

МЕТОД ПОДГОТОВКИ ПРОБ КРОВИ И МОЧИ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАРБАМАЗЕПИНА МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ — МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Лишай А. В.^{1, 2}, Вергун О. М.¹, Гриншпан Д. Д.³

¹ Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь;

² Учреждение образования «Белорусский государственный университет», г. Минск, Республика Беларусь;

³ Учреждение Белорусского государственного университета «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем», г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. На сегодняшний день проблема острых отравлений химической этиологии приобрела особое значение в мире, поскольку в последние десятилетия в окружающей современного человека среде происходит накопление огромного количества различных химических веществ, токсичных для организма. Более того, современные тенденции развития химической и фармацевтической промышленности способствуют дальнейшему напряжению токсикологической обстановки. Предлагается методика подготовки проб крови и мочи для определения карбамазепина на основе газовой хроматографии с масс-селективным детектированием.

Ключевые слова: пробоподготовка, газовая хроматография — масс-спектрометрия (ГХ/МС), дериватизация, отравления, карбамазепин.

Введение. На сегодняшний день проблема острых отравлений химической этиологии приобрела особое значение в мире, поскольку в последние десятилетия в окружающей современного человека среде происходит накопление огромного количества различных химических веществ, токсичных для организма [1]. Лекарственные отравления являются сравнительно новым видом патологии. Это обусловлено открытием большинства лекарственных средств в XX в. и последующим широким их применением в лечении пациентов. Чрезвычайно актуальными являются проблемы диагностики острых отравлений «неизвестным ядом», причиной этого является многообразие видов химических соединений. Более того, большое количество синтезируемых веществ обладает мультитропной токсичностью, следствием чего является довольно смазанная клиническая картина отравления, представляющая собой смесь патологических синдромов, наблюдаемых в неотложной терапии [4]. Острые химические отравления, в т. ч. лекарственными средствами, после отравлений наркотическими веществами являются актуальной проблемой во всем мире, в т. ч. в Республике Беларусь.

При изучении данных общего количества отравлений по городу Минску с 2007 по 2017 гг. пришли к выводу, что динамика химических отравлений имеет волнообразный характер — наблюдается попеременное увеличение и снижение количества отравлений в течение 3–4 лет (рисунок 1), но общее количество отравлений находится примерно на одном и том же уровне, поскольку в Беларуси за последние годы не было техногенных катастроф, военных действий и др. Пик отравлений в республике, как и в странах Европы, приходится на 2014–2015 гг. Это связано с популярностью употребления в молодежной среде курительных смесей, но благодаря принятому на государственном уровне в 2015 г. закону об уголовной ответственности за употребление и распространение курительных смесей, ситуация значительно улучшилась.

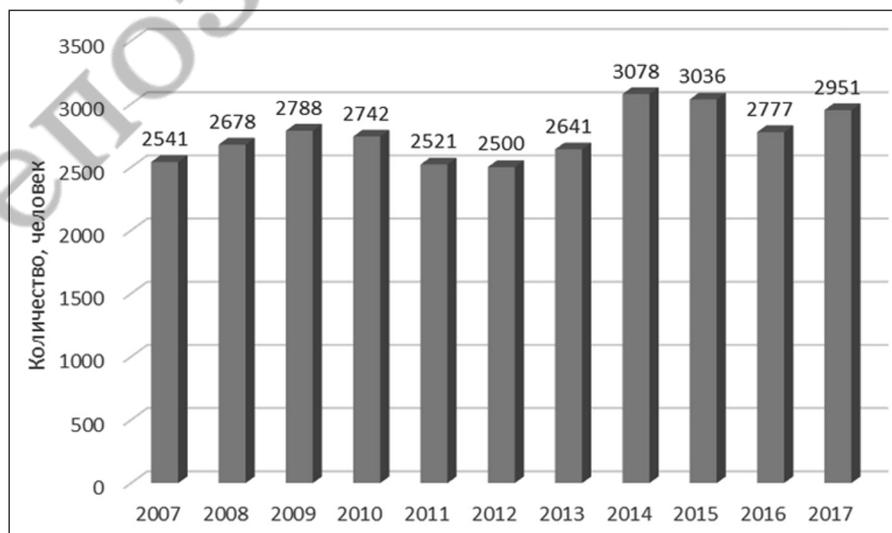


Рисунок 1. — Динамика отравлений (в абсолютных значениях) в г. Минске в 2007–2017 гг.

