

УДК 615.07:615.217:543.544.5.068.7:543.51

©Коллектив авторов

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БАКЛОФЕНА В КРОВИ МЕТОДОМ ВЭЖХ С МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

*О.А. Дукова^{1,2}, М.Ю. Котловский³, А.А. Покровский^{1,3}, Е.В. Суворова², Т.Г. Шиврина⁴,
Е.А. Краснов^{5*}, А.А. Ефремов¹*

¹Сибирский федеральный университет, Красноярск

²Красноярское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы, Красноярск

³Центральная научно-исследовательская лаборатория Красноярского государственного медицинского университета имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск

⁴Городская клиническая больница скорой медицинской помощи №6 имени Н.С. Карповича, Красноярск

⁵Сибирский государственный медицинский университет,
634050, г. Томск, Московский тракт, 2, стр. 7, блок А; эл. почта: krasnov.37@mail.ru

Разработана методика идентификации и количественного определения баклофена в крови при помощи ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием, которая отличается высокой чувствительностью, специфичностью, линейностью, правильностью, повторяемостью, низким пределом количественного определения. Методика применена для диагностики острого отравления баклофеном.

Ключевые слова: баклофен, отравления, диагностика, ВЭЖХ-МС/МС

DOI 10.18097/PBMC20166203325

ВВЕДЕНИЕ

Проблема отравлений лекарственными препаратами в Российской Федерации является весьма актуальной. Интоксикация связана, как правило, с их передозировкой либо с немедицинским применением. В настоящее время препарат баклофен активно используется в подростковой среде для достижения состояния одурманивания, а также в суицидальных целях.

В литературе описаны случаи острых отравлений от передозировки баклофена, уровень которого в сыворотке крови может достигать 1,1-3,5 мкг/мл (токсическая концентрация) [1, 2]. В результате передозировки баклофена может наступить летальный исход. В этом случае концентрация баклофена в сыворотке крови достигает 17 мкг/мл, а в моче – 760 мкг/мл [3, 4].

В 2010 г. в отделении острых отравлений городской клинической больницы скорой медицинской помощи №6 им. Н.С. Карповича Красноярска (ГК БСМП) зафиксировано 23 случая острых отравлений баклофеном, в 2011 г. – 16, а в 2012 г. – 15. Клиническая картина интоксикации баклофеном неспецифична, симптомы отравления могут быть схожи с таковыми при отравлении синтетическими наркотиками, алкоголем, антидепрессантами, барбитуратами и другими веществами, действующими на центральную нервную систему. В связи с этим, для подтверждения диагноза отравления баклофеном и последующего правильного лечения необходимо иметь надёжные, достоверные и чувствительные методики его качественного и количественного определения в биологических жидкостях. Для токсикологической оценки большое значение имеет определение

концентрации баклофена именно в крови. Учитывая низкие концентрации баклофена в крови, чувствительности метода ВЭЖХ/УФ не достаточно для её определения, поэтому был использован метод ВЭЖХ с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС), отличающийся высокой чувствительностью и возможностью с высокой селективностью определять нужный ион в области пг в режиме мониторинга заданного иона [5].

МЕТОДИКА

Образцы крови получены от пациентов, поступивших в отделение острых отравлений ГК БСМП в течение 2013 г. с подозрением на отравление баклофеном. Поскольку состояние пациентов не позволяло выразить своё согласие и в большинстве случаев угрожало их жизни, решение о проведении лечения и взятии крови и мочи для проведения диагностики принимал консилиум врачей-токсикологов в соответствии с п.п. 9.1, 10.1 ст. 20 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ.

