

УДК 616-07:519.248
©Коллектив авторов

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕНОБАРБИТАЛА В МОЧЕ И СЫВОРОТКЕ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ПРОТОЧНО-ИНЖЕКЦИОННОЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

*К. Ли, Л.Ц. Нью, К.Л. Хэ, К.Х. Сонг**

Лаборатория синтетической и природной функциональной молекулярной химии
Министерства Образования, Лаборатория физико-неорганической химии Шэньси,
Северо-западный Университет, Сиань, 710069 Китай; факс: +86-29-88303798;
эл. почта: songzhenghua@hotmail.com

Предложен чувствительный хемилюминесцентный метод определения фенобарбитала основанный на потенцирующем действии этого вещества на реакцию хемилюминесценции между люминолом и растворённым кислородом в проточно-инжекционной системе. Интенсивность хемилюминесценции в зависимости от концентрации фенобарбитала линейно изменялась от 0,05 до 10 нг·мл⁻¹ с пределом измерения равным 0,02 нг·мл⁻¹ (3σ). При скорости потока в 2 мл·мин⁻¹, полное определение фенобарбитала, включая отбор проб и промывку, может быть выполнено за 0,5 мин, достигая таким образом эффективности анализа проб в 120 ч⁻¹. Метод был успешно апробирован для анализа фенобарбитала в фармацевтических препаратах, а также в человеческих моче и сыворотке без предварительной подготовки с выходом 95,7-106,7% и RSD менее 3%.

Ключевые слова: фенобарбитал, хемилюминесценция, люминол.

ВВЕДЕНИЕ. Фенобарбитал (ФБ) (5-этил-5-фенил-2,4,6-(1Н,3Н,5Н)-пиримидинтрион, схема) – барбитурат, используемый в качестве седативного и противосудорожного средства. Почти 100 лет ФБ хорошо и широко известен как эффективное и недорогое противоэпилептическое средство (ПЭС) [1]. ФБ был синтезирован в 1911 г известным немецким химиком Эмилем Фишером под названием Люминал [2]. С тех пор, несмотря на появление новых поколений ПЭС, ФБ сохраняет позиции в терапевтическом арсенале, и по сей день является самым прописываемым средством от эпилепсии во всём мире. Он рекомендован Всемирной Организацией Здравоохранения (ВОЗ) как основной ПЭС при местных и общих тоническо-клонических судорогах для применения в развивающихся странах [3]. ФБ обладает длительным периодом полураспада, благодаря которому содержание препарата в крови в течение дня остаётся относительно стабильным, даже в случае приёма лишь одной суточной дозы (обычно перед сном). Его противоэпилептический эффект основан на стабилизации электрической активности мозга; также он может применяться для терапии клонических судорог. ФБ, одно из старейших лекарственных средств, по-прежнему остаётся одним из важнейших противоэпилептических средств, благодаря многим достоинствам, включающим его большие запасы, низкую цену, эффективность, широкий спектр действия и простоту в использовании.

* - адресат для переписки

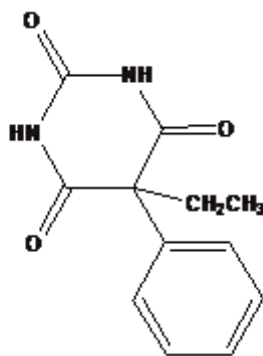


Схема.

Структурная формула фенобарбитала.

Для определения ФБ существует несколько методов, среди которых: капиллярный электрофорез (КЭ) [5, 6], высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [7, 8], эксклюзионная хроматография (ЭХ) [9], газовая хроматомасс-спектрометрия (ГХМС) [10, 11], а также хемотрический метод [12, 13].

