

## ДЕНСИТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БАРБИТУРАТОВ В КРОВИ

**А.В. Воронин**

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России

Для цитирования: Воронин А.В. Денситометрическое определение барбитуратов в крови // Аспирантский вестник Поволжья. – 2018. – № 5–6. – С. 13–16. doi: 10.17816/2072-2354.2018.18.3.13-16

Поступила в редакцию: 27.07.2018

Принята к печати: 07.09.2018

▪ Цель исследования — разработка методики количественного определения некоторых барбитуратов в крови методом тонкослойной хроматографии с компьютерной денситометрией. Объектом исследования были модельные образцы крови, содержащие лекарственные вещества барбитал, фенобарбитал, барбамил (амобарбитал). Определены параметры идентификации веществ методом тонкослойной хроматографии, исследованы интерференционные эффекты. Пределы обнаружения в образцах крови для изучаемых барбитуратов составили 600,0 нг/мл (5,0 мкг в пробе). Для количественного определения использовали сканирование хроматограмм, обработку изображения и построение градуировочной зависимости в компьютерной программе. Градуировочные зависимости описываются уравнениями полиномиальной (квадратичной) регрессии. Пределы количественного определения в образцах крови для разных веществ составили от 1200,0 до 1500,0 нг/мл; правильность и сходимости в сериях параллельных определений не превышает 23 %.

▪ **Ключевые слова:** барбитураты; тонкослойная хроматография; компьютерная денситометрия; количественное определение.

## THE DENSITOMETRIC QUANTITATION OF BARBITURATES IN THE WHOLE BLOOD

**A.V. Voronin**

Samara State Medical University

For citation: Voronin AV. The densitometric quantitation of barbiturates in the whole blood. *Aspirantskiy Vestnik Povolzhiya*. 2018;(5-6):13-16. doi: 10.17816/2072-2354.2018.18.3.13-16

Received: 27.07.2018

Accepted: 07.09.2018

▪ The aim of the study was the development of quantitation technique of some drugs in whole blood by means of thin-layer chromatography with videodensitometry. The study subject were model samples of whole blood containing barbital, phenobarbital, barbamy (amobarbital). The identification parameters of drugs by thin-layer chromatography were defined, interferences of blood matrix and other drugs were studied. Limits of detection in blood samples were 600,0 ng/ml (5,0 µg/spot) for barbital, phenobarbital, barbamy. The chromatogram scanning and processing images calibration models by using videodensitometry computer program were employed for quantitation. The calibration model is described by polynomial (square) regression. The limits of quantitation for different drugs ranges from 1200,0 to 1500,0 ng/ml; accuracy and precision don't exceed 23%. Conclusion. The quantitation technique of some barbiturates in whole blood by thin-layer chromatography with videodensitometry was developed. The ranges of quantitation allow to use this technique for forensic chemistry and clinical analytical toxicology.

▪ **Keywords:** barbiturates; thin-layer chromatography; videodensitometry; quantitation.

### Введение

В судебно-химической экспертизе и микро-токсикологическом анализе одной из актуальных задач является получение информации о наличии токсикологически важных веществ в биологических жидкостях на этапе предварительного исследования. Метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) является

экспрессным, высокопроизводительным и достаточно селективным. Введение в процедуру ТСХ-анализа денситометрии дает аналитику возможности документирования результатов и количественного определения [1]. Следует отметить преимущество ТСХ перед колоночными вариантами хроматографического анализа — высокая производительность и от-

сутствие ложноположительных результатов, связанных с переносом анализируемых веществ из одной пробы в другую в хроматографической системе [2].

**Цель исследования** — разработка методики количественного определения некоторых барбитуратов в крови методом тонкослойной хроматографии с компьютерной денситометрией.

### Материалы и методы

В работе были использованы стандартные образцы следующих веществ: барбитал, фенобарбитал, барбамил (амобарбитал) (LGC Standards, Великобритания).

Модельные образцы крови готовили путем добавления расчетного количества стандартных образцов вышеуказанных веществ (в виде метанольных растворов концентрации 10,0 мкг/мл) к образцам крови, не содержащим наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ. Диапазоны концентраций лекарственных веществ в пробах крови составляли: барбитал — 500,0–10 000,0 нг/мл; фенобарбитал, барбамил — 500,0–15 000,0 нг/мл.

Пробоподготовку образцов крови осуществляли жидкость-жидкостной экстракцией. Объем пробы крови составлял 10 мл; условия экстракции были следующими: диэтиловый эфир при значении pH 1–2. Полученные экстракты упаривали до сухого остатка в токе теплого воздуха при температуре не более 40 °С. Сухой остаток растворяли в 50 мкл смеси хлороформ-этанол (1 : 1).

Условия хроматографического разделения: пробу объемом 50 мкл наносили микрошприцем на пластины для ТСХ «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ» размером 10 × 15 см в виде полосы толщиной не более 1 мм и шириной не более 0,5 см, при нанесении зону первичной адсорбции высушивали теплым воздухом.