Пробоподготовку образцов крови проводили следующим образом. К 1 мл крови прибавляли 50 мкл водного раствора внутреннего стандарта **фенибута** (концентрация 1 мкг/мл, РУП “Белмедпрепараты”). Фенибут был выбран в качестве внутреннего стандарта ввиду сходства его химической структуры с баклофеном, который отличается от фенибута наличием атома хлора. В связи с чем можно предположить, что показатели извлечения из биологических объектов и удерживания на хроматографической колонке для баклофена и фенибута будут схожи. После добавления 0,1-0,15 мл 50% раствора трихлоруксусной кислоты, пробы выдерживали на шейкере S-3.02M (Латвия) 15 мин,

* - адресат для переписки

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БАКЛОФЕНА В КРОВИ МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС

затем центрифугировали в течение 15 мин при скорости 4000 об/мин на центрифуге типа ОПн-8 (Россия). После этого 20 мкл полученного надосадочного слоя переносили в виалу и добавляли 980 мкл дистиллированной воды.

Для построения градуировочного графика использовали трупную кровь, предварительно проверенную на отсутствие лекарственных веществ. Пробоподготовку образцов крови для построения градуировочного графика осуществляли следующим образом: по 1 мл крови помещали в стеклянные флаконы объёмом 15 мл, прибавляли по 5 мкл, 10 мкл, 25 мкл, 50 мкл, 75 мкл, 100 мкл водного раствора баклофена (“Sigma”, США) с концентрацией 10 мкг/мл, перемешивали и далее проводили пробоподготовку аналогично исследуемым образцам. Для получения более высоких концентраций баклофена в крови (1500 нг/мл, 2000 нг/мл, 2500 нг/мл, 3000 нг/мл и 4000 нг/мл) использовали водный раствор баклофена с концентрацией 100 мкг/мл.

Концентрацию баклофена в крови определяли с помощью высокоэффективного жидкостного хроматографа UltiMate 3000 (“Dionex”, Германия), в качестве детектора использовали тандемный масс-спектрометр с ионной ловушкой QTRAP 5500 (“AB SCIEX”, Канада). Условия хроматографирования: колонка Zorbax Eclipse XDB-C18 (5 мкм, 150×4,6 мм), температура термостата колонки 37°C, подвижная фаза ацетонитрил – метанол – 0,65 М водный раствор ацетата аммония (15:15:70), изократический режим, скорость потока элюента 1 мл/мин. Объём вводимой пробы 20 мкл. После каждого анализа колонку промывали чистым ацетонитрилом в течение 5 мин. Масс-спектрометрическое определение баклофена проводили в режиме регистрации положительных ионов при ионизации электроспреем. Условия работы источника ионов: температура источника ионов 500°C, напряжение на капилляре (IS) – 5,5 кВ, давление газа-небулайзера (Gas 1) – 50 psi, давление осушающего газа (Gas 2) – 50 psi, давление газа-завесы (CUR) – 25 psi. Программа обработки данных Analyst 1.5.2 (“AB SCIEX”), с помощью которой были подобраны параметры MRM переходов (табл. 1). Масс-спектры фрагментов родительских ионов баклофена и внутреннего стандарта фенибуты приведены на рисунке 1.

Таблица 1. Параметры MRM переходов баклофена и фенибуты

Вещество	MRM переход	DP, В	CE, эВ	СХР, В
баклофен	214 → 151	60	25	12
	214 → 179	60	28	12
	214 → 197	60	14	12
фенибут (внутренний стандарт)	180 → 163	60	13	13
	180 → 145	60	17	13
	180 → 117	60	27	13

Примечание: MRM - мониторинг множественных реакций (multiple reaction monitoring mode), DP - потенциал декластеризации (declustering potential), CE - энергия соударений (collision energy), СХР - напряжение на выходе ячейки соударений (collision cell exit potential).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификацию пика баклофена проводили по времени удерживания заданных пар ионов (родительский ион – дочерний ион). Время удерживания баклофена составило 3,51 мин, внутреннего стандарта фенибуты – 2,91 мин (рис. 2А).

Специфичность методики подтверждали, исследуя образцы крови, содержащей и не содержащей баклофен (рис. 2). Хроматограмма образца крови, не содержащей баклофен, приведена на рисунке 2Б. Из рисунков видно, что методика отличается высокой специфичностью, что подтверждается отсутствием пиков эндогенных соединений в месте элюирования баклофена.