Хемилюминесценция (ХЛ) привлекает повышенное внимание в различных областях исследований [14]. По сравнению с вышеупомянутыми методами, ХЛ метод, совмещённый с проточной инъекцией (ПИ), является более привлекательным для фармакологического анализа [15, 16], благодаря его превосходству по многим показателям, включающим: высокую чувствительность, широкий линейный динамический диапазон, а также быстроту измерений и то, что оборудование для ХЛПИ имеет невысокую цену и простое в использовании. В наших предыдущих работах мы уже сообщали о люминол-миоглобиновой и люминол-гидропероксидной ХЛПИ системах для определения клиндамицина [17] и рокситромицина [18] соответственно. Так как нами не обнаружено публикаций о применении ХЛ метода для анализа ФБ, в данной статье предлагается простой, быстрый, точный и надёжный ХЛПИ метод для определения ФБ. Кроме того, предложенная методика является наиболее чувствительной из известных в настоящее время. В настоящей работе рассматривается способность ФБ резко усиливать ХЛ системы люминола и растворённого кислорода, интенсивность хемилюминесценции в зависимости от концентрации фенобарбитала линейно изменялась в пределах от 0,05 до 10 нг·мл⁻¹ с пределом измерения равным 0,02 нг·мл⁻¹ (3σ). К тому же, при скорости потока в 2 мл·мин⁻¹, полное определение фенобарбитала, включая отбор проб и промывку, может быть выполнено за 0,5 мин. Данный метод, который уже был успешно опробован для определения ФБ в образцах сыворотки и мочи человека, обладает заметными преимуществами, включающими несложность требуемого оборудования, пониженное использование реагентов, повышенную чувствительность, аналитическую эффективность и простоту самой процедуры исследования.

МЕТОДИКА.

Реагенты. В работе использовали реагенты квалификации чда; воду очищали при помощи прибора Milli-Q ("Millipore", США). Люминол ("Fluka", "Biochemika") был получен из Пункта Медицинских Закупок и Снабжения г. Сиань (Китай). Все образцы и раствор сравнения ФБ (0,1124 мг·мл⁻¹) подготавливались и хранились в мерной колбе при 4°C. Растворы рабочей концентрации готовили по мере необходимости. Люминол (2,5×10⁻² моль·л⁻¹) готовили путём растворения 4,4 г люминола в 1 л 0,1 М NaOH.

Прибор. Используемая в данной работе проточно-инжекционная система (Model IFFL-DD, Xi'an Remax Electronic Science-Tech Co. Ltd., Китай) схематически представлена на рисунке 1. Она объединяет в себе систему отбора проб, фотоумножитель (ФМТ), люминометр и записывающее устройство.

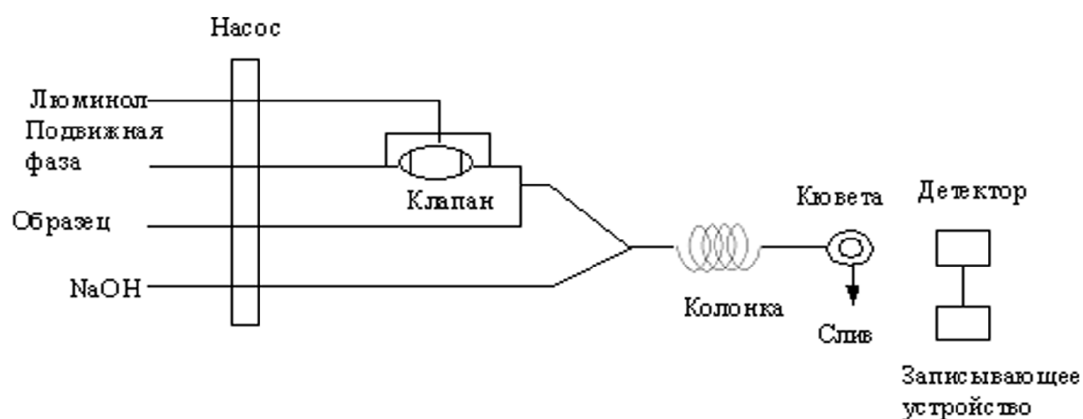


Рисунок 1.

Схематическая диаграмма проточно-инжекционной ХЛ для определения фенобарбитала.

Методика. Подвижную фазу с растворами (NaOH, люминол и исследуемый раствор) с постоянной скоростью пропускали через колонки. До появления четкой линии старта 100 мкл люминола количественно вводили в поток подвижной фазы с помощью шестиседельного клапана и смешивали с потоком растворенного ФБ. Полученную смесь затем выпускали в кювету с щелочной средой для возникновения ХЛ, которую измеряли с помощью ФМТ и люминометра. Концентрация ФБ может быть количественно определена путём измерения возрастания интенсивности ХЛ по формуле: $\Delta I = I_s - I_o$, где I_s и I_o – интенсивность ХЛ в присутствии и отсутствии ФБ соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Временная зависимость реакции ХЛ. До проведения непосредственно эксперимента на данном устройстве были проведены исследования кинетической кривой ХЛ системы люминол-кислород-ФБ. Как видно из рисунка 2, интенсивность ХЛ достигает максимума через 2 с после смешивания реагентов и исчезает через 18 с соответственно. Также показано, что присутствие ФБ достоверно усиливает ХЛ и эффект зависит от концентрации ФБ.

