have been studied some simple procedures of biological material sample preparation for the following assay of barbiturates by the HPLC method. As an optimum way it is offered deproteinization by the mixture of methanol and 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (95:5). This procedure in combination with HPLC-UV analysis ensures recovery of barbiturates not less than 97% from blood plasma and high linearity of the calibration dependence in whole investigated range of concentrations (up to 160 mg/l) at limit of quantification about 1 mg/l.

**Key Words:** Barbiturates, chemical-toxicological analysis, sample preparation, HPLC.

#### **Актуальность темы**

Проблема повышения качества судебно-химических и химико-токсикологических исследований, осуществляемых в центрах судебно-медицинских экспертиз, наркологических и токсикологических лабораториях, входит на лидирующие позиции, так как возможные аналитические ошибки могут оказать серьезное влияние на жизнь человека и его гражданские права. Производные барбитуровой кислоты, обладая ГАМК-миметическим механизмом действия, оказывают разностороннее влияние на ЦНС и проявляют седативную, снотворную, противосудорожную активность. Прием больших доз барбитуратов приводит к серьезным неврологическим нарушениям, вплоть до глубокой комы, а также к нарушению дыхания и гемодинамики. Симптомы отравления барбитуратами схожи с таковыми при отравлениях наркотическими анальгетиками, клонидином, производными фенотиазина, что затрудняет диагностику [1-3]. Широкое распространение в медицинской практике получили лекарственные препараты, содержащие барбитураты (главным образом фенобарбитал) в комбинации с другими активными веществами, такими как кофеин, ацетилсалициловая кислота, эфедрин, теofilлин, кодеин, растительные экстракты, а в незаконном обороте наркотиков нередки случаи использования барбитуратов в смеси с героином, кокаином, амфетаминами и их одновременного приема с алкоголем [4]. В таких

случаях решающее значение имеют результаты химико-токсикологического анализа.

Согласно статистическим данным различных источников на долю барбитуратов приходится 20-25% от общего числа отравлений, а число летальных исходов достигает 3% от числа всех смертельных интоксикаций [5, 6].

В практике судебно-химических и химико-токсикологических лабораторий для изолирования производных барбитуровой кислоты из биологического материала по сей день применяются традиционные методы, разработанные в прошлом столетии [7, 8]. В большинстве своем они основаны на экстракции органическими растворителями из подкисленного биоматериала после или без предварительной депротенизации. Открываемость барбитуратов в этих случаях, как правило, не высока, составляя в среднем 20-30%, и значительно различается для разных представителей данной группы веществ [5, 8]. Это связано как с относительно низкой полнотой жидкостной экстракции, так и с довольно сильным связыванием барбитуратов с белковой матрицей, их различной полярностью и способностью к ионизации. Дополнительная очистка органических экстрактов (например щелочной реэкстракцией) улучшает селективность определения барбитуратов, но еще больше снижает их открываемость. Используя ферментативный гидролиз белков перед экстракцией удается повысить выход определя-

емых соединений до 60-75% [5], но трудоемкость подобных способов подготовки весьма высока. В то же время, широкое внедрение в практику метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), обладающего высокой разрешающей способностью и хорошими метрологическими характеристиками, позволяет снизить требования в отношении селективности применяемых способов пробоподготовки, одновременно предъявляя повышенные требования к величине и воспроизводимости количественного выхода определяемых веществ.

**Целью настоящей работы** было сравнительное исследование простых неселективных способов подготовки проб биоматериала и выбор оптимального способа, обеспечивающего высокие значения открываемости для всей группы барбитуратов и совместимость подготовленных проб с обращенно-фазной хроматографической системой.

### Материалы и методы

Исследования выполнены на жидкостном хроматографе “Agilent 1260” с диодно-матричным детектором. В работе использованы растворители квалификации “для ВЭЖХ” и реактивы квалификации “хч”. Модельные пробы готовили из донорской плазмы и фармакопейных субстанций барбитала, фенобарбитала и гексобарбитала. Для определения открываемости были приготовлены растворы анализируемых субстанций в плазме крови и физиологическом растворе с концентрацией 60 мг/л (примерно середина исследованного диапазона концентраций), а для проверки линейности – по 11 калибровочных растворов в плазме с концентрацией от 0,156 мг/л до 160 мг/л. Последние были приготовлены методом серийных разведений. Для проверки селективности в аналитические серии включали также пробы “blank” – плазму крови без добавки барбитуратов.