Линейность градуировочного графика для определения баклофена в крови доказана в диапазоне концентраций от 50 нг/мл до 4000 нг/мл (рис. 3). Уравнение зависимости аналитического сигнала от концентрации баклофена в крови имеет вид $y = 0,0232x + 0,0931$, коэффициент корреляции 0,9997.

Предел обнаружения баклофена в крови, составивший 5 нг/мл, рассчитывали как наименьшую концентрацию баклофена, при которой отношение сигнал – шум составляло 10:1.

Оценку правильности и повторяемости методики проводили методом “введено-найдено” по одиннадцати концентрационным уровням (от 50 нг/мл до 4000 нг/мл) градуировочного графика в трёх параллельных измерениях (табл. 2). Согласно представленным данным, отклонение от истинного значения находится в пределах до 5%.

Таким образом, разработанная методика количественного определения баклофена в крови характеризуется специфичностью, линейностью, правильностью, повторяемостью, низким пределом количественного определения и небольшим временем проведения анализа.

С использованием разработанной методики проведено исследование образцов крови, полученных от лиц, поступивших в отделение острых отравлений городской клинической больницы скорой медицинской помощи №6 им. Н.С. Карповича в период с 1.01.2013 по 31.12.2013 г. Результаты исследования приведены в таблице 3.

Как видно из таблицы 3, за 2013 г. в отделении острых отравлений ГК БСМП зафиксировано 19 случаев отравления баклофеном, что подтверждено результатами химико-токсикологического исследования крови пациентов. Концентрация баклофена в крови пациентов варьировала в диапазоне от 32 до 2530 нг/мл. В образцах 4 и 8 концентрация баклофена соответствовала токсической.

Таким образом, для уточнения и подтверждения диагноза отравления баклофеном необходим экспрессный химико-токсикологический анализ, что позволит определить тактику ведения пациентов, повысить качество лечения, а, следовательно, и прогноз на выздоровление.