Первое место среди острых отравлений занимают отравления алкоголем и его суррогатами; 2-е место за 2016 и 2017 гг. в структуре отравлений занимают отравления лекарственными средствами (ЛС) (23 % в каждом случае от количества общих отравлений) и около 70 % из них приходится на долю ЛС, влияющих на ЦНС (2015 г. — 72,34 %; 2016 г. — 71,4 %; 2017 г. — 75,7 %). Какую часть составляют отравления карбамазепином по отношению к отравлениям другими лекарственными средствами, влияющими на ЦНС, приведено на рисунке 2 в процентном соотношении (2015 г. — 2,18 %; 2016 г. — 6,07 %; 2017 г. — 6,51 %), учитывая, что в этой группе отравлений 70–80 % приходится на отравления наркотическими веществами и курительными смесями – отравления карбамазепином встречаются очень часто.

Карбамазепин — противоэпилептическое лекарственное средство из группы производных карбоксамида. В основном используется в качестве противосудорожного ЛС при больших судорожных припадках (тонико-клонических эпилептических приступах) и при фокальной психомоторной эпилепсии. В умеренной степени оказывает нормотимическое действие. Механизм действия карбамазепина до конца не изучен, но в целом он имеет сходство с противоэпилептическими средствами группы производных гидантоина.

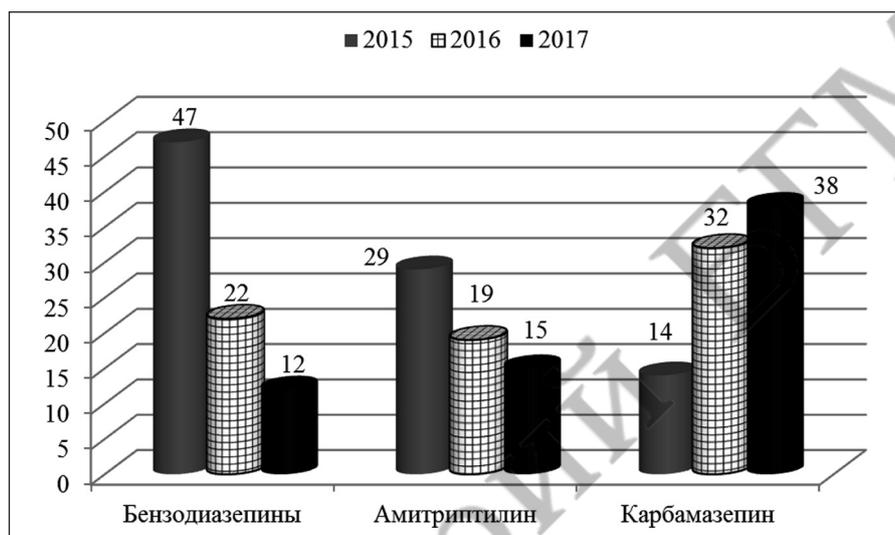


Рисунок 2. — Динамика отравлений в г. Минске в 2015–2017 гг.

Структурно карбамазепин близок к трициклическим антидепрессантам. Токсикокинетика: время достижения пикового уровня в плазме: 6–24 ч, объем распределения: 1–2 л/кг, связывание с белками плазмы: 75–80 %, период полувыведения: 8–13 ч, выводится в неизменном виде: 23 % [4]. Наибольшее число острых отравлений химической этиологии связано с употреблением карбамазепина с целью снятия симптомов абстиненции при наркотической зависимости, второе место занимают отравления с суицидальными намерениями, на третьей позиции находятся острые отравления, связанные с ошибочным приемом ЛС.

