

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневич

06.03.2014

Регистрационный № 077-0713

**МЕТОД ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ СОСТОЯНИЙ
ИНТОКСИКАЦИИ, ВЫЗВАННЫХ ПОТРЕБЛЕНИЕМ ФЕНОБАРБИТАЛА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», УЗ «Городской клинический наркологический диспансер» г. Минска

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. В.С. Камышников, А.М. Чубуков, А.В. Выдрицкий, И.Л. Мастяйкина

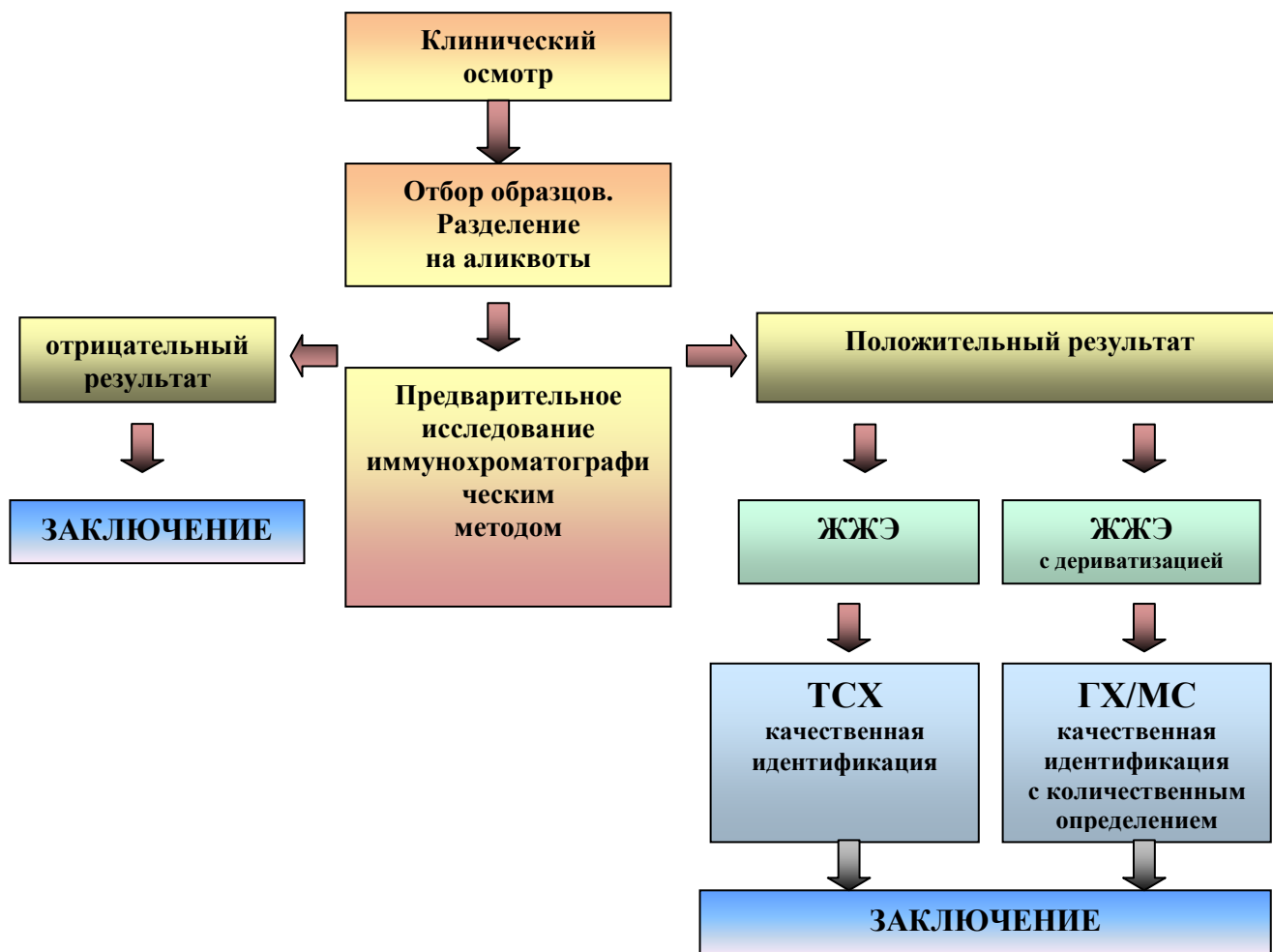
Минск 2013

Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) включает алгоритм лабораторной диагностики состояний интоксикации, вызванных употреблением барбитуратов. Под общим названием «барбитураты» понимают группу веществ, производных барбитуровой кислоты (малонилмочевины), имеющих близкое химическое строение и обладающих широким спектром действия — от антиконвульсивного и снотворного до анальгезирующего и даже наркотического, обусловленного угнетающим действием на центральную нервную систему.

Основной целью разработанного метода является идентификация и количественное определение фенобарбитала в крови и моче методами хроматографии в тонком слое сорбента (ТСХ) и газовой хроматографии/масс-спектрометрии (ГХ/МС) с использованием микроэкстракции на этапе пробоподготовки.

Инструкция предназначена для использования в специализированных лабораториях лечебных учреждений при химико-токсикологических исследованиях с целью обнаружения психоактивных веществ.

Последовательность этапов клинико-лабораторной диагностики употребления фенобарбитала отражена в следующей схеме:



ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Средства измерения и вспомогательные устройства:

1. Вакуумный насос KNF 022AN/18 или аналогичный.

2. Весы лабораторные аналитические с погрешностью взвешивания $\pm 0,0001$ г.