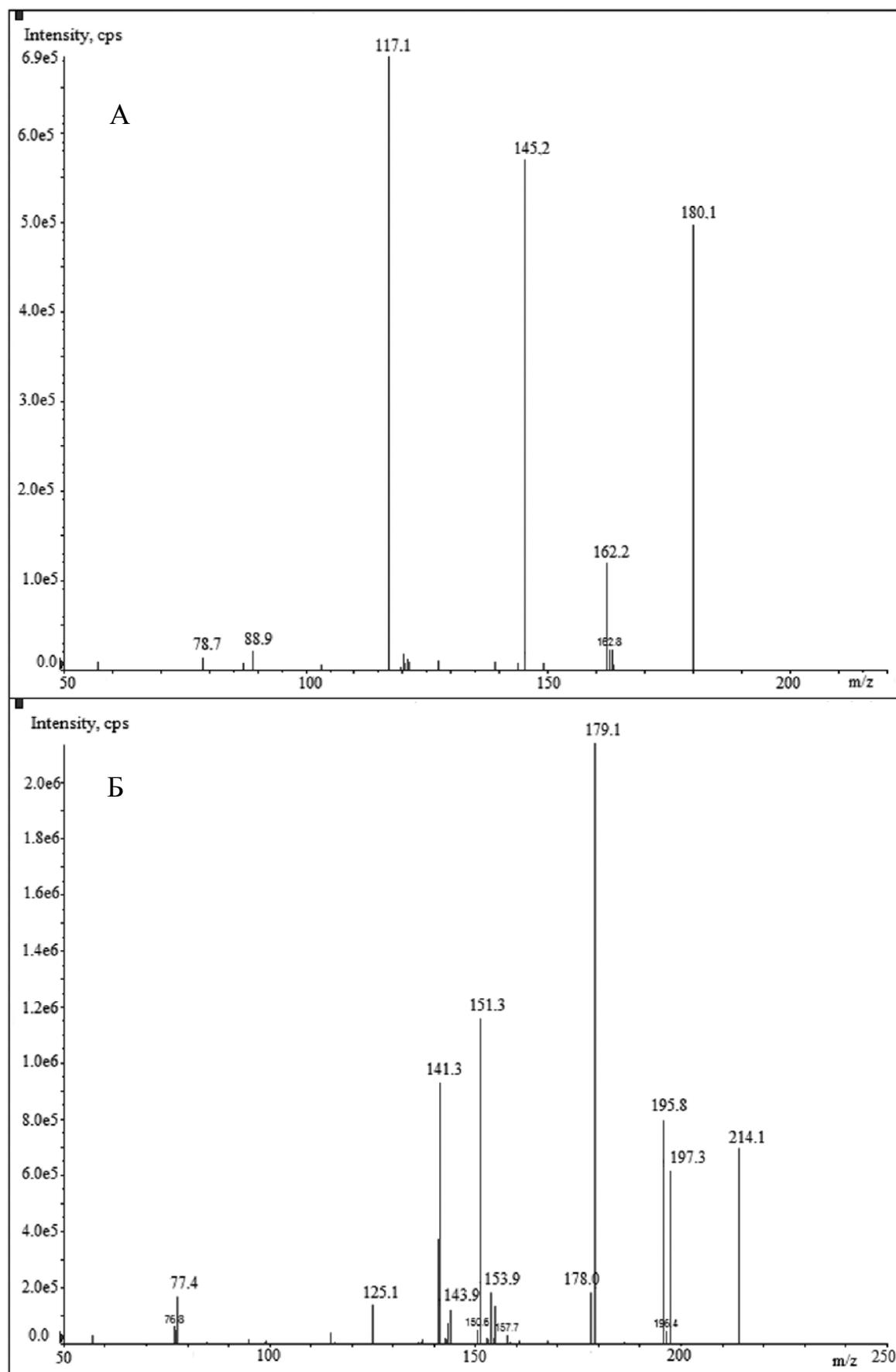


Рисунок 1. Масс-спектры фрагментов родительских ионов МС² внутреннего стандарта фенибута (А) и баклофена (Б).

