

*Prikaz bolesnika/
Case reports*

Correspondence to:

Dr sc. med. Snežana Đorđević, asistent
na Katedri za kliničku, analitičku i
eksperimentalnu toksikologiju i far-
makologiju VMA i asistent na
Medicinskoj hemiji Visoke medicinske
škole, akademskih studija, VMA
Tel. ++ 381 11 36-09-481

e-mail: ivezicnela@yahoo.com

**ODREĐIVANJE KARBOFURANA U
BIOLOŠKOM MATERIJALU – PRIMENA
TEČNE HROMATOGRAFIJE SA UV
DETEKCIJOM I GASNE HROMATOGRAFIJE
SA MASENOM SPEKTROMETRIJOM**

**DETERMINATION OF CARBOFURAN IN
BIOLOGICAL SAMPLES – APPLYING OF
LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH UV
DETECTION AND GAS CHROMATOGRAPHY
WITH MASS SPECTROMETRY**

Snežana Đorđević, Vesna Kilibarda, Gordana Tomašević

Vojnomedicinska akademija, Beograd

Ključne reči

karbofuran, tečna hromatografija, gasna
hromatografija, UV detekcija, masena
spektrometrija, serum, urin

Key words

carbofuran, high performance liquid chro-
matography, UV detection, gas chromatog-
raphy, mass spectrometry, serum, urine

Apstrakt

Karbofuran je pesticid iz grupe metilkarbamata koji izaziva reverzibilnu inhibiciju enzima holinesteraze. Do trovanja dolazi usled nakupljanja endogenog acetilholina. Zbog toga je važno određivanje aktivnosti ovog enzima. Osim određivanja aktivnosti holinesteraze, od velikog je značaja i dokazivanje samog karbofurana u biološkom materijalu otrovanih pacijenata, kao i u post mortem materijalu, što je i bio cilj ovog rada. U radu je opisana primena visoko efikasne tečne hromatografije sa UV skenirajućim detektorom (HPLC-PDA) i spektralnom potvrdom za brzo i jednostavno dokazivanje karbofurana u serumu i urinu otrovanih pacijenata. Zahvaljujući računaru koji poseduje biblioteku UV spektara velikog broja lekova i pesticida analiza biološkog materijala ovom tehnikom je jednostavna. Za preciznije određivanje koncentracije karbofurana u biološkom materijalu, naročito kada su u pitanju analize od sudsko medicinskog značaja, tehnika izbora je gasna hromatografija sa maseno spektrometrijskim detektorom (GC-MS). Primenom ove tehnike potvrđeno je prisustvo karbofurana u analiziranim uzorcima.

UVOD

Karbofuran (2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il metilkarbamata) je sistemski insekticid za suzbijanje zemljišnih štetočina sa kontaktnim i digestivnim delovanjem. Toksičan je za sisare. Može se apsorbovati preko digestivnog trakta, preko kože ili inhalacijom aerosola preko pluća. Posle resorpcije brzo se metaboliše i eliminiše iz organizma ⁽¹⁾. Pošto spada u grupu reverzibilnih inhibitori enzima holinesteraze do trovanja dolazi usled nakupljanja endogenog acetilholina. Kao i kod trovanja organofosforinim pesticidima, simptomi trovanja nastaju kao posledica holinergične stimulacije. Za razliku od trovanja organofosforinim, kod trovanja karbamatima oporavak je brži zbog reverzibilne inhibicije holinesteraze i brzog metabolizma. Prvi simptomi trovanja su smetnje vida i disanja, vrtoglavica, glavobolja i opšta slabost. Glavni znaci trovanja su mioza, hipersalivacija, pojačano znojenje, dijareja, bronhospazam,

fascikulacije mišića, tahikardija i hipertenzija, koje zatim prelaze u bradikardiju i hipotenziju. Kod teških trovanja dolazi do depresije centralnog nervnog sistema (koma). Depresija disanja u kombinaciji sa plućnim edemom su najčešći uzrok smrti kod trovanja metilkarbamatima ⁽²⁻³⁾.

Zbog svega toga određivanje aktivnosti eritrocitne holinesteraze je bitno kod trovanja karbofuranom. Pošto su simptomi trovanja isti kao i simptomi trovanja organofosforinim pesticidima, potrebno je izvršiti i identifikaciju uzročnika trovanja da bi se primenilo adekvatno lečenje otrovanih pacijenata.

