

## 1.2 «Фармацевтическая химия»

### КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРБАМАЗЕПИНА МЕТОДОМ ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Балакина К.В., Уразов Т.Х.

ГОУ ВПО УГМА

Отравления противоэпилептическими препаратами, в связи с небольшой широтой терапевтического действия и специфичностью заболевания, встречаются довольно часто. По этой причине идентификация вещества, вызвавшего отравление, и количественный анализ имеет большое значение в клиничко-токсикологическом анализе. Карбамазепин — противосудорожный препарат иминостильбенового ряда с карбамильной группой в 6-м положении, которая в основном определяет его противосудорожный эффект. Обычно карбамазепин рассматривается как препарат первого выбора при лечении парциальной эпилепсии как с комплексной симптоматикой, так и без нее.

До недавнего времени в химико-токсикологической лаборатории ГБУЗ «СОКПБ» применялся метод поляризационного флуориметрического иммунного анализа (ПФИА) на приборе Abbot TDx. Недостатками метода являются в первую очередь стоимость расходных материалов, во-вторых, метод полуквалификационный, а также с 2010 года прекратилось производство реагентов, что требует поиска других методов анализа.

Для измерения концентрации препарата в плазме крови в литературе используют газожидакостную хроматографию [1], жидкостную хроматографию под давлением и иммунохимические методы. [2, 3] Однако, многие методы анализа недоступны ввиду высокой стоимости оборудования, сложности выполнения в качестве рутинного метода.

**Цель исследования** – Разработать методику количественного определения карбамазепина в сыворотке крови методом газожидакостной хроматографии.

#### **Материалы и методы**

Данное исследование проводилось на базе химико-токсикологической лаборатории Свердловского областного центра острых отравлений. Количество проб сыворотки с заданными концентрациями карбамазепина, проанализированных методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором (ГХ-ПИД), составило 36. Количество проб водных растворов с заданными концентрациями карбамазепина - 6. (ГХ-ПИД).

В качестве объектов исследования были использованы плазменные и водные растворы карбамазепина (10мкг/мл, 50 мкг/мл, 100мкг/мл), приготовленные из метанольного раствора карбамазепина с концентрацией 10 мг/мл. Субстанцию карбамазепина, полученную из таблетки карбамазепина путём экстракции и выпаривания, растворили в необходимом количестве метанола для получения раствора с концентрацией карбамазепина 10мг/мл (раствор А). Затем разведением плазмой или водой необходимого количества данного раствора получали соответствующие растворы заданной концентрации. Для эксперимента на сыворотке крови использовали донорскую плазму, не содержащую карбамазепина и его метаболитов.

Анализ проводился на газовом хроматографе GC-2014 с пламенно-ионизационным детектором и автоматическим устройством для ввода пробы (Shimadzu Corporation, Япония), оснащённом капиллярной кварцевой колонкой DB-17 EVDX 30,0 с внутренним диаметром 250 мкм, толщиной пленки 0,25 мкм производства Agilent Technologies (США).

Для пробоподготовки использовалось следующее оборудование: центрифуга “Elmi” Multi Centrifuge CM 6M; перемешивающее устройство (шейкер) “Экрос”; дозаторы одноканальные переменного объема.

В экспериментальных исследованиях использовались субстанции, сырьё и реактивы, получаемые преимущественно с химических и химико-фармацевтических заводов. Всё сырьё

отвечает требованиям НД (ГОСТ, ТУ, ФС, CAS). Используемое сырьё и реактивы: натрия хлорид, соль для щелочных извлечений (состава: натрия карбонат, натрия гидрокарбонат, магния сульфат, натрия хлорид), толуол, хлорная кислота, изопропиловый спирт, н-гептан, метанол, вода очищенная, неукупроина гидрохлорид.

Обработка данных — запись хроматограммы, определение времен удерживания, площадей пиков, высот пиков — проводилась с помощью пакета GCSolution Version 2.30.00SU4 (Shimadzu Corporation, Япония).

Для расчета показателей общей статистики и построения графиков использована программа Microsoft Office Excel 2007, определены среднее значение, стандартное отклонение и коэффициент вариации площадей пиков [4,5].

#### Результаты и их обсуждение

Исходные условия хроматографического процесса, были подобраны мною ранее, в результате другой исследовательской работы: Объем пробы 1,0 мкл, температура инжектора 250 °С, режим ввода: без деления потока, программа термостата колонки: начальная температура 100,0°С, время выдержки 1,00 мин, затем нагрев колонки со скоростью 25°С/мин и конечная температура 250°С – время выдержки 14,00 мин, время анализа 21,00 мин.