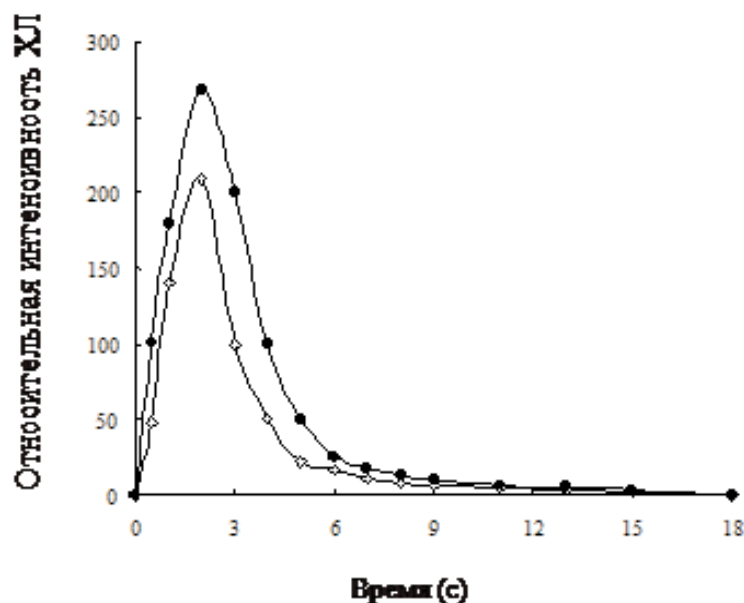


Рисунок 2.

Диаграмма "интенсивность-время" хемилюминесценции.

◇ Интенсивность ХЛ в отсутствие фенобарбитала;

● Интенсивность ХЛ в присутствии 5 нг·мл⁻¹ фенобарбитала.

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕНОБАРБИТАЛА

Зависимость от концентрации люминола. Влияние люминола на данную реакцию было изучено в диапазоне концентраций от $1,0 \times 10^{-7}$ до $1,0 \times 10^{-4}$ моль·л⁻¹. Обнаружено, что интенсивность ХЛ круто возрастала при концентрациях люминола до $2,5 \times 10^{-5}$ моль·л⁻¹, после чего несколько снижалась. Исходя из этого, для анализа была выбрана концентрация люминола 5×10^{-5} моль·л⁻¹.

Зависимость от концентрации гидроксида натрия. Поскольку реакция ХЛ люминола протекает более благоприятно в щелочной среде, для повышения чувствительности системы в ХЛ кювету при помощи колонки добавляли гидроксид натрия, влияние которого на данную реакцию было изучено в диапазоне концентраций от 5×10^{-3} до 0,25 моль·л⁻¹. Интенсивность ХЛ (ΔI) в зависимости от концентрации гидроксида натрия достигала максимума при концентрации 0,025 моль·л⁻¹; данная концентрация и использовалась в дальнейших экспериментах.

Зависимость от длины колонки и скорости потока. Для изучения влияния длины колонки на интенсивность ХЛ были испытаны колонки различных длин (0,5, 1, 2, 5, 10 см). Оптимальной длиной, согласно полученным результатам, является 2 см. Влияние скорости потока на определение изучали, сравнивая уровень отношения сигнал-шум. При скорости потока 2 мл·мин⁻¹ было обнаружено наивысшее отношение уровня сигнал-шум, поэтому для повышения аналитической точности данная скорость и использовалась в дальнейших исследованиях.

Использование предложенного метода для определения ФБ. В серии опытов с растворами сравнения при оптимальных условиях была установлена линейность результатов анализов. Было установлено что возрастание интенсивности ХЛ было пропорционально концентрации ФБ, калибровочная кривая линейно возрастала при концентрациях от 0,05 до 10 нг·мл⁻¹, с пределом измерения равным 0,02 нг·мл⁻¹; уравнение регрессии $\Delta I = 6,363C + 28,058$, $\gamma = 0,9961$. RSDs определения были менее 3% от различных исходных концентраций ФБ соответственно. При скорости потока в 2 мл·мин⁻¹, полное определение фенобарбитала может быть выполнено за 0,5 минуты.