3. Весы лабораторные с погрешностью взвешивания $\pm 0,01$ г.
4. Виалы с завинчивающимся колпачком на 2 мл.
5. Вставки в виалу, стеклянные на 250 мкл.
6. Воронки конические, диаметром 5 см.
7. Газовая арматура (трубопроводы, редуктор, скобы, штуцера и др.).
8. Газовый хроматограф с масс-детектором.
9. Дозатор пипеточный с переменным объемом 2–20 мкл.
10. Дозатор пипеточный с переменным объемом 20–200 мкл.
11. Камеры хроматографические стеклянные объемом 500 мл.
12. Колба коническая из термостойкого стекла объемом 1000 мл.
13. Колба мерная 2а-1000-2 по ГОСТ 1770-74.
14. Колба мерная 2а-100-2 по ГОСТ 1770-74.
15. Колба мерная 2а-50-2 по ГОСТ 1770-74.
16. Колба мерная 2а-25-2 по ГОСТ 1770-74.
17. Пипетка градуированная 2-1-2-5 по ГОСТ 29227-91.
18. Пипетка пастеровская.
19. Пробирка мерная объемом 10 мл со шлифом и притертой пробкой.
20. Пробирка полипропиленовая с крышкой объем 1,5 мл.
21. рН-метр лабораторный.
22. Секундомер по ГОСТ 5072-79.
23. Стаканы по ГОСТ 23932-90.
24. Станция управления и сбора хроматографических данных на базе компьютера Pentium 5 или выше.
25. Флаконы экстракционные БСС 25.
26. Флаконы экстракционные объемом 12 мл.
27. Холодильник-морозильник по ГОСТ 16317-95.
28. Центрифуга лабораторная с бакет-ротором.
29. Цилиндр 1-100-2 по ГОСТ 1770-74.
30. Цилиндр 1-50-2 по ГОСТ 1770-74.
31. Цилиндр 1-10-2 по ГОСТ 1770-74.
32. Чашка выпарительная, фарфоровая № 3.
33. Чашка концентрационная, стеклянная, объемом 10 мл.
34. Шейкер планетарный.
35. Шпатель по ГОСТ 9147-80.

Реактивы и материалы:

1. Ацетонитрил, х.ч.
2. Гексан, х.ч.
3. Гелий газообразный (сжиженный) очищенный марки «А».
4. Диметилсульфоксид безводный, х.ч.
5. Дихлорметан (хлороформ), х.ч.
6. Йодометан стабилизированный.
7. Кислота соляная концентрированная, х.ч.
8. Кислота серная концентрированная, х.ч.
9. Натрий фосфорнокислый двухзамещенный двухводный, х.ч.

