

ПОПЫТКА СОЗДАНИЯ УНИФИЦИРОВАННОГО МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЯДА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В ТРУПНОЙ КРОВИ С ВНУТРЕННИМ СТАНДАРТОМ НА ОСНОВЕ ЖЖЭ И ВЭЖХ-УФ

П.В.Никитин

ГБУЗ КО ОТ «Кемеровское областное клиническое
бюро судебно-медицинской экспертизы»

Москва, 2015

Этапы реализации поставленной задачи

- Выбор внутреннего стандарта (ВС)
- Выбор методики изолирования и очистки
- Матрица: выбор, проверка
- Проблемы стандартных растворов аналитов, построение градуировочных графиков
- Хроматографическое разделение и определение аналитов и ВС
- Валидация методики и вопросы ВЛК

Хроматографическое разделение и определение аналитов и ВС



Милихром А-02 (ЗАО «ЭкоНова»)

Колонка: 2x75 мм, ProntoSIL-120-5-C18 AQ

Элюент А: [4М LiClO₄ – 0,1М HClO₄]:H₂O (5:95)

Элюент В: ацетонитрил

Градиент: от 5% В до 100% В за 40 мин; 100% В 3 мин (от 5% В до 69% В за 27 мин; 100% В 3 мин)

Поток: 100 мкл/мин

Температура: 40 °С

Детектор: УФ-СФМ, 210 (опорная); 220; 230; 240; 250; 260; 280 и 300 нм

БД-2003-500

Выбор внутреннего стандарта

Метронидазол (трихопол)

- Формы выпуска: таблетки по 0,25 и 0,5 г; раствор для инъекций и для инфузий 0,5%
- Мало растворим в воде (1 часть в 100 частях)
- Экстрагируется этилацетатом при pH 3-13
- Объем удерживания (в «стандартных условиях») – 595 мкл
- Рабочий раствор: 250 мг (1 таблетка) в 50 мл 0,01 н HCl – 5 мг/мл («уточненная» концентрация – 4,46 мг/мл)

Рабочие стандартные растворы ЛС

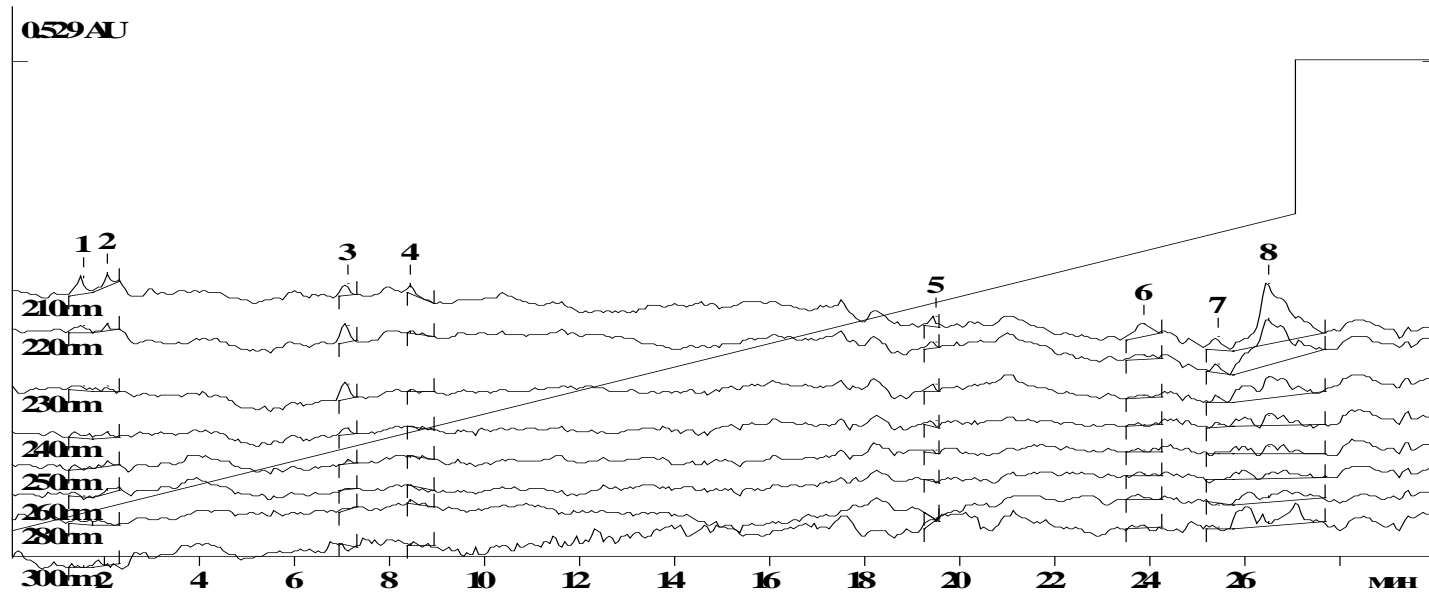
- Возможность приготовления РСР из доступных коммерческих форм ЛС (таблетки, растворы для инъекции, фармсубстанции)
- Выбор подходящего растворителя и концентрации РСР ЛС
- Обязательная проверка полученной концентрации РСР ЛС (ВЭЖХ – по БД-2003, УФ-СФМ – прямая, разностная)