Изучение влияния примесей. В целях оптимизации условий опыта, изучали влияние примесей, которые добавляли к раствору сравнения ФБ (1 нг·мл⁻¹). Для каждой исследуемой примеси проводили серию опытов с возрастающей концентрацией. Приемлемые отношения чужеродных веществ к 1 нг·мл⁻¹ раствору ФБ с достоверным влиянием на уровне 5% приведены в таблице 1.

Таблица 1. Концентрации некоторых примесей, приемлемые для обнаружения 1 нг·мл⁻¹ ФБ (ошибка <5%).

Примеси	Приемлемая концентрация (нг·мл ⁻¹)
Метанол, этанол	>3000
NH_4^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Cr^{3+}	500
NO_3^- , Ac^- , I^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , $\text{C}_2\text{O}_7^{2-}$, борат, оксалат, моча	100
Cu^{2+} , Fe^{3+} , мочевая кислота	5

Определение ФБ, содержащегося в сыворотке и моче человека. Предложенный метод был применён для определения ФБ, содержащегося в образцах сыворотки и мочи человека ($n_c = 5$, $n_m = 5$). ФБ определяли методом нормированного прибавления. Полученные результаты для образцов мочи, с выходом от 97,7% до 103,9%, приведены в таблице 2; результаты для образцов сыворотки, с выходом от 95,7% до 106,7%, приведены в таблице 3.

Таблица 2. Результаты анализа ФБ в образцах мочи человека (n=5).

№ образца	Добавленный ФБ, нг·мл ⁻¹	Обнаруженный ФБ, нг·мл ⁻¹	RSD, %	Выход, %	Содержание ФБ нг·мл ⁻¹	
					Предложенный метод	Контроль
1	0,00	3,00	2,80	98,9	0,392	0,400
	1,96	4,92	1,13			
2	0,00	5,00	1,77	97,7	0,424	0,400
	2,12	7,00	1,15			
3	0,00	7,00	0,34	99,0	0,408	0,400
	2,04	8,97	0,57			
4	0,00	3,00	0,41	101,3	0,580	0,600
	2,90	5,94	0,79			
5	0,00	5,00	0,91	103,9	0,612	0,600
	3,06	8,25	0,45			

Таблица 3. Результаты анализа ФБ в образцах сыворотки человека (n=5).

№ образца	Добавленный ФБ, нг·мл ⁻¹	Обнаруженный ФБ, нг·мл ⁻¹	RSD, %	Выход, %	Содержание ФБ нг·мл ⁻¹	
					Предложенный метод	Контроль
1	0,00	3,00	1,86	98,7	1,055	1,000
	2,11	5,07	0,76			
2	0,00	5,00	0,88	98,1	1,060	1,000
	2,03	6,93	0,74			
3	0,00	2,00	1,05	95,7	1,470	1,500
	2,94	4,85	0,64			
4	0,00	3,00	0,29	106,7	1,465	1,500
	2,93	6,13	0,91			
5	0,00	5,00	1,03	100,0	1,450	1,500
	2,90	7,90	0,40			

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕНОБАРБИТАЛА

Сравнительная характеристика предложенного метода для анализа ФБ с ранее известными методами представлена в таблице 4. Подытоживая полученные результаты отметим, что данный метод обладает заметными преимуществами, включающими несложность требуемого оборудования, пониженное использование реагентов, повышенную чувствительность, аналитическую эффективность и простоту самой процедуры исследования.

Таблица 4. Сравнительная характеристика известных методов (мкг·мл⁻¹).