10. Пластины хроматографические, тип сорбента — силикагель зернением 8–12 мкм, толщина слоя 100 мкм.
11. Ртуты окись желтая, х.ч.
12. Спирт метиловый, х.ч.
13. Спирт этиловый ректифицированный зерновой для медицинских целей, 95–96%.
14. Тест-полоски на основе моноклональных антител.
15. Тетраметиламмония гидроокись, 25%-й раствор в метаноле, х.ч.
16. Уксусно-этиловый эфир (этилацетат), х.ч.
17. Универсальная индикаторная бумажка рН 1–14.
18. Фильтры беззольные $d = 9$ см «синяя лента».

Стандартные вещества:

1. Фенобарбитал >99%.
2. Барбитал >99%.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАКТИВОВ

Приготовление «хромпика»

Взвешивают 50 г калия двуххромовокислого (с точностью 0,01 г) и переносят в коническую колбу из термостойкого стекла, прибавляют 200 мл дистиллированной воды и перемешивают до полного растворения; малыми порциями (≈ 20 мл) добавляют 500 мл концентрированной серной кислоты при охлаждении и периодическом перемешивании.

Приготовление 0,02% дифенилкарбазона в хлороформе

Взвешивают 0,01 г дифенилкарбазона и переносят в мерную колбу объемом 50 мл, добавляют 3–4 мл хлороформа и перемешивают до полного растворения и доводят до метки хлороформом. Хранится склянке из темного стекла с притертой пробкой.

Приготовление водного раствора сульфата ртути (HgSO_4)

Взвешивают 2,5 г желтой окиси ртути (HgO) и переносят в коническую колбу объемом 100 мл. Добавляют 15–20 мл 20% раствора серной кислоты и перемешивают до полного растворения. Объем доводят до 50 мл 20% раствором серной кислоты

Приготовление 20% водного раствора серной кислоты

Мерным цилиндром отмеривают 99 мл дистиллированной воды, помещают в коническую колбу из термостойкого стекла объемом 250 мл, затем отмеривают 14,2 мл концентрированной серной кислоты (26,02 г) и добавляют медленно при охлаждении в воду, перемешивают до полного остывания.

Приготовление 2н раствора соляной кислоты

Мерным цилиндром отмеривают 17 мл концентрированной соляной кислоты и доводят водой 100 мл в мерной колбе.

Приготовление 1н раствора соляной кислоты

Мерным цилиндром отмеривают 8,5 мл концентрированной соляной кислоты и доводят водой 100 мл в мерной колбе.

Приготовление 25% раствора гидроксида тетраметиламмония в метаноле

Взвешивают 25,0 г гидроксида тетраметиламмония, переносят в мерную колбу объемом 100 мл и доводят до метки метанолом, перемешивают. Раствор хранится в склянке с притертой пробкой при температуре не +8°C.

Приготовление раствора внутреннего стандарта в этаноле

Взвешивают 0,05 г (с точностью до 0,0001) барбитала, помещают в мерную колбу со шлифом объемом 50 мл и добавляют этиловый спирт до половины объема, перемешивают до полного растворения барбитала, доводят до метки этиловый спиртом, перемешивают. Раствор хранится в склянке с притертой пробкой при температуре не +8°C.

Приготовление стандартного раствора фенобарбитала

Взвешивают 0,05 г (с точностью до 0,0001) барбитала, помещают в мерную колбу со шлифом объемом 50 мл и добавляют этиловый спирт до половины объема, перемешивают до полного растворения барбитала, доводят до метки этиловый спиртом, перемешивают. Раствор хранится в склянке с притертой пробкой при температуре не +8°C.

Калибровочные растворы фенобарбиталаготавливаются по мере необходимости в пределах линейности шкалы от 1,0 мкг в 1 мл раствора до 40 мкг/мл и от 5 мкг/мл до 100 мкг/мл (мг/л) с использованием мочи или плазмы заведомо не содержащей фенобарбитал.

ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Анализируемые образцы

Кровь (не менее 20 мл) отбирают в сухой чистый флакон с добавлением антикоагулянта (гепарин 4–5 капель).