Исходная методика пробоподготовки (разработанная ранее Куликовой Л.Ф.) была следующей: К 1 мл плазмы крови с заданной концентрацией карбамазепина добавляли внутренний стандарт - раствор неукупроина в метаноле с концентрацией 100 мкг/мл в количестве 100 мкл; затем добавляли 1 мл воды очищенной и 1 мл 5 % раствор хлорной кислоты, в качестве осадителя для очищения сыворотки от белковой фракции, перемешивали, центрифугировали 10 минут. К отобранной надосадочной жидкости добавляли 1 г хлорида натрия в качестве высаливающего агента и 2 мл экстрагента (дихлорметан: гептан: этилацетат: изопропанол (5:2:2:1)). Затем пробирки помещали на шейкер на 7 минут, после чего центрифугировали 3 минуты. Отбирали органическую фазу, которую упаривали в токе теплого воздуха. Сухой остаток растворяли в 100 мкл метанола и анализировали методом газовой хроматографии.

Поскольку при использовании стандартного экстрагента образовывалась устойчивая эмульсия, было проведено исследование по подбору оптимального экстрагента. Для этого был приготовлен новый экстрагент с учетом физико-химических свойств карбамазепина состава: толуол: изопропанол (9:1). Подготовлены и проанализированы 9 проб плазменного раствора карбамазепина с заданными концентрациями. В ходе анализа выяснилось, что наиболее подходящим способом пробоподготовки, является экстракция приготовленным экстрагентом (толуол: изопропанол(9:1), без чистки гептаном). Подбор внутреннего стандарта был проведен ранее, но при использовании в качестве стандарта раствора неукупроина с концентрацией 100 мкг/мл в количестве 100 мкл хроматографический пик был мал для интегрирования, в результате чего была значительная погрешность. Было решено использовать 200 мкл внутреннего стандарта, что привело к удовлетворительным результатам.

В ходе анализа была оценена погрешность прибора. Было проанализировано 2 пробы плазменного раствора с концентрацией 10 мкг/мл по 5 анализов каждой. Средняя погрешность оказалась равной 1,8%. Для оценки сходимости (погрешности внутри серии проб) было проанализировано 2 серии проб по 5 проб в каждой с концентрацией 10 мкг/мл карбамазепина, сходимость составила 5 %. Данные результаты соответствует требованиям анализа.

Результатом анализа растворов карбамазепина различной концентрации (10, 50 и 100 мкг/мл) методом ГХ-ПВД стало установление зависимости между площадями пиков иминотильбена и карбамазепина. В последнем эксперименте была полностью воспроизведена предложенная методика анализа. Полученные данные о площади пиков приведены в таблице.

	10мкг/мл	50мкг/мл	100мкг/мл
Площадь пика Иминостильбена	12123,1	53588,3	82393,8
Площадь пика Неокупроина	16863,7	18877,2	18429,5
Площадь пика Карбамазепина	25980,8	109892,8	247424,2
сумма площадей пиков карбамазепина и иминостильбена	38103,9	163481,1	329818
Соотношение суммы к площади пика неокупроина	2,259522	8,660241	17,8962

Исходя из полученных данных был составлен график зависимости соотношения суммы площадей пиков иминостильбена и карбамазепина к площади пика неокупроина от исходной концентрации карбамазепина (рис.1)

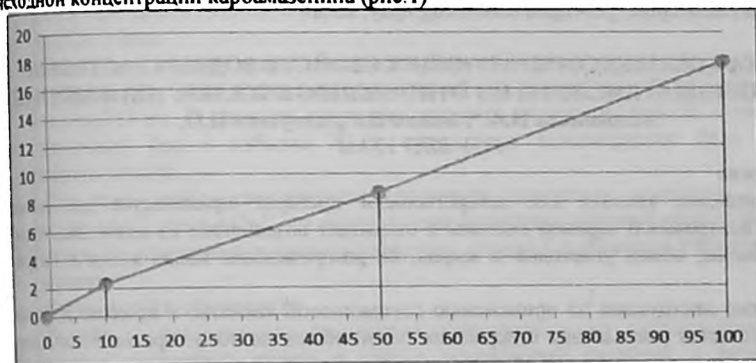


Рис. График зависимости соотношения суммы площадей пиков иминостильбена и карбамазепина к площади пика неокупроина от исходной концентрации карбамазепина.

Из данных результатов можно сделать вывод о том, что условия экстракции и хроматографирования подходят для количественного определения содержания карбамазепина в сыворотке крови.

#### Выводы

В ходе работы были подобраны условия изолирования карбамазепина из сыворотки крови методом жидкость-жидкостной экстракции, экстракцию проводить экстрагентом, являющимся смесью растворителей (толуол: изопропанол (9:1)), при pH 7. В качестве внутреннего стандарта предпочтительно использовать 200 мкл раствора неокупроина с концентрацией 100мкг/мл.