В качестве системы растворителей (подвижной фазы) использовали смесь хлороформ-ацетон (9 : 1). Насыщение камеры па-

рами растворителей проводили в течение 30 мин.

Детектирование хроматограмм проводили обработкой растворами ртути сульфата 2 % и дифенилкарбазона в хлороформе 0,05 %.

Полученные хроматограммы фиксировали путем сканирования с оптическим разрешением 900 dpi в True Color режиме на планшетном сканере, сохраняли в виде файлов с расширением jpeg и обрабатывали с использованием программы «ТСХ-менеджер 4.0» [3].

Определение пределов обнаружения и количественного определения, диапазона определяемых концентраций, интерференционных эффектов, правильности и прецизионности проводили в соответствии рекомендациями «Руководства по валидации аналитических методик, используемых в судебно-химическом и химико-токсикологическом анализе биологического материала» [4].

### Результаты и обсуждение

В табл. 1 приведены параметры методики идентификации исследуемых лекарственных веществ в модельных образцах крови. Была использована подвижная фаза и вариант детектирования анализируемых веществ, наиболее часто используемый в практике судебно-химической экспертизы.

Для определения предела обнаружения исследуемых веществ были проанализированы модельные образцы крови в следующих диапазонах концентраций — 100,0–5000,0 нг/мл.

Для пробоподготовки использовали образцы крови объемом 10 мл, а объем пробы, наносимой на хроматографическую пластину, составлял 50 мкл. При определении величины предела обнаружения использовали визуальную регистрацию обработанного изображения хроматограммы, для обработки изображения применяли программные средства «ТСХ-менеджер 4.0» — просмотр хроматограммы в негативе и увеличения контрастности. Все изучаемые барбитураты имели одинаковое значение предела обнаружения

Таблица 1 / Table 1

**Аналитические параметры идентификации барбитуратов в крови**  
**Analytical parameters for identification of barbiturates in whole blood**

Анализируемое вещество	$R_f$	Зоны	$R_s$	Предел обнаружения	
				$C$ , нг/мл	$m$ , мкг/проба
1. Барбитал	0,25 ± 0,05	1–2	0,42	600,0	5,0
2. Фенобарбитал	0,30 ± 0,03	2–3	0,34	600,0	5,0
3. Барбамил	0,34 ± 0,04	–	–	600,0	5,0

в образцах крови 600,0 нг/мл (5,0 мкг в пробе). Обработка хроматографических пластин раствором дифенилкарбазона в хлороформе 0,05 % является причиной появления фона хроматограмм.

Влияние балластных веществ крови на результаты анализа учитывали путем исследования «холостых» проб крови в вышеуказанных условиях. При этом на пластинках в диапазоне значений  $R_f$  0,2–0,8 хроматографических зон не детектировали.

Интерференционные эффекты оценивались на модельных образцах крови, которые содержали барбитал, фенобарбитал и барбамил (в концентрации 1000,0 нг/мл).

Полного разделения (разрешение  $R_s$  более 1,5) для хроматографических зон барбитала, фенобарбитала и барбамила не наблюдалось (табл. 1). Для пар анализируемых веществ, имеющих показатель  $R^S$  менее 1,5, при совместном присутствии в пробе крови их количественное определение невозможно.

Определение характера зависимости аналитического сигнала — площади хроматографической зоны — от концентрации определяемых веществ показало, что при количестве барбитала свыше 8,0 мкг в пробе, фенобарбитала, барбамила свыше 10,0 мкг в пробе на-

блюдается отклонение от линейной зависимости.

Для изучаемых лекарственных веществ были определены градуировочные зависимости, которые описываются уравнениями полиномиальной (квадратичной) регрессии, а также диапазоны концентраций в крови, в которых возможно проводить количественное определение (рабочие диапазоны методики) методом денситометрии (табл. 2).

Диапазоны определяемых концентраций в крови для барбамила соответствуют терапевтической концентрации, для фенобарбитала и барбитала — уровню содержания ниже терапевтической концентрации. В случаях исследования проб, содержащих барбитураты на уровне токсической и летальной концентраций, необходима процедура разведения пробы водой очищенной. Это обуславливает возможность применения предложенной методики для решения задач судебно-химической экспертизы, а также клинического химико-токсикологического анализа.