Методика изолирования и очистки

- 3 мл крови + 50 мкл раствора ВС + 3 мл насыщенного водного раствора $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ + $\approx 0,5$ г безводного Na_2SO_4 + по 3 мл (дважды) смеси гексан-этилацетат-изопропанол (5:5:1). Взбалтывается, центрифугируется
- Извлечение фильтруется через небольшой слой безводного Na_2SO_4 , упаривается в токе теплого воздуха досуха
- Сухой остаток растворяется в 4 каплях гексана и 200 мкл 10% раствора АЦН в 0,01 н HCl. Взбалтывается, центрифугируется

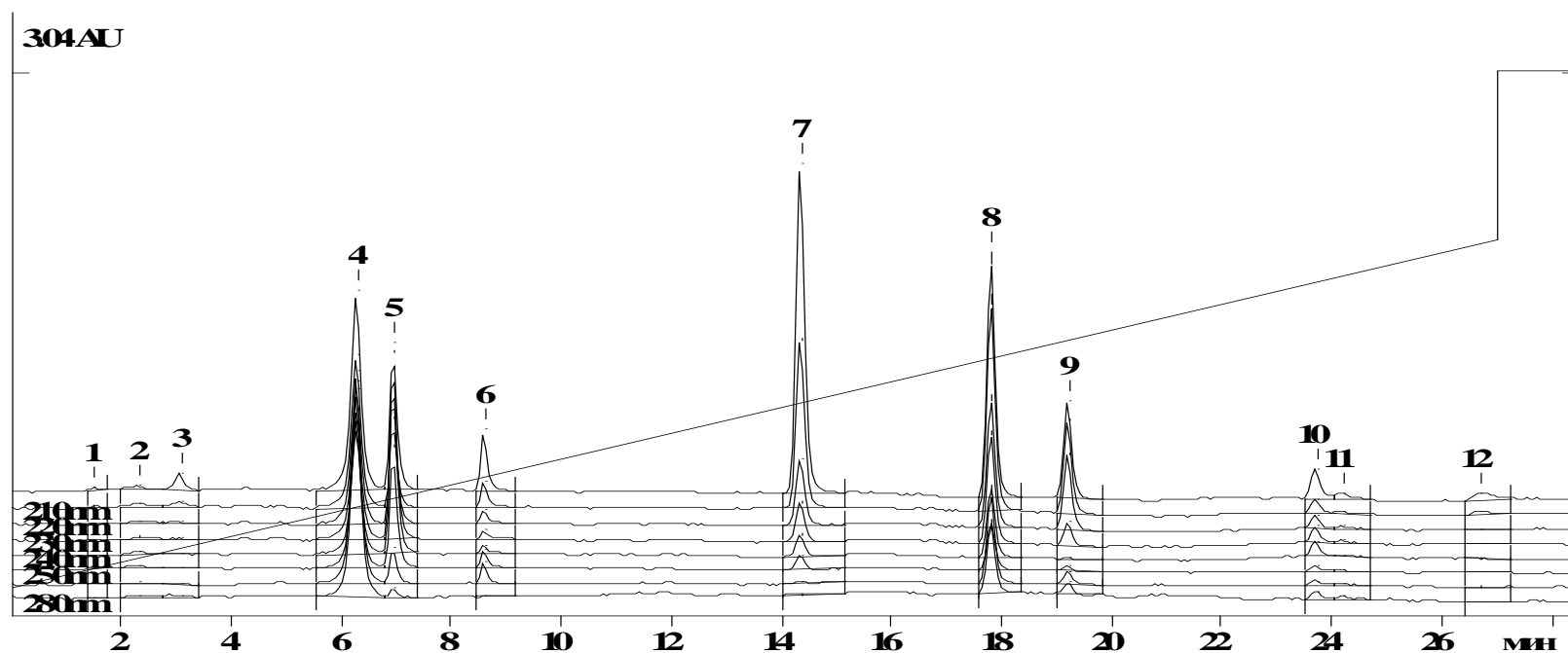
Матрица для построения градуировочных графиков