Исследованию на предмет открываемости барбитуратов были подвергнуты следующие способы подготовки проб [9]:

#### *Депротенизация трихлоруксусной кислотой:*

К 100 мкл исследуемого образца в пробирке типа “Eppendorf” вместимостью 0,5 мл прибавляли 100 мкл 6% раствора трихлоруксусной кислоты, энергично встряхивали, затем центрифугировали 3-5 мин при 4000 g. Центрифугат использовали для хроматографического анализа.

*Депротенизация смесью органических растворителей:* К 100 мкл исследуемого образца в пробирке типа “Eppendorf” вместимостью 0,5 мл прибавляли 200 мкл смеси ацетонитрил – метанол (9:1), энергично встряхивали и центрифугировали 3-5 мин при 4000 g. Аликвоту центрифугата перед анализом разбавляли водой в 4 раза.

#### *Депротенизация подкисленным метанолом:*

К 100 мкл исследуемого образца в пробирке типа

“Eppendorf” вместимостью 0,5 мл прибавляли 100 мкл смеси метанол – 2 М  $H_2SO_4$  (95:5), энергично встряхивали, центрифугировали 3-5 мин при 4000 g. Аликвоту центрифугата разбавляли водой в 3 раза.

#### *Однофазная экстракция (оригинальный способ):*

К 250 мкл исследуемого образца в пробирке типа “Eppendorf” вместимостью 1,5 мл прибавляют 200 мкл ацетонитрила, перемешивают, затем прибавляют 50 мкл 0,3 М  $H_3PO_4$  в насыщенном растворе сульфата аммония, энергично встряхивают и центрифугируют 1-2 мин при 1000-2000 g. Аликвоту верхнего слоя, содержащую около 87% ацетонитрила, разбавляют водой или буферным раствором до его концентрации не выше, чем в подвижной фазе.

Для определения открываемости необходимо знать объем отделившегося экстракта, поэтому в технику выполнения теста были внесены изменения:

*Однофазная экстракция (модифицированный вариант):* В градуированную стеклянную трубку вместимостью около 3,5 мл, герметично закрываемую по обоим концам резиновыми пробками, помещали 1 мл исследуемого образца, 0,8 мл ацетонитрила и 0,2 мл 0,3 М  $H_3PO_4$  в насыщенном растворе сульфата аммония, трубку энергично встряхивали и центрифугировали 5 мин при 150 g. Объем органического слоя определяли непосредственно по градуировке трубки, затем при помощи микрошприца отбирали его аликвоту и разбавляли в 5 раз водой.

Хроматографический анализ подготовленных проб биоматериала проводился в следующих условиях: Колонка с обращенно-фазным сорбентом Uptisphere 5 ODB, 5 мкм, размеры: 3 x 150 мм, температура 30°C. Длина волны детектора (220 нм) выбрана с учетом УФ спектров кислых форм определяемых субстанций (рис. 1) и наблюдаемой селективности хроматографической системы. Подвижная фаза: ацетонитрил – 0,05% раствор трифторуксусной к-ты (15 : 85 для барбитала, 23 : 77 для фенобарбитала и 35 : 65 для гексобарбитала); скорость 0,8 мл/мин. Соотношение компонентов подвижной фазы в каждом случае было оптимизи-

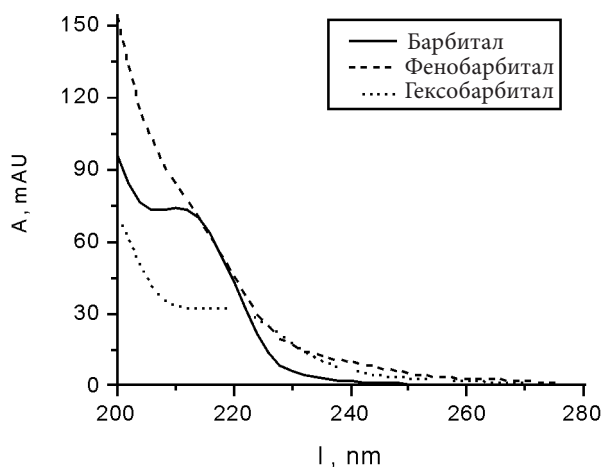


Рис. 1. УФ спектры барбитуратов в подвижной фазе (данные диодно-матричного детектора).