Određivanje karbofurana iz biološkog materijala može se vršiti imunoenzimskim testovima (ELISA) i tečnom hromatografijom sa fluorescentnim detektorom ⁽⁴⁾. U radu Lopez-Blanco MC i sar. opisano je određivanje karbofurana tečnom hromatografijom sa diode array detektorom ⁽⁵⁾. Primenom hromatografskih tehnika sa spektrometrijskom potvrdom, može se dokazati prisustvo karbofurana u

biološkom materijalu (krv, urin, lavat) što je sigurnija potvrda trovanja. Najčešće primenjavana i najpouzdanija tehnika za detekciju i određivanje koncentracije karbofurana u hrani, vodi za piće i biološkom materijalu je gasna hromatografija sa maseno spektrometrijskim detektorom (6-8). U novije vreme često je primenjavana i tečna hromatografija u sprezi sa masenospektrometrijskim detektorom (9-11).

Cilj ovog rada bio je određivanje karbofurana u biološkom materijalu otrovanih bolesnika visokoeфикаsnom tečnom hromatografijom sa UV detekcijom (HPLC-PDA) i potvrda dobijenih rezultata gasnom hromatografijom sa maseno spektrometrijskim detektorom (GC-MS).

Materijal i metode

Uzorci krvi, urina i lavata uzorkovani su od bolesnika pod sumnjom da je došlo do trovanja pesticidom karbofuranom. Svi uzorci su nakon prijema do analiziranja čuvani na 20°C.

Acetonitril (HPLC čistoće), dietiletar, amonijak i etilacetat (p.a. čistoće) nabavljeni su od firme Merck, Nemačka. Natrijum dihidrogen fosfat (HPLC čistoće) koji je korišćen za izradu mobilne faze nabavljen je od firme Sigma-Aldrich. Analitički standard karbofurana (98%) nabavljen je od firme Sigma Aldrich. Karbofuran je određen tehnikom tečne hromatografije u sprezi sa PDA detektorom i bibliotekom UV spektara.

Hromatografski uslovi za HPLC-PDA: Mobilna faza A: acetonitril, mobilna faza B: natrijum dihidrogen fosfat 50 mM pH 3,6 doteran sa H3PO4 (20%), Mobilna faza filtrirana je i degazirana preko membranskog filtra;

Odnosi mobilnih faza A i B i brzine protoka prikazani su u tabeli 1.

vreme (min.)	protok (mL/min)	A %	B %	kriva
	1.0	85	15	
3,0	1.0	65	35	6
9,0	1.0	20	80	6
28,0	1.5	20	80	6
31,0	1.5	20	80	6
35,5	1.5	85	15	6
35,0	0.3	85	15	6

Tabela 1. Odnosi mobilnih faza i brzine protoka

Hromatografsko razdvajanje karbofurana i komponenti matriksa vršeno je na koloni Symmetry® C8 4,6x250mm Waters sa pretkolonom Sentry Guard Symmetry® C18. Temperatura kolone bila je 30°C. PDA detekcija karbofurana vršena je na $\lambda = 230,0$ nm; Retenciono vreme za karbofuran iznosilo je $R_t = 17,30$ min.

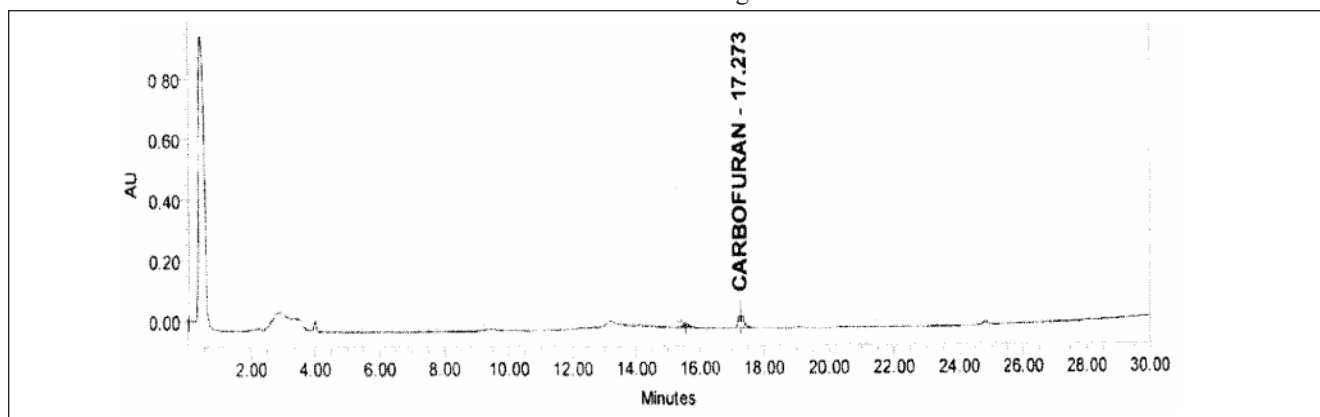
Hromatografski uslovi za GC-MS:

Gasni hromatograf Varian 3400

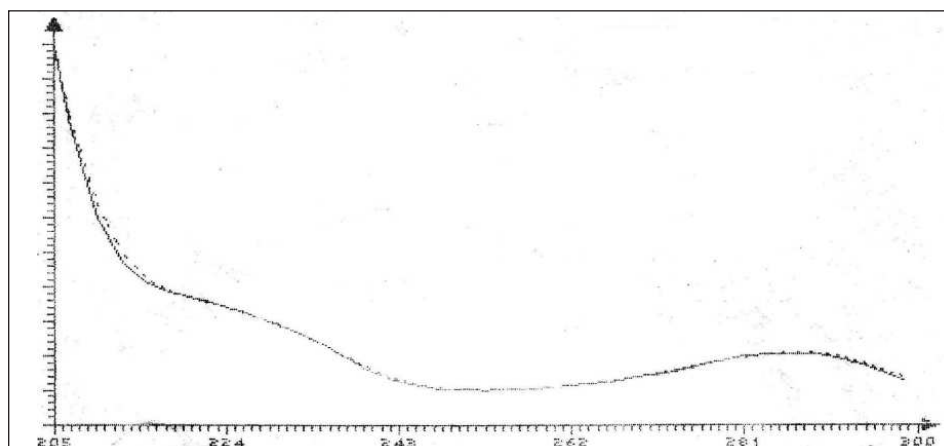
Kolona: J&W Scientific DB-5, 30 m x 0,25 mm, debljina filma 0,25 μ m

Temperatura injektora 260°C; temperatura transfer linije 260°C; temperaturni program kolone: početna temperatura kolone iznosila je 80°C u toku 1 min, a zatim je kolona zagrejana do 280°C u toku 20 min sa porastom temperature od 10°C/min. Kolona je grejana na 280°C u toku 4 min.

MS detektor: opseg merenja 50-500 m/z, EI jonski mod, background mass 49 m/z



Sl. 1.- Hromatogram uzorka krvi

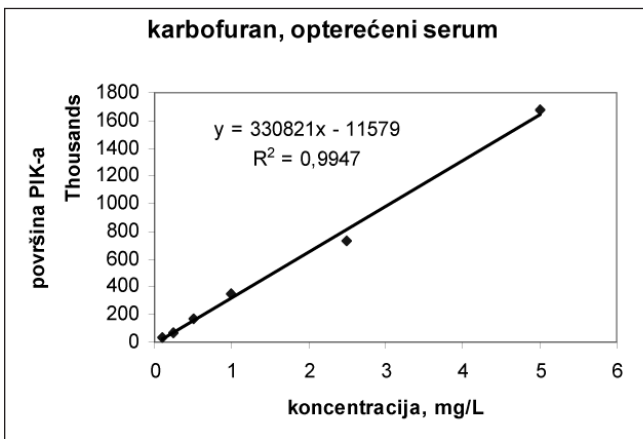


Sl. 2.- Poklapanje UV spektara karbofurana iz biblioteke i uzorka

Priprema uzoraka za analizu:

Karbofuran je iz uzoraka ekstrahovan kiselom (0,1 mL 0,1M hlorovodonične kiseline) tečno-tečnom ekstrakcijom sa dietiletom. Nakon ekstrakcije, organski rastvarač je uparen do suva. Suvi ostatak je rekonstituisan u 1 mL metanola i analiziran na HPLC-PDA metodom.

Isti uzorci su nakon uparavanja metanola rekonstituisani u rastvoru difenilamina (DFA) u etilacetatu i analizirani GC-MS tehnikom.



Slika 3. kalibraciona kriva seruma opterećenih karbofuranom

Kvalitativna analiza uzoraka vršena je pomoću UV detektora koji snima spektre analita na više talasnih dužina i računara koji poseduje software za poređenje dobijenih spektara iz uzorka sa spektrima iz baze podataka. Na slikama 1. i 2. prikazani su HPLC-PDA hromatogram i UV spektar karbofurana iz uzorka krvi koji je upoređen sa kom-

pjuterskom bibliotekom. Određivanje koncentracije karbofurana u uzorcima vršeno je iz jednačine prave kalibracione krive seruma opterećenih standardnim rastvorima poznatih koncentracija. Kalibraciona kriva opterećenih seruma bila je linearna u opsegu koncentracija od 0,1 do 5 mg/L.