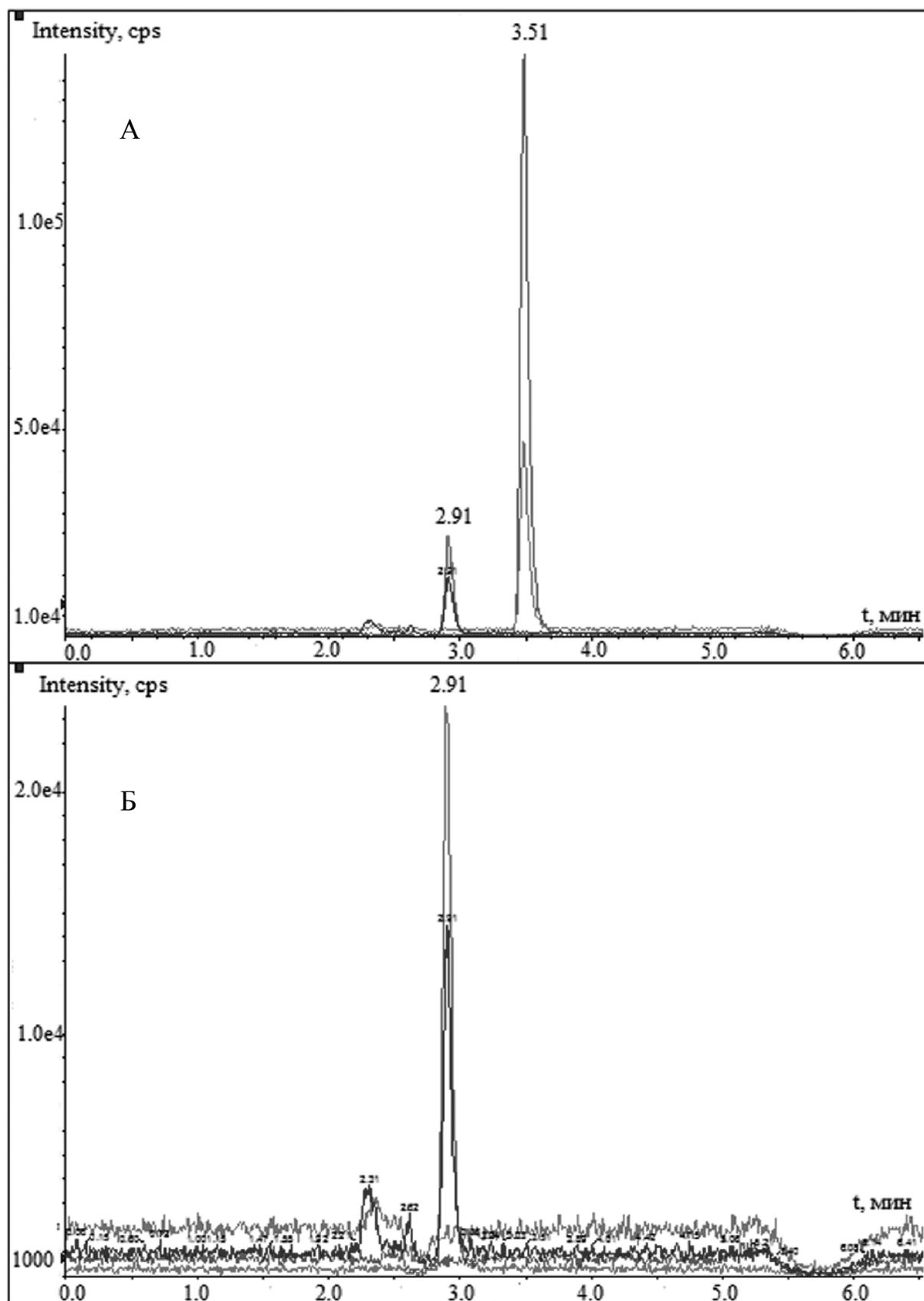


Рисунок 2. MRM хроматограммы образцов крови с добавлением баклофена, концентрация баклофена 250 нг/мл (А), и крови, не содержащей баклофен (холостой образец) (Б).

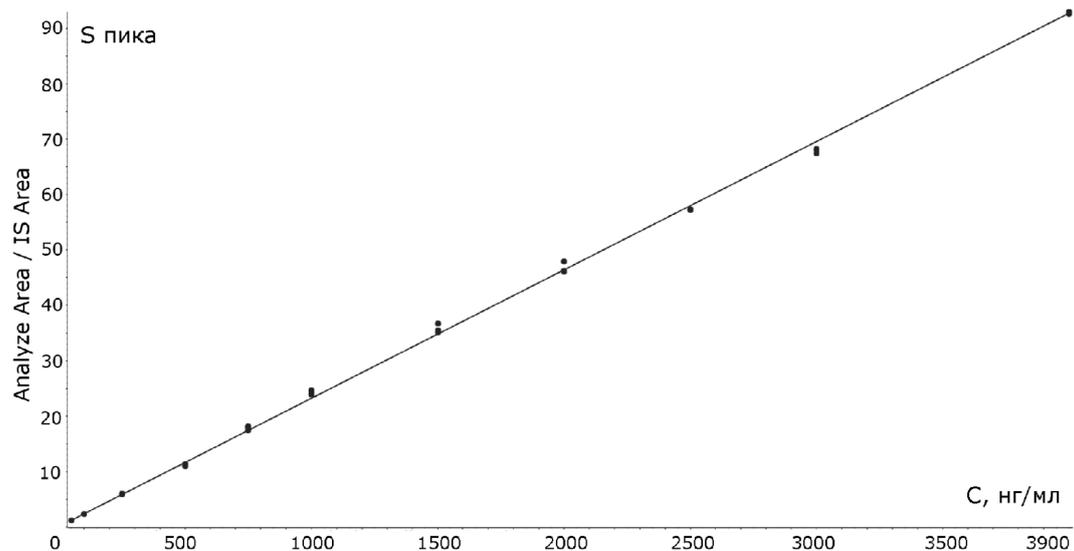


Рисунок 3. Градуировочный график для определения баклофена в крови.