Мочу (не менее 100 мл) собирают в чистую сухую пластиковую или стеклянную посуду без консервантов. Для анализа следует применять только прозрачные образцы, при необходимости мочу следует фильтровать или центрифугировать. Примеси (отбеливатели или другие оксидирующие агенты), попадающие в образцы мочи на преаналитическом этапе, могут давать ошибочные результаты тестирования.

Предварительное исследование

Методом предварительного анализа, позволяющим произвести скрининговый поиск барбитуратов, является иммунохроматографический — с применением экспресс-тестов. При использовании тест-полосок присутствует вероятность получения ложноположительного результата из-за наличия кросс-реакций с некоторыми веществами иной химической структуры, поэтому *для исключения ошибок при положительном или сомнительном результате в обязательном порядке необходимо проведение подтверждающего химико-токсикологического исследования другим, более специфичным методом.*

В случае отрицательного результата при исследовании с использованием экспресс-тестов дальнейший анализ проводить нецелесообразно из-за достаточно высокой чувствительности иммунохимического метода.

При положительном результате в качестве дополнительных методов исследования используются метод ТСХ, проводимая после пробоподготовки методом жидкость-жидкостной экстракции (ЖЖЭ) и ГХ/МС после пробоподготовки

методом ЖЖЭ с дериватизацией.

Проведение пробоподготовки

Пробоподготовка для исследования методом ТСХ

В экстракционную трубу (флакон БСС 25) помещают 10 мл мочи или 5 мл плазмы и добавляют 0,2 мл (для плазмы 0,1 мл) 2н раствора соляной кислоты, перемешивают и проверяют рН с помощью универсальной индикаторной бумаги. При необходимости доводят рН до значений 2,0 раствором соляной кислоты. Экстракцию проводят дважды: 10 мл мочи (5 мл плазмы), первый раз диэтиловым эфиром; второй раз хлороформом (в объемном отношении «экстрагент» : биологическая жидкость — 1:1. Время экстракции — 10 мин на планетарном шейкере типа S-3 при 120 об./мин. Содержимое трубы переносят в пластиковую пробирку и центрифугируют 10 мин при 3000 об./мин на центрифуге типа СМ-6М. Верхний слой эфира и нижний слой хлороформа отделяют с помощью пластиковой пипетки и переносят в выпарительную чашку при исследовании мочи или концентрационную чашку при исследовании плазмы. Выпаривают досуха в токе теплого воздуха при температуре не выше 40°C или в вакуумном сушильном шкафу при температуре 40°C.

Пробоподготовка для проведения исследования методом ГХ/МС

В экстракционную трубу объемом 12 мл помещают 2 мл мочи или плазмы добавляют 50 мкл внутреннего стандарта (барбитал в этаноле 1 г/л), затем 1 мл ацетатного буфера с рН 4,8 и 5 мл смеси гексан : этилацетат (соотношение 3:20). Трубу с исследуемым образцом встряхивают на шейкере 10 мин при 140 об./мин, затем центрифугируют 3 мин при 3000 об./мин на центрифуге типа СМ-6М. Верхний слой смеси органических растворителей отделяют и фильтруют через безводный сульфат натрия, смоченный этилацетатом, в концентрационную чашку, выпаривают досуха в токе теплого воздуха. Сухой остаток растворяют в 0,4 мл ацетонитрила и переносят в экстракционную трубу на 12 мл, добавляют 4 мл гексана (соотношение ацетонитрил : гексан должно быть 1:10). Трубу с исследуемым образцом встряхивают на шейкере 10 мин при 140 об./мин, затем центрифугируют 3 мин при 3000 об./мин. Нижний слой (ацетонитрил) отбирают пастеровской пипеткой, переносят в концентрационную чашку и выпаривают досуха в токе теплого воздуха. К сухому остатку добавляют 100 мкл диметилсульфоксида, 20 мкл 25% раствора гидроксида тетраметиламмония в метаноле и после 2 мин выдержки 40 мкл йодметана. После выдержки при комнатной температуре в течение 10 мин к смеси добавляют 100 мкл 1н раствора соляной кислоты и 500 мкл толуола. Смесь тщательно перемешивают и переносят в полипропиленовую пробирку объемом 1,5 мл с крышкой, пробирку закрывают и встряхивают 2 мин на шейкере при 140 об./мин, затем центрифугируют 5 мин при 3000 об./мин. Верхний органический слой отбирают автоматической пипеткой, переносят в микровиалу на 250 мкл и анализируют методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии (ГХ/МС).