Изучена зависимость содержания карбамазепина и иминостильбена от исходной концентрации карбамазепина, зависимость оказалась линейной, что позволяет взять данную методику анализа для разработки количественного метода определения карбамазепина в сыворотке крови.

Оценена погрешность прибора и сходимость внутри серии проб, результаты отвечают требованиям анализа.

#### Список литературы

1. Хайвер К. Высокоэффективная газовая хроматография: Пер. с англ. / Под ред. К. Хайвер. — М.: Мир, 1993. — 288 с.
2. Хроматография: Практическое приложение метода. Пер. с англ. / Под ред. Э.Хэфман. в 2-х частях. Том 2, - Москва «Мир», 1996 г — 422 стр.
3. Bashi Comparative analysis of antiepileptic drugs by gas chromatography using capillary or packed columns and by fluorescence polarization immunoassay. / K. Chen, H. K. // Journal of Analytical Toxicology. — vol. 15, no. 2, 1991 — P. 82–85.
4. Орлов А.И. Прикладная статистика. Учебник. / А.И.Орлов. — М.: Издательство «Экзамен», 2004. — 656 с.

5. Гланц С. Медико-биологическая статистика. /пер. с англ. Данилова Ю.А./ред. Самойлова Д.В., Бузихашвили Н.Е. – М.:Практика,1999. – 462 с.

**Quantitative analysis of carbamazepine in blood serum by gas-liquid chromatography method.**

**Balagina K.V., Urasaev T.H.**

Identification of the antiepileptic drugs which have caused a poisoning, and the quantitative analysis is of great importance in the clinic-toxicological analysis. In the course of the research work the conditions for isolation of carbamazepine from serum by liquid-liquid extraction were chosen. The dependence of carbamazepine and iminostilben content on the initial concentration of carbamazepine was studied. It is found to be linear so that this method of analysis can be used for the determination of carbamazepine in serum.

**Keywords:** carbamazepine, gas-liquid chromatography, serum

**ОЦЕНКА КОМПЛЕКСООБРАЗУЮЩИХ СВОЙСТВ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ ПО ОТНОШЕНИЮ К ЖЕЛЕЗУ (III) И МЕДИ (II)**

**Белоконова Н.А.<sup>+</sup>, Божко Я.Г., Петухова И.О.**

*ГОУ ВПО УГМА*

**Введение**

Глутаминовая кислота как лекарственный препарат применяется для лечения заболеваний центральной нервной системы и оказывает воздействие на аминокислотный и белковый обмена, обмен углеводов и жиров, на распределение ионов калия и натрия в клетке [1].

Согласно инструкции по применению глутаминовой кислоты, в качестве побочного действия отмечается уменьшение содержания гемоглобина, поэтому, противопоказанием к использованию является наличие у пациента железодефицитной анемии.

Глутаминовая кислота способна к комплексообразованию с  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  [2] - непосредственными участниками синтеза гемоглобина в организме, поэтому представляет практический интерес оценка комплексообразующих свойств водных растворов глутаминовой кислоты по отношению этим ионам.

**Цель работы:** оценить комплексообразующие свойства водных растворов глутаминовой кислоты по отношению к катионам  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ .

**Материалы и методы**

Водные растворы: глутаминовой кислоты, трилона Б и фталевой кислоты с концентрацией по ООУ от 5 мг/л до 200 мг/л; хлорида железа (III) и сульфата меди (II) с концентрацией 0,05 н; раствор иодида калия с  $\omega_{раств. \text{ в-ва}} = 90\%$ , УФ-спектрофотометр.

Для определения комплексообразующей активности глутаминовой кислоты по отношению к  $Fe^{3+}$  был использован авторский запатентованный метод [3].

Количественно оценить прочность железо-глутаминовых комплексов можно по значению коэффициента ( $K_c$ ), для расчета которого применяется следующая формула:

$$K_c = \Delta Fe / Fe_1, \quad (2)$$

где  $K_c$  – коэффициент комплексообразования;

$$\Delta Fe = Fe_2 - Fe_1 - Fe_3;$$

$Fe_1$  и  $Fe_2$  – содержание растворенного железа в анализируемом растворе до и после взаимодействия с индикаторной пластиной соответственно;

$Fe_3$  – содержание железа в контрольном растворе после взаимодействия с индикаторной пластиной.

Содержание железа, в присутствии глутаминовой кислоты определяли по методике ОСТ 34-70-953.4-88 фотоколориметрическим методом.

Чем больше значение  $K_c$ , тем в большей степени глутаминовая кислота в определенной концентрации способна к образованию растворимых комплексных соединений железа (III) в водном растворе, тем выше прочность комплексов.