Метод	Диапазон концентраций	Предел определения	Источник
капиллярный электрофорез (КЭ)	2,0-250,0	0,26	[6]
высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)	0-50,4	0,017	[7]
	5,0-50,0	0,3	[8]
эксклюзионная хроматография (ЭХ)	5,0-80,0	-	[9]
газовая хроматомасс-спектрометрия (ГХМС)	0,4-8,0	0,1	[10]
хеометрический метод	2,0-20,0	0,93	[13]
предложенный хемилюминесцентный метод	5,0×10 ⁻⁵ -0,01	2,0×10 ⁻⁵	-

Авторы выражают благодарность Фонду Естественных Наук провинции Шэньси и Министерству Образования КНР за финансовую поддержку, гранты №2006B05 и №07JK395.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brodie M.J., Kwan P. (2004) *Epilepsy Behav.*, **5**, 802-803.
2. Mizio G.Di., Gambardella A., Labate A., Perna A., Ricci P., Quattrone A. (2007) *Seizure*, **16**, 653-656.
3. Hauptmann A. (1912) *Munch. Med. Wochenschr.*, **59**, 1907-1909.
4. Tonekaboni S.H., Beyraghi N., Tahbaz H.S., Bahreynian S.A., Aghamohammadpoor M. (2006) *Epilepsy Behav.*, **8**, 145-148.
5. Haque A., Xu X.H., James T.S. (1999) *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **21**, 1063-1067.
6. Wang Q.L., Fan L.Y., Zhang W., Cao C.X. (2006) *Anal. Chim. Acta*, **580**, 200-205.
7. Vermeij T.A.C., Edelbroek P.M. (2007) *J. Chromatogr. B*, **857**, 40-46.
8. Moriyama M., Yamashita S., Domoto H., Furuno K., Araki H., Gomita Y. (1999) *J. Chromatogr. B*, **723**, 301-305.
9. Bereczki A., Horváth V., Horvai G. (2000) *J. Chromatogr. B*, **749**, 215-223.
10. Saka K., Uemura K., Kaori S., Yoshida K. (2008) *J. Chromatogr. B*, **869**, 9-15.
11. Zhao H.X., Wang L.P., Qiu Y.M., Zhou Z.Q., Li X., Zhong W.K. (2006) *J. Chromatogr. B*, **840**, 139-145.
12. Boeris M.S., Luco J.M., Olsina R.A. (2000) *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **24**, 259-271.

13. Ni Y.N., Liu C., Serge K.K. (2000) *Anal. Chim. Acta*, **419**, 185-196.
14. Fletcher K.A., Fakayode S.O., Lowry M., Tucker S.A., Neal S.L., Kimaru I.W., McCarrol M.E., Patonay G., Oldham P.B., Rusin O., Strongin R.M., Warner I.M. (2006) *Anal. Chem.*, **78**, 4047-4068.
15. Li Y.H., Niu W.F., Lu J.R. (2007) *Talanta*, **71**, 1124-1129.
16. Song Z.H., Hou S. (2003) *Anal. Chim. Acta*, **488**, 71-79.
17. Shao X.D., Xie X.F., Liu Y.H., Song Z.H. (2006) *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **41**, 667-670.
18. Song Z.H., Liu Y.H., Xie X.F. (2006) *Curr. Drug Meta.*, **7**, 389-395.

Поступила: 26. 11. 2008.

DETERMINATION OF PHENOBARBITAL IN HUMAN URINE AND SERUM USING FLOW INJECTION CHEMILUMINESCENCE

X. Li, L.C. Niu, X.L. He, Z.H. Song

Key Laboratory of Synthetic and Natural Functional Molecule Chemistry of Ministry of Education,
Department of Chemistry, Shaanxi Key Laboratory of Physico-Inorganic Chemistry,
Northwest University, 710069 Xi'an, China; fax: +86-29-88303798; e-mail:songzhenghua@hotmail.com

A sensitive chemiluminescence method, based on the enhance effect of phenobarbital on the chemiluminescence reaction between luminol and dissolved oxygen in a flow injection system, was proposed for the determination of phenobarbital. The chemiluminescence intensity responded to the concentration of phenobarbital linearly ranging from 0.05 to 10 ng·ml⁻¹ with the detection limit of 0.02 ng·ml⁻¹ (3σ). At a flow rate of 2.0 ml·min⁻¹, a complete determination of phenobarbital, including sampling and washing, could be accomplished in 0.5 min, offering the sampling efficiency of 120 h⁻¹ accordingly. The method was applied successfully in an assay of PB for pharmaceutical preparations, human urine and serum without any pretreatment with recovery from 95.7 to 106.7% and RSDs of less than 3.0%.

Key words: phenobarbital, chemiluminescence, luminol.