Цель работы — разработка оптимальной методики пробоподготовки для количественного определения карбамазепина в крови и моче методом газовой хроматографии — масс-спектрометрии (ГХ/МС).

Материалы и методы. Материалами являются: сыворотка крови 30 пациентов в возрасте 25–40 лет; карбамазепин, таблетки 200 мг № 50 (Фармлэнд, Республика Беларусь), хлороформ (х.ч.), ацетонитрил (х.ч.). Отбор крови осуществлялся из общего кровотока пациентов с острым отравлением. Методами являются: газовый хроматограф Agilent 6890N Network GC System, масс-селективный детектор Agilent 5975C VL VSD (Agilent, США), колонка капиллярная HP-5MS, внутренний диаметр 0,25 мм, длина 30 м, полуавтоматические пипетки-дозаторы, позволяющие отбирать объемы жидкостей 4–40, 40–200 мкл и 0,2–1, 1–5 мл, центрифуга типа Heraeus Labofuge 200 (Thermo Electron corporation, США).

Пробоподготовка для количественного исследования: проводили дериватизацию ацетонитрилом и жидкость-жидкостную экстракцию:

Рабочий раствор: 200 мг/л карбамазепина, из него готовили калибровочные растворы: 10; 20; 40 мг/л.

Способ 1: В делительную воронку вносили по 1,0 мл сыворотки крови (2 мл мочи), прибавляли по 100 мкл 25 %-го раствора аммиака, хлороформ (х.ч.) 5 мл — экстрагировали 10 мин. Хлороформное извлечение центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 мин, центрифугат в количестве 3 мл отделяли от осадка, выпаривали в токе теплого воздуха.

Способ 2: К 1 мл сыворотки крови (2 мл мочи), вводили 3мл ацетонитрила (х.ч.), для осаждения белков плазмы, затем центрифугировали 1500 об/мин — 5 мин, затем приливали 3 мл хлороформа (х.ч.) —

экстрагировали в течение 3 мин, затем снова центрифугировали 1500 об/мин — 5 мин, отбрасывали надосадочную жидкость и центрифугат в количестве 3 мл выпаривали в токе теплого воздуха.

Исследование образцов: сухие остатки растворяли в 0,5 мл хлороформа и последовательно вводили в испаритель хроматомасс-спектрометра. Условия ГХ/МС исследования: ввод пробы без деления потока газа-носителя. Режим работы детектора: селективный ионный мониторинг (SIM), колонка капиллярная DB-5MS (30,0 м – 0,250 мм – 0,25 мкм), скорость потока газа-носителя (гелия) 1,2 мл/мин, объем вводимой пробы 2 мкл, режим ввода — с делением потока 10:1, температура инжектора 250 °С. Общее время анализа 7,0 мин. Температура интерфейса, квадруполь и масс-детектора составляет 280; 150 и 230 °С соответственно. Режим сканирования — селективный мониторинг 193 m/z, данные приведены в таблице 1. Идентификацию обнаруженных соединений осуществляли с помощью электронных библиотек масс-спектров PMW Tox 3, NIST 11.

Таблица 1. — Газохроматографические и масс-спектральные характеристики карбамазепина

Соединение	m/z ионов	Время удерживания, мин	Интервал регистрации ионов, мин
Карбамазепин	193	5,87	5,78–6,20

Калибровочный график строили методом интегрированной линейной зависимости.

В пробы сыворотки крови объемом 1,0 мл вводили карбамазепин в пересчете на основе по 10; 20; 40 мг/л. Проводили по два определения для каждой калибровочной точки с использованием методики пробоподготовки, аналогичной выше изложенной. Количественное определение проводили с использованием ПЭВМ и программного обеспечения G1701DA MSD ChemStation. Расчет концентрации карбамазепина проводили по формуле:

$$C_x = \frac{Q \cdot 1000}{a \cdot 1000 \cdot 1000}$$

где C_x — концентрация карбамазепина в объекте, мг/л;

Q — количество карбамазепина, полученное по графику, мг/л;

a — объем крови, взятый на исследование, мл.