Таблица 2. Оценка правильности и повторяемости методики количественного определения баклофена в крови

Введено, нг/мл	Найдено, нг/мл	X	S	Sr, %	ΔX	Отклонение от истинного, %
50	48,7 48,3 48,4	48,5	0,2	0,4	0,5	3,1
100	99,4 99,5 99,1	99,3	0,2	0,2	0,5	0,7
250	250,1 249,2 251,0	250,1	0,9	0,4	2,2	0,04
500	470 488 471	476	10	2,1	25	4,8
750	773 781 762	772	10	1,2	24	2,9
1000	1040 1060 1030	1044	15	1,4	38	4,4
1500	1530 1520 1580	1543	32	2,1	80	2,9
2000	1990 1993 2048	2010	32	1,6	81	0,5
2500	2470 2450 2486	2469	18	0,7	45	1,24
3000	2940 2910 2930	2927	15	0,5	38	2,4
4000	3990 4010 4015	4005	13	0,3	32	0,125

Таблица 3. Результаты исследования образцов крови лиц с подозрением на отравление баклофеном

№ образца	Дата поступления	Концентрация баклофена в крови, нг/мл
1	2.11.13	77,6
2	2.12.13	48,4
3	2.24.13	112
4	3.17.13	1120
5	3.23.13	32
6	3.29.13	112
7	3.29.13	81,6
8	4.10.13	2530
9	5.14.13	150
10	6.21.13	824
11	7.19.13	613
12	8.29.13	596
14	9.17.13	373
15	11.20.13	762
16	11.20.13	601
17	11.25.13	748
18	11.24.13	234
19	12.25.13	667

ЛИТЕРАТУРА

1. Haubenstock A., Hruby K., Jager U., Lenz K. (1983) J. Toxicol., **20**, 59-68.
2. Fraser A.D., MacNeil W., Isner A.F. (1991) J. For. Sci., **36**, 1596-1602.
3. De Giovanni N., d'Aloja E. (2001) For. Science Int., **1263**, 26-32.
4. Moffat A.C., Osselton M.D., Widdop B. (eds.) (2011) Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, 4th Edn., Pharmac. Press, London, 2480 p.
5. Бёккер Ю. (2009) Хроматография. Инструментальная аналитика: методы хроматографии и капиллярного электрофореза. Техносфера, М., 472 с.

Поступила: 26. 09. 2014.
Принята к печати: 05. 02. 2016.

IDENTIFICATION AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF BACLOFEN IN HUMAN BLOOD
BY HPLC WITH MASS SPECTROMETRY DETECTION

O.A. Dukova^{1,2}, M.Yu. Kotlovsky³, A.A. Pokrovsky^{1,3}, E.V. Suvorova², T.G. Shivrina⁴, E.A. Krasnov⁵, A.A. Efremov¹

¹Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia

²Krasnoyarsk Regional Bureau of Forensic Medical Expertise, Krasnoyarsk, Russia

³Central Research Laboratory Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk Medical University, Krasnoyarsk, Russia

⁴Karpovich Municipal Clinical Emergency Hospital № 6., Krasnoyarsk, Russia

⁵Siberian Medical University, 2, bld. 7, block A, Moscow tract, Tomsk, 634050 Russia;
tel.: (8-3822)42-64-41; e-mail:krasnov.37@mail.ru

A method of identification and quantitative determination of baclofen in blood by HPLC with mass spectrometry detection has been developed. It is characterized by high sensitivity, specificity, linearity, accuracy, reproducibility, and a low detection for quantitative determination. The method has been used for diagnostics of acute baclofen poisoning in patients.

Key words: baclofen, poisoning, diagnostics, HPLC-MS/MS