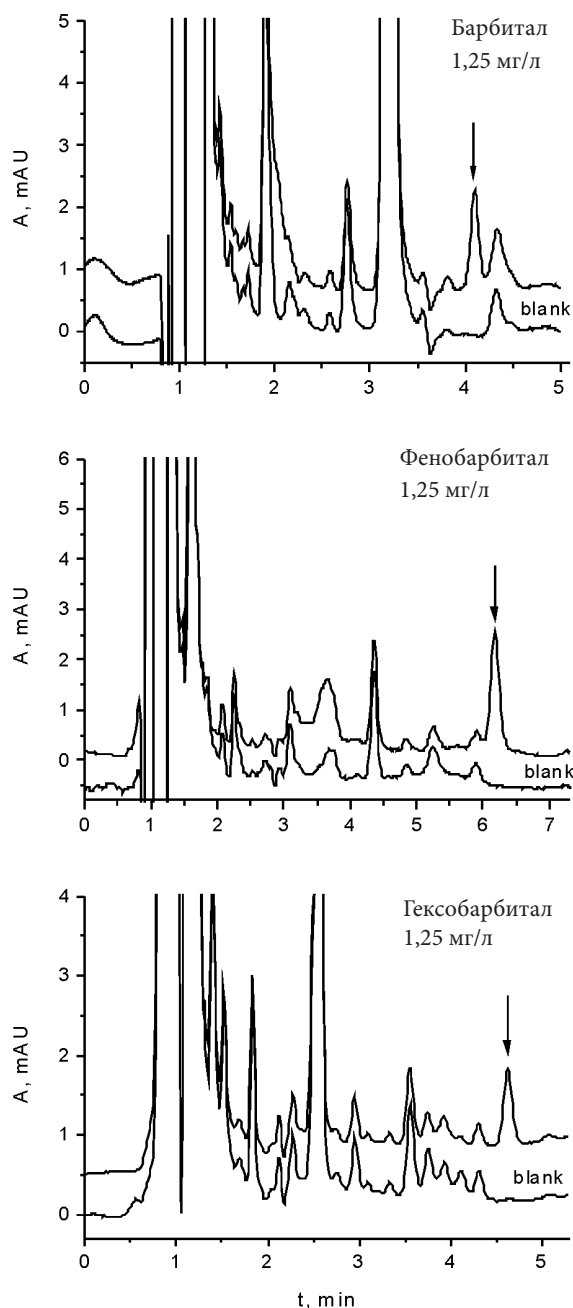


Рис. II. Хроматограммы модельных проб плазмы, подтверждающие селективность хроматографической системы.

ровано для достижения необходимой селективности (рис. II). Объем вводимой пробы составлял 20 мкл.

Открываемость барбитуратов при использовании методов депротеинизации рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{S_1}{S_0} \cdot 100\%,$$

где  $S_1$  и  $S_0$  – площади пиков определяемого вещества на хроматограммах проб, приготовленных на плазме крови и физиологическом растворе соответственно.

В случае однофазной экстракции открываемость определяли раздельно для плазмы и физиологического раствора по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot C_0 \cdot V_e \cdot D}{S_0 \cdot C_1 \cdot V_p} \cdot 100\%,$$

где  $S_1$  и  $S_0$  – площади пиков определяемого вещества на хроматограммах проб, прошедших стадию подготовки, и эталонного раствора соответственно;  $C_1$  – концентрация определяемого вещества в анализируемой матрице (плазме или физиологическом растворе);  $C_0$  – концентрация эталонного раствора;  $V_p$  и  $V_e$  – объемы исходной пробы и органического экстракта соответственно;  $D$  – разведение аликвоты экстракта. Эталонные растворы барбитуратов с концентрацией 20 мг/л готовили на воде.

К первичным данным, полученным для серий калибровочных растворов, применяли стандартную процедуру линейного регрессионного анализа [10]. Дополнительные параметры, такие как пределы обнаружения количественного определения, рассчитывали из результатов линейной регрессии согласно рекомендаций ICH [11].