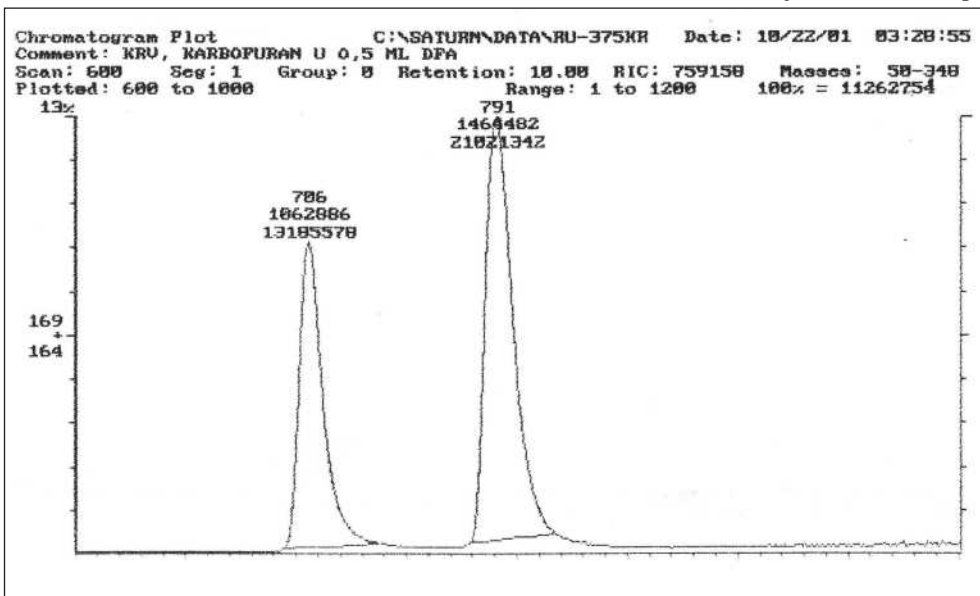
Kalibraciona kriva seruma opterećenih karbofuranom prikazana je na slici 3.

Za potvrdu rezultata dobijenih analizom HPLC-PDA metodom korišćena je metoda gasne hromatografije sa masenospektrometrijskim detektorom (GC-MS). Određivanje karbofurana u biološkom materijalu vršeno je metodom internog standarda uz primenu rastvora difenilamina u etilacetatu koncentracije 25 mg/L kao internog standarda.

Na slikama 4. i 5. prikazani su GC-MS hromatogram i MS spektar karbofurana.

Diskusija

Izolovanje karbofurana iz biološkog materijala može se vršiti tečno-tečnom ili čvrsto-faznom ekstrakcijom. Takođe, u analizi uzoraka krvi može se primeniti i precipitacija proteina kao jedan od načina pripreme ⁽¹⁰⁾.



Slika 4. Hromatogram uzorka krvi posle GC-MS analize

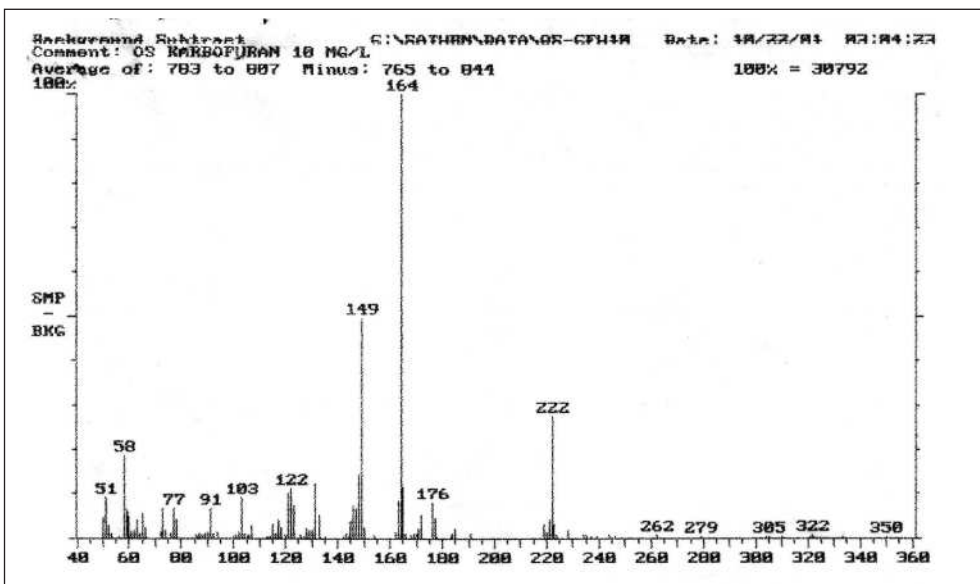
Analički prinos ekstrakcije karbofurana iz plazme nakon analize GC-MS-MS metodom iznosio je od 81-107% ⁽¹⁰⁾

Primenjena tečno-tečna ekstrakcija sa dietiletom dala je analitički prinos veći od 90 %.