Для оценки правильности и прецизионности (сходимости) методики анализировали образцы крови с известными количествами лекарственных веществ трех уровней концентраций в пределах рабочего диапазона

Таблица 2 / Table 2

**Характеристики методики количественного определения барбитуратов в крови методом денситометрии**  
**The characteristics of the technique for barbiturates quantitation in whole blood by means of videodensitometry**

Анализируемое вещество	Уравнение градуировочной зависимости	Предел количественного определения, нг/мл	Диапазон определяемых концентраций, нг/мл
Барбитал	$0,069 \cdot X^2 + 75,0 \cdot X - 110,0$	1200,0	1200,0–10 000,0
Фенобарбитал	$0,024 \cdot X^2 + 110,4 \cdot X - 132,0$	1400,0	1400,0–15 000,0
Барбамил	$0,036 \cdot X^2 + 98,2 \cdot X - 73,8$	1500,0	1500,0–15 000,0

Таблица 3 / Table 3

**Результаты оценки правильности и прецизионности методики количественного денситометрического определения барбитуратов в крови**

**The evaluation of accuracy and precision of blood barbiturates quantitation method by means of videodensitometry**

Анализируемое вещество	Уровни концентраций в образцах крови, нг/мл	Правильность, %	Сходимость между сериями параллельных определений, %
Барбитал	Нижний 2000,0	14,8	17,8
	Средний 4000,0	11,0	7,4
	Высокий 8000,0	16,6	4,7
Фенобарбитал	Нижний 2000,0	15,4	20,4
	Средний 4000,0	12,7	8,8
	Высокий 10 000,0	18,5	5,4
Барбамил	Нижний 2000,0	22,6	21,2
	Средний 4000,0	15,5	11,3
	Высокий 10 000,0	21,2	6,5

методики. Определяли сходимость результатов измерений (относительное стандартное отклонение), полученных в пяти разных аналитических циклах — между сериями параллельных определений в разные дни (табл. 3).

Относительные погрешности определения барбитала, фенобарбитала в крови, используемые для оценки правильности методики, для всех уровней концентраций не превышали значения  $\pm 20,0\%$ . Для верхнего уровня концентрации барбитала (10 000,0 нг/мл) погрешность составляет около  $\pm 21,0\%$ .

Максимальное значение относительной погрешности определения наблюдалось для барбитала на нижнем уровне концентрации 2000,0 нг/мл и составило  $\pm 22,6\%$

Сходимость результатов определений всех анализируемых веществ на нижнем уровне концентраций была в диапазоне 17,0–21,0 %, на верхнем уровне концентраций — 4,7–6,5 %.

### Заключение

Разработана методика количественного определения лекарственных веществ — барбитала, фенобарбитала, барбитала в крови методом тонкослойной хроматографии с использованием компьютерной денситометрии. Сканирование хроматограмм и использование специальной программы позволило количественно оценить содержание лекарственных веществ в пробах крови.

Данная методика характеризуется показателями правильности и прецизионности, не превышающими значения  $\pm 23,0\%$ , и может быть рекомендована для применения в судебно-химической экспертизе и экспресс-диагностике острых отравлений.

### Список литературы

1. Кормишин В.А. Денситометрическое определение некоторых наркотических средств и психотропных веществ в химико-токсикологических исследованиях: Автореф. дис. ... канд. фарм. наук. — Самара, 2014. [Kormishin VA. Densitometric determination of some narcotic drugs and psychotropic substances in chemical-toxicological studies. [dissertation] Samara; 2014. (In Russ.)]
2. Обьедкова Е.В. Разработка схемы определения стероидных гормонов и нестероидных противовоспалительных препаратов в биологических жидкостях методом ВЭТСХ: Автореф. дис. ... канд. хим. наук. — СПб., 2014. [Ob'edkova EV. Razrabotka skhemy opredeleniya steroidnykh gormonov i nesteroidnykh protivovospalitel'nykh preparatov v biologicheskikh zhidkostyakh metodom VETSKh. [dissertation] Saint Petersburg; 2014. (In Russ.)]
3. Ренкевич А.Ю., Куликов А.Ю. Разработка и валидация методики количественного определения 4-аминобутановой кислоты в таблетках алендроната натрия методом мицеллярной тонкослойной хроматографии // Методы и объекты химического анализа. — 2013. — Т. 8. — № 4. — С. 199–206. [Renkevich AY, Kulikov AY. Development and validation 4-aminobutyric acid assay in alendronate sodium tablets using micellar thin-layer chromatography. *Methods and Objects of Chemical Analysis*. 2013;8(4):199-206. (In Russ.)]
4. Барсегян С.С., Саломатин Е.М., Плетенева Т.В., и др. Методические рекомендации по валидации аналитических методик, используемых в судебно-химическом и химико-токсикологическом анализе биологического материала. — М., 2014. [Barsegyan SS, Salomatin EM, Pleteneva TV, et al. Metodicheskie rekomendatsii po validatsii analiticheskikh metodik, ispol'zuemykh v sudebno-khimicheskom i khimiko-toksikologicheskome analize biologicheskogo materiala. Moscow; 2014. (In Russ.)]

#### ■ Информация об авторе

Александр Васильевич Воронин — кандидат фармацевтических наук, доцент, заведующий кафедрой химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «СамГМУ» Минздрава России. E-mail: dimmu2000@mail.ru.

#### ■ Information about the author

Alexander V. Voronin — Candidate of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor, Head of the Chemistry Department of Pharmaceutical Faculty, Samara State Medical University. E-mail: dimmu2000@mail.ru.