Исследование методом хроматографии в тонком слое

Метод хроматографии в тонком слое сорбента основан на принципе сорбции/десорбции веществ в закрепленном слое сорбента при их перемещении подвижной жидкой фазой. В качестве сорбентов используются силикагели, кремниевая кислота, оксид алюминия и др., которые закрепляются на специальных

пластинах (подложках), изготавливаемых из стекла, пластифицированной целлюлозы, алюминиевой фольги и политерефталата (ПТФ). В слой сорбента дополнительно может быть введена флюоресцирующая добавка. ТСХ используется для дополнительной очистки определяемых веществ, их изолирования и обнаружения, а в модифицированном виде и для подтверждающего исследования барбитуратов.

Подготовительные операции

Хроматографическое разделение (проявление или элюирование) производят в герметично закрытых стеклянных камерах. Для обеспечения герметичности прилегания крышки шлиф обрабатывают вакуумной силиконовой смазкой или очищенным вазелином.

Приготовление хроматографических систем. Отмеривание компонентов смеси производится с помощью пипеток, мерных пробирок или цилиндров (не менее 2-го класса точности). Смешивание компонентов осуществляют в мерных цилиндрах или пробирках со шлифом (*Перемешивание в хроматографической камере недопустимо!*).

Состав рекомендуемой смеси для хроматографического разделения барбитуратов: хлороформ – н-бутанол – 25% раствор аммиака (70:40:5).

Приготовленную смесь растворителей пропускают через бумажный складчатый фильтр и переносят в хроматографическую камеру, которую закрывают крышкой и насыщают парами растворителей не менее 30 мин. Хроматографическая система может использоваться не более 4–5 раз, но не более одной рабочей смены.

Для исследования методом ТСХ используются извлечения, полученные способом жидкость-жидкостной экстракции

Нанесение пробы

Сухой остаток, полученный из исследуемого образца после проведения пробоподготовки, растворяют в 100 мкл хлороформа и наносят с помощью пастеровской пипетки на стартовую линию хроматографической пластины TLC Silica gel 60 F254 на алюминиевой основе на расстоянии не менее 10 мм от нижнего края и не менее 15 мм от бокового края в одну точку несколькими порциями, высушивая каждую порцию в токе воздуха. Одновременно на пластину наносят 10 мкл стандартного спиртового раствора фенобарбитала. Пластины высушивают до удаления запаха растворителей и помещают в подготовленную хроматографическую камеру. Фронт растворителей не должен подниматься выше 5 мм от верхнего края пластины.

Идентификация барбитуратов

После хроматографического разделения идентификацию барбитуратов проводят раствором дифенилкарбазона (ДФК) в хлороформе с последующим напылением раствора сульфата ртути (HgSO_4) в 20% серной кислоте. Реактив сульфата ртути с дифенилкарбазаном обладает высокой чувствительностью к барбитуратам, однако он токсичен и должен использоваться с соответствующей предосторожностью. В зоне расположения фенобарбитала наблюдается сине-фиолетовое пятно. После обработки хроматографической пластины реагентами идентификацию производят по соответствию длины пробега веществ (R_f — отношение длины пробега вещества к длине пробега растворителя) длине пробега

стандартного вещества. Rf фенобарбитала 0,63 и специфической окраске. Предел обнаружения барбитуратов составляет от 1 мкг вещества в пятне.

Исследование методом газовой хроматографии с масс-спектральным детектированием.