### Результаты и обсуждение

Все количественные результаты исследования представлены в таблице I. Сразу можно отметить, что все исследованные нами способы подготовки проб продемонстрировали лучшие значения открываемости по сравнению с традиционно используемыми.

*Примечание:* \*Значения были получены ранее [9].

Как мы и предполагали, для способа депротеинизации трихлоруксусной кислотой открываемость барбитуратов снижается в ряду барбитал – фенобарбитал – гексобарбитал, т.е. в порядке снижения их полярности, что связано с увеличением степени их связывания с протеинами плазмы. При этом открываемость фенобарбитала и гексобарбитала оказалась ниже рекомендуемого 80% порога.

Для способа однофазной экстракции наблюдается обратная зависимость, отражающая коэффициент распределения субстанций между органической и водной фазами. В этом случае не вполне удовлетворительную открываемость показал барбитал. Кроме того, повышенные значения коэффициента вариации результатов, полученных для однофазной экстракции из плазмы крови, указывают на необходимость использования внутреннего стандарта, что, как правило, усложняет задачу оптимизации времени анализа и селективности хроматографической системы.

Способы депротеинизации смесью ацетонитрил – метанол и подкисленным метанолом во всех случаях продемонстрировали близкие к 100% значения открываемости и хорошую их сходимость. Они максимально просты в выполнении и требуют минимальных затрат времени и реактивов. С точки зрения чувствительности, более выгодным является способ депротеинизации подкисленным метанолом, приводящий к меньшему разбавлению проб. Для него и были проведены дополнительные испытания.

Основные параметры исследованных способов подготовки проб биоматериала.

Название параметра и способа подготовки проб	Значение параметра для определяемой субстанции		
	Барбитал	Фенобарбитал	Гексобарбитал
<b>Параметры открываемости</b>			
Депротенизация трихлоруксусной кислотой: Значение открываемости Коэффициент вариации	92,4% 0,66%	61%*	66,0% 0,55%
Депротенизация смесью органических растворителей: Значение открываемости Коэффициент вариации	103,4% 0,47%	≈100%*	103,6% 1,2%
Депротенизация подкисленным метанолом: Значение открываемости Коэффициент вариации	100,6% 0,42%	≈100%*	97,3% 0,90%
Однофазная экстракция из физиологического раствора: Значение открываемости Коэффициент вариации	76,5% 1,2%		100,1% 0,71%
Однофазная экстракция из плазмы крови: Значение открываемости Коэффициент вариации	77,6% 6,2%	81%*	96,9% 6,1%
<b>Параметры калибровочной зависимости</b>			
Депротенизация подкисленным метанолом: Значение коэффициента А Ст. отклонение коэффициента А Значение коэффициента В Ст. отклонение коэффициента В Коэффициент корреляции (R) Порог детекции Предел количеств. определения	0,578 0,560 7,41 0,010 0,99999 0,249 мг/л 0,755 мг/л	1,27 0,657 4,96 0,012 0,99997 0,438 мг/л 1,33 мг/л	2,49 0,978 7,79 0,018 0,99998 0,414 мг/л 1,26 мг/л