- Трупная кровь (без выраженных гнилостных изменений)
- Обязательная проверка на отсутствие определяемых компонентов в крови



Хроматограмма «пустой» крови

Градуировка



Одна из реальных градуировочных точек

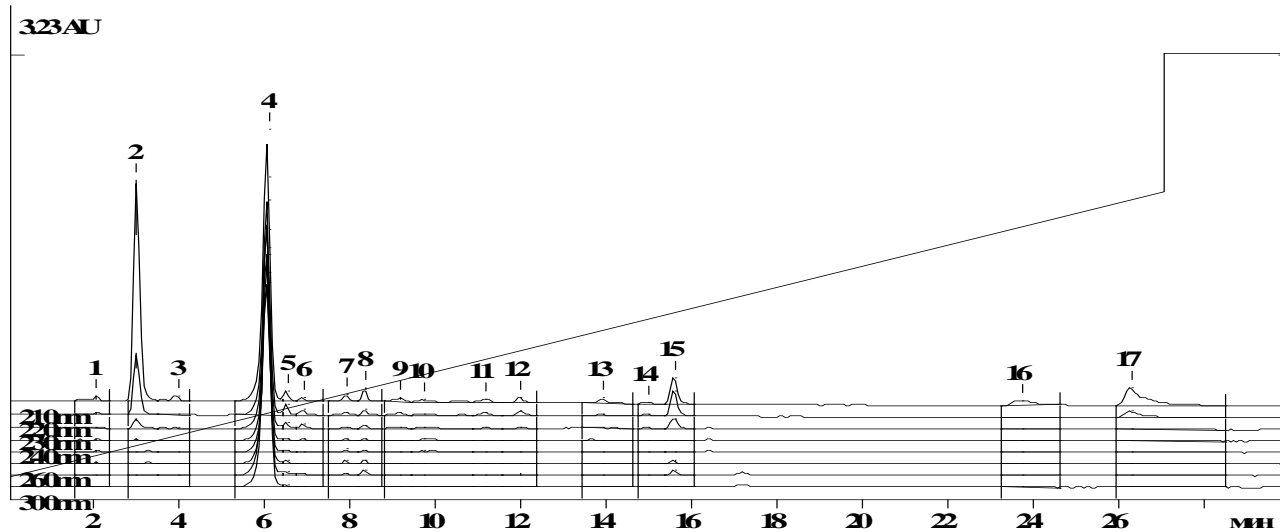
- Пик 4 – метронидазол (внутренний стандарт)
- Пик 5 – парацетамол 25 мкг/мл
- Пик 6 – кофеин 3,5 мкг/мл
- Пик 7 – фенобарбитал 50 мкг/мл
- Пик 8 – карбамазепин 12,5 мкг/мл
- Пик 9 – анаприлин 2,0 мкг/мл
- Пик 10 – дротаверин 1,35 мкг/мл