Полученный для крови градуировочный график является линейными в диапазоне концентраций 10,0–40,0 мг/л. Коэффициент корреляции составил $R^2 = 0,992$.

Предел обнаружения (LOD) карбамазепина составил 1,0 мг/л; предел количественного определения (LOQ) — 1,0–40,0 мг/л.

Результаты и их наблюдение. Поскольку карбамазепин в сыворотке крови при введении терапевтических доз препарата определяется в следовых количествах, в несколько раз меньше токсической концентрации [2, 3] и прочно связан с белками крови, был изменен способ пробоподготовки (способ 2), при котором удалось выделить и определить крайне низкие концентрации карбамазепина в сыворотке крови и мочи.

Терапевтический уровень карбамазепина в плазме крови варьирует от 6 до 8 мг/л. При передозировках пиковые концентрации в плазме крови изменялись в пределах от 18 до 70 мг/л. При концентрациях карбамазепина в плазме, равных или превышающих 40 мг/л, возрастает риск серьезных осложнений, таких как кома, припадки, дыхательная недостаточность и нарушения сердечного проведения.

Средняя токсическая концентрация карбамазепина в плазме крови и мочи пациентов с острыми отравлениями, показанная в таблице 2, укладывается в диапазон терапевтических концентраций и иллюстрирует качество пробоподготовки с предварительной дериватизацией ацетонитрилом.

Таблица 2. — Данные сравнительного анализа количественного определения карбамазепина у пациентов с острым отравлением, при различных способах пробоподготовки крови и мочи

Пробоподготовка	Диапазон концентраций, мг/л ($\pm S_x$)			
	10,0	15,0	20,0	свыше 20,0
Способ 1	0	0	6,8 \pm 0,002	10,8 \pm 0,1
Способ 2	9,9 \pm 0,001	15,0 \pm 0,001	17,9 \pm 0,001	23,0 \pm 0,001

Заклучение. Таким образом, разработанная методика подготовки пробы с использованием дериватизации ацетонитрилом перед экстракцией позволяет провести количественное определение карбамазепина в крови и моче, используя небольшие объемы биологического объекта, с применением современных физико-химических методов.

Литература

1. Okuma, T. A history of investigation on the mood stabilizing effect of carbamazepine in Japan / T. Okuma, A. Kishimoto // *Psychiatry. Clin. Neurosci.* — 1998. — Vol. 52, № 1. — P. 3–12.
2. Modulation of the gamma-aminobutyric acid type A receptor by the antiepileptic drugs carbamazepine and phenytoin / P. Granger [et al.] // *Mol. Pharmacol.* — 1995. — Vol. 47, № 6. — P. 1189–1196.
3. Larry, A. *Applied Clinical Pharmacokinetics* / A. Larry. — McGraw-Hill Education, 2008. — 826 p.
4. Лисовик, Ж. А. Об особенности действия карбамазепина при острых отравлениях / Ж. А. Лисовик, М. В. Белова, Л. А. Коваленко // *Токсикол. вестн.* — 2003. — № 3. — С. 24–28.

A METHOD OF PREPARING SAMPLES OF BLOOD AND URINE FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF CARBAMAZEPINE USING GAS CHROMATOGRAPHY — MASS-SPECTROMETRY

Lishai N. V.^{1, 2}, Vergun O. M.¹, Grinshpan D. D.³

¹*Educational Establishment “The Belarusian State Medical University”, Minsk, Republic of Belarus;*

²*Educational Establishment “Belarusian State University”, Minsk, Republic of Belarus;*

³*Research Institute for Physical Chemical Problems of the Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus*

The problem of acute poisoning chemical etiology, especially for the body, in recent decades in the environment. The current trends in the chemical and pharmaceutical industries contribute to the further exertion of toxicological conditions. the method of preparation of blood and urine samples for determination of carbamazepine on the basis of gas chromatography with mass-selective detection is offered.

Keywords: sample preparation, gas chromatography — mass-spectrometry (GC-MS), derivatization, poisoning, carbamazepine.