Метод представляет собой сочетание газохроматографического разделения веществ с последующим детектированием их масс-спектральных характеристик. Газожидкостная хроматография основана на принципе сорбции веществ неподвижной жидкой фазой и дальнейшей их десорбции потоком газа-носителя. Неподвижная жидкая фаза наносится на твердый носитель (набивные колонки) или на стенки тонкого стеклянного капилляра (капиллярные колонки). Способ масс-спектрометрического детектирования основан на регистрации ионизированных молекул веществ. При этом измеряется отношение массы заряженных частиц материи к их заряду. Ионизация молекул анализируемого вещества производится в вакууме или атмосфере газов. Для ионизации применяются различные процессы возбуждения (электронный удар, химическая ионизация, полевая ионизация и др.), после чего ионы разделяют и идентифицируют. Разделение ионов основано на их разных траекториях движения в магнитном либо электростатическом полях. Регистрация заряженных частиц производится с помощью фотоумножителей. Обработка сигналов производится с помощью персонального компьютера (ПК).

Условия разделения

Капиллярная кварцевая колонка_DB-5 MS, длина 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм, толщина фазной пленки 0,25 мкм (5% фенилметилполисилоксана).

Газ носитель гелий, давление на входе в колонку 3 пси; скорость газа через систему очистки — 15 мл/мин в течении 2 мин; скорость в системе регулирующего клапана — 19,6 мл/мин; скорость потока газа через колонку — 1,0 мл/мин.

Ввод пробы в автоматическом режиме; объем пробы 1 мкл, режим ввода с разделением потока — 1:4.

Температура инжектора 250°C, температура колонки изменяется в программируемом режиме: начальная температура — 75°C, поддерживается постоянно 2 мин, далее увеличивается со скоростью 15°/мин до 280°C и поддерживается постоянной в течении 15 мин. Длительность исследования — 30,67 мин.

Температура интерфейса 280°C, температура квадруполя — 150°C, температура масс-детектора — 230°C.

Схема анализа

Перед исследованием пробы анализируемого вещества необходимо:

- проверить «остаточную память» колонки, для чего производится анализ растворителя, используемого для растворения сухого остатка;

- проверить стабильности параметров хроматографической и детектирующей системы, для чего производится анализ реконструирующего раствора, содержащего внутренний стандарт. Повторить исследование 2–3 раза с целью определения воспроизводимости времени удерживания и площади пика внутреннего стандарта;

- произвести анализ холостой пробы с целью выявления эндогенных соединений.

Произвести анализ исследуемой пробы.

При хроматографических исследованиях запись хроматограммы начинается с 4-й мин после ввода пробы. Регистрацию производят в режимах Total Ion и Spectrum.

Детектирование ионов проводят при энергии электронной ионизации 70 эВ, режим сканирования ионов — от 1,6–800 а.е.м., скорость сканирования — 5200 а.е.м./с с шагом 0,1 а.е.м.

Хроматограмму анализируемой пробы обрабатывают с помощью специализированной компьютерной программы, оснащенной библиотеками масс-спектров PMW Tox 3, Wiley7, NIST 05, Structures NIST 05 или др.

Оценка результатов

Идентификация обнаруживаемых веществ проводится путем сравнения времен удерживания их характеристических ионов в анализируемом образце с библиотечными данными. Время удерживания диметилбарбитала, используемого в качестве внутреннего стандарта 4,577 мин, диметилфенобарбитала — 7,845 мин. Хроматограмму обрабатывают с помощью специализированной компьютерной программы. Обнаружение характеристических ионов (для диметилбарбитала — 169,1 и для диметилфенобарбитала — 232,1) с достоверностью более 80% свидетельствует о наличии данного вещества в исследуемых образцах и позволяет провести расчет количественного содержания фенобарбитала.

Расчет количественного содержания фенобарбитала производится по калибровочным графикам, для построения которых используются калибровочные растворы фенобарбитала различной концентрации в пределах от 1,0 до 40,0 мг/л и от 5,0 до 100 мг/л. Для количественного определения предлагается метод внутренней калибровки с использованием в качестве внутреннего стандарта барбитала, который добавляется в исследуемый биологический объект в количестве 50 мкг в виде спиртового раствора концентрацией 1 г/л. Соотношение интенсивности пиков анализируемого вещества и внутреннего стандарта на хроматограммах оценивают по калибровочным графикам. Исследование калибровочных растворов при построении графиков проводят по схеме, описанной для исследования биологических образцов. Установлен предел обнаружения веществ методом ГХ/МС, который составил 10^{-9} – 10^{-10} г/л.