Градуировочные графики

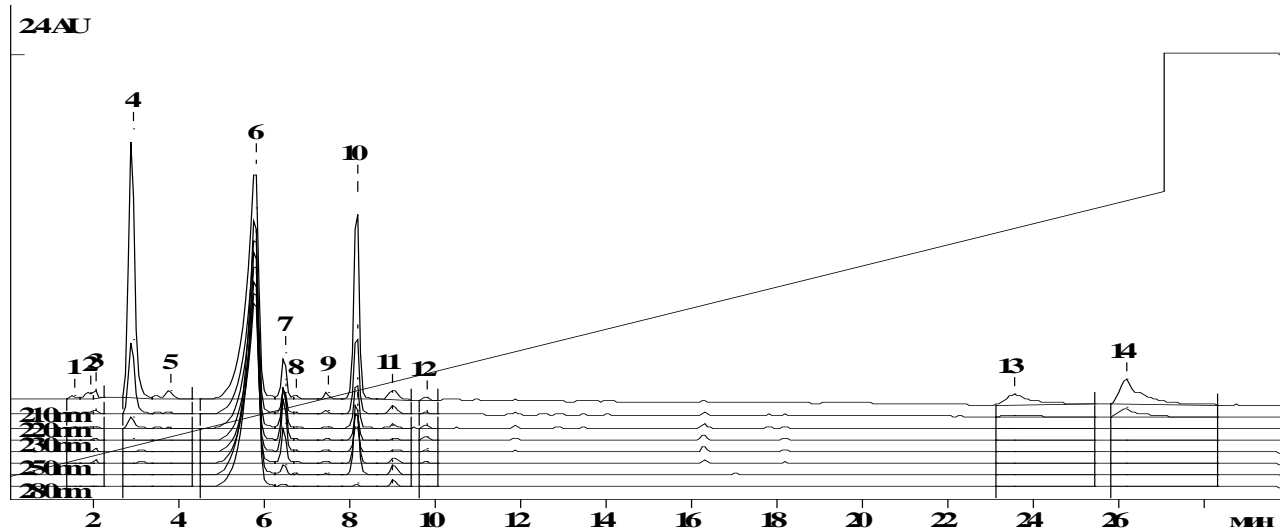
№ п/п	Определяемое вещество	Интервал конц-ий, мкг/мл	Интервал отношения площадей пиков	Расчетная формула (*)	R ²	Ср. выход, %
1.	Аминазин	0,5-5,0	0,067-0,514	$C \text{ (мкг/мл)} = 10,3 S_{\text{в-ва}} / S_{\text{ст}} - 0,16$	0,9817	55
2.	Амитриптилин	0,4-2,5	0,082-0,569	$C \text{ (мкг/мл)} = 4,48 S_{\text{в-ва}} / S_{\text{ст}} + 0,05$	0,9873	18
3.	Анаприлин	0,53-3,3	0,101-0,645	$C \text{ (мкг/мл)} = 5,04 S_{\text{в-ва}} / S_{\text{ст}} + 0,045$	0,9994	83
4.	Дибазол	1,6-12	0,254-1,832	$C \text{ (мкг/мл)} = 6,49 S_{\text{в-ва}} / S_{\text{ст}} - 0,10$	0,9957	18
5.	Димедрол	4-40	0,539-3,680	$C \text{ (мкг/мл)} = 11,3 S_{\text{в-ва}} / S_{\text{ст}} + 0,15$	0,9675	52
6.	Дипразин	0,8-5,0	0,074-0,457	$C \text{ (мкг/мл)} = 10,9 S_{\text{в-ва}} / S_{\text{ст}} + 0,05$	0,9988	24
7.	Дротаверин	0,72-4,5	0,043-0,342	$C \text{ (мкг/мл)} = 13,1 S_{\text{в-ва}} / S_{\text{ст}} + 0,014$	0,992	43
8.	Карбамазепин	6,7-42	0,458-2,625	$C \text{ (мкг/мл)} = 16,8 S_{\text{в-ва}} / S_{\text{ст}} - 2,7$	0,9946	24
9.	Кетамин	2-20	0,128-1,686	$C \text{ (мкг/мл)} = 11,2 S_{\text{в-ва}} / S_{\text{ст}} + 1,6$	0,9875	60
10.	Кордиамин	5-60	0,141-1,569	$C \text{ (мкг/мл)} = 37,7 S_{\text{в-ва}} / S_{\text{ст}} - 1,36$	0,9809	37
11.	Кофеин	3,5-25	0,189-1,375	$C \text{ (мкг/мл)} = 25,5 S_{\text{в-ва}} / S_{\text{ст}} - 1,66$	0,999	18
12.	Метоклопрамид <i>(в пересчете на М. гидрохлорид!)</i>	1,6-12	0,152-1,089	$C \text{ (мкг/мл)} = 11,4 S_{\text{в-ва}} / S_{\text{ст}} - 0,77$	0,9837	14
13.	Папаверин	1,0-6,0	0,090-0,569	$C \text{ (мкг/мл)} = 10,6 S_{\text{в-ва}} / S_{\text{ст}} + 0,18$	0,9891	17
14.	Парацетамол	13,3-83	0,213-1,595	$C \text{ (мкг/мл)} = 50,8 S_{\text{в-ва}} / S_{\text{ст}} + 1,1$	0,9976	15
15.	Пентоксифиллин	3,2-32	0,255-2,357	$C \text{ (мкг/мл)} = 13,8 S_{\text{в-ва}} / S_{\text{ст}} - 0,34$	0,9993	11
16.	Теofilлин	10-60	0,081-0,438	$C \text{ (мкг/мл)} = 145 S_{\text{в-ва}} / S_{\text{ст}} - 2,6$	0,9896	0,8
17.	Фенобарбитал	3,1-29	0,152-1,375	$C \text{ (мкг/мл)} = 21,8 S_{\text{в-ва}} / S_{\text{ст}} + 0,05$	0,9892	32
18.	Трамадол	0,62-6,15	0,0314-0,314	$C \text{ (мкг/мл)} = 20,3 S_{\text{в-ва}} / S_{\text{ст}} - 0,03$	0,996	92