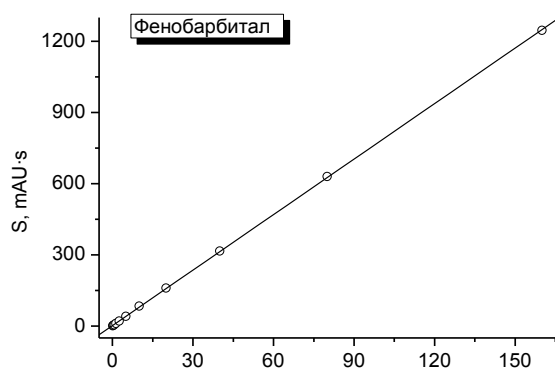
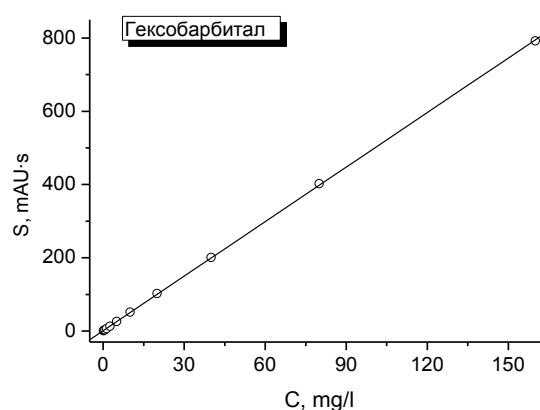
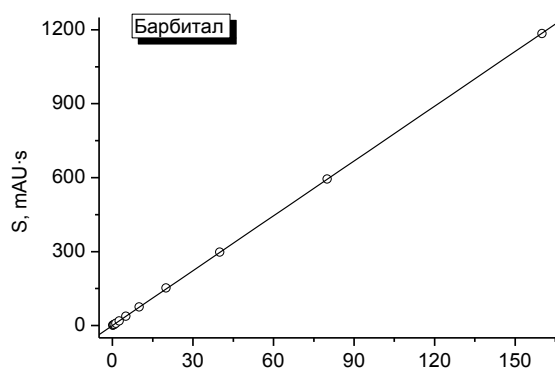


Рис. III. Калибровочные графики для модельных растворов барбитуратов в плазме крови.

Анализ калибровочных растворов выявил высокую линейность зависимости площади хроматографических пиков от концентрации определяемых веществ во всем исследованном диапазоне (рис. III), а расчетное значение предела количественного определения составило около 1 мг/л. Тем самым перекрывается

весь диапазон терапевтических и токсических концентраций исследованных барбитуратов [12].

Таким образом, способ депротенизации проб биоматериала подкисленным метанолом оказался оптимальным для всех определяемых соединений. Тот факт, что исследованные вещества представляют весь диапазон полярности группы барбитуратов, позволяет предложить указанный способ для всей группы.

### Выводы

В качестве оптимального способа подготовки проб биоматериала к химико-токсикологическому определению барбитуратов предложена депротенизация метанолом, подкисленным серной кислотой.

Предложенный способ в сочетании с ВЭЖХ-УФ анализом обеспечивает количественное определение барбитуратов в диапазоне концентраций 1 – 160 мг/л и отличается высокими значениями открываемости аналитов и линейности калибровочной зависимости.

### Литература:

1. Вольграм ЕН, Ходасевич ТА. К вопросу об отравлении клонидином. Суд.-мед. экспертиза 1990;4:47-49.
2. Борисевич СН, Вергун ОМ. Острые отравления клофелином и возможности их лабораторной диагностики. Здравоохранение 2010;2:51-53.
3. Камышников ВС, Игумнов СА, Чубуков АМ и др. Отравления наркотическими средствами, действующими на опиоидные рецепторы. Клиническая и лабораторная диагностика. Минск: Адукацыя; 2010. с. 63.
4. Калетина ТВ. Токсикологическая химия. ГЭОТАР-МЕД: М.; 2007.
5. Чувина НА, Колупаева АС, Стрелова ОЮ, Заболоцкая ИВ, Горбачева ТВ. Использование метода ферментативного гидролиза для изолирования производных барбитуровой кислоты из крови. Суд.-мед. экспертиза 2010;5:19-21.
6. Борисевич СН, Вергун ОМ, Шмигельский АА. Острые отравления барбитуратами и их диагностика. Здравоохранение 2011;4:52-55.
7. Крамаренко ВН. Токсикологическая химия. Высшая школа: Киев; 1989. с. 197-199.
8. Методические указания по определению производных барбитуровой кислоты при химико-токсикологических исследованиях. Минздрав СССР: М.; 1974.
9. Casian A, Casian I, Valica VI. Aprecierea comparativă a unor metode de preparare a probelor biologice pentru analiza HPLC. Revista Farmaceutică a Moldovei 2005;4:14-21.
10. Государственная фармакопея Российской Федерации. Изд. XII, ч. 2. Расчет и статистическая оценка параметров линейной зависимости (линейной регрессии) (14.1.6.).
11. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: Text and methodology. 2005.
12. Токсикологическая химия: Учебник для вузов / Под ред. ТВ Плетеновой. ГЭОТАР-Медия: М.; 2005. с. 306.