(*) расчетные формулы приведены с учетом концентрации раствора метранидазола (4,46 мг/мл) и его добавляемого объема (50 мкл)

Хроматограммы экспертных случаев



- Пик 4 – метронидазол (внутренний стандарт)
- Пик 15 – трамадол 2,2 мкг/мл



- Пик 6 – метронидазол (внутренний стандарт)
- Пик 7 – парацетамол 5 мкг/мл
- Пик 10 – кофеин 8 мкг/мл

Схема дальнейшего пополнения базы градуировочных графиков

- Подбор наиболее «интересного» (\max терапевтический – \min токсический) уровня концентрации ЛС в крови, конкретной доступной коммерческой формы ЛС, растворителя, конкретной концентрации рабочего стандартного («затравочного») раствора
- Определение (подтверждение) полученной концентрации рабочего стандартного («затравочного») раствора независимым методом количественного определения
- Подтверждение «чистоты» матрицы для последующего построения градуировочного графика; затравка проб, изолирование, реконструкция, хроматографирование
- Расчет градуировочного графика; получение данных о выходе ЛС при изолировании и очистке; оформление результатов для архива отделения

Выводы

- Подобрано вещество для использования в качестве ВС, исходные коммерческие лекарственные формы его, растворитель и концентрация рабочего раствора ВС
- Показана возможность использования в качестве метода изолирования для определения методом ВЭЖХ имеющегося скринингового метода ЖЖЭ с бурой в качестве буфера и смесевым среднеполярным растворителем. Подобраны оптимальные объемы изолируемой крови и реконструирующего раствора.
- Показаны необходимость и возможности использования независимых методов количественного определения (ВЭЖХ-УФ, прямой и разностной УФ-СФМ) для подтверждения заявленной (ожидаемой) концентрации ЛС в рабочих стандартных («затравочных») растворах ЛС, приготовленных из имеющихся коммерческих форм.
- Построено 18 градуировочных графиков на разнообразные ЛС различных токсикологических групп; параллельно определен выход этих ЛС по предложенной схеме изолирования и очистки.
- Предложена унифицированная схема дальнейшего пополнения базы градуировочных графиков, используемых в отделении.
- Создано специализированное рабочее место, укомплектованное необходимым оборудованием, посудой, реактивами и документацией.

Задачи на будущее

- Полноценная (или частичная) валидация метода с определением необходимых метрологических характеристик и ограничений
- Создание механизма внутрилабораторного контроля качества
- Пополнение базы градуировочных графиков

БЛАГОДАРЮ ЗА ВНИМАНИЕ