U literaturi su opisane različite hromatografske tehnike za određivanje karbofurana kao što su HPLC-UV, GC-FID, GC-MS. Hromatografsko-spektrometrijske metode su visoko specifične i osetljive metode koje daju nedvosmislenu potvrdu analiziranih jedinjenja. Zahvaljujući primeni računara koji poseduju biblioteke spektara mogu se koristiti kao skrining tehnike za identifikaciju nepoznatog uzročnika trovanja.

Kada su u pitanju ciljane analize mogu se koristiti i druge metode, kao što su imunoenzimski testovi. Na taj način se može odrediti koncentracija karbofurana u uzorcima ⁽⁴⁾. Međutim, nedostatak ove tehnike je u tome što jedinjenja slične hemijske strukture mogu dati unakrsne reakcije i lažno pozitivne rezultate.

Prednost opisane HPLC-PDA metode je u tome što je moguće istovremeno određivanje velikog broja toksiko-



Slika 5. Maseni spektar karbofurana

loški značajnih jedinjenja i njihovih metabolita, te je tako od velikog značaja i u forenzičkoj toksikologiji. UV spektrometrijska analiza pruža mogućnost identifikacije nepoznatog analita. Osim toga ova metoda se može iskoristiti i kao semikvantitativni test za brzo određivanje koncentracije nepoznatog uzročnika trovanja kada je bolesnik vitalno ugrožen.

S obzorom na to da jedinjenja slične hemijske strukture daju slične UV spektre, neophodno je dobijene rezultate potvrditi analizom uzoraka gasnom hromatografijom sa masenospektrometrijskim detektorom.

Masenospektrometrijska analiza daje nedvosmisleno potvrdu identiteta ispitivanog jedinjenja. Prednost GC-MS metode je i u tome što se pesticidi mogu detektovati u veoma niskim koncentracijama. GC-MS-MS metoda za određivanje karbofurana i njegovih metabolita u plazmi bila je linearna u opsegu od 0,50-250 ng/mL.

Limit kvantifikacije LC-MS-MS metode bio je 5 ng/mL (9).

Rezultati istraživanja Otieno-a i saradnika su pokazali da je HPLC metoda u kombinaciji sa GC-MS metodom pogodna za određivanje rezidua karbofurana i njegovih metabolita u tkivima ptica i da ima važan sudsko-medicinski značaj (11).

Opisana metoda visokoeфикаsne tečne hromatografije sa UV skenirajućim detektorom, primenjena je u analizi uzoraka krvi i lavata bolesnika koji je primljen u Kliniku za urgentnu toksikologiju u farmakologiju VMA. U oba uzorka dokazano je prisustvo karbofurana.

Prema literaturnim podacima letalne koncentracije karbofurana u krvi kretale su se u opsegu od 0,32 do 11,6 mg/L (12).

Koncentracija karbofurana u uzorku krvi nakon analize HPLC-UV metodom iznosila je 0,186 mg/L. Analizom istih uzorka primenom gasne hromatografije sa masenospektrometrijskim detektorom potvrđen je karbofuran kao uzročnik trovanja. Dobijena koncentracija je manja u odnosu na prikazane koncentracije karbofurana u krvi u trovanjima sa letalnim ishodom. To je u skladu sa činjenicom da je bolesnik primljen i izlečen u Klinici za urgentnu toksikologiju i farmakologiju VMA.

Analizom post mortem materijala opisanom HPLC-PDA metodom koncentracija karbofurana u krvi iznosila je 0,32 mg/L, u jetri 0,37 mg/kg i 0,18 mg/kg u bubregu. I ovi rezultati su u skladu sa literaturnim.

Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se HPLC-PDA metoda može koristiti sa solidnom pouzdanošću za brzu i jednostavnu analizu karbofurana u biološkom materijalu. Ovo je od velikog značaja kada su u pitanju životno ugroženi pacijenti. Za precizno određivanje koncentracije karbofurana u biološkom materijalu, posebno kada su u pitanju analize od sudsko medicinskog značaja (post mortem materijal) potrebno je izvršiti analizu primenom gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom. Iako zahteva složenu proceduru pripreme i analize uzoraka, kao i znanje i iskustvo analitičara, ovo je najpouzdanija analitička tehnika u analizi karbofurana.

Abstract

Carbofuran is a pesticide from the group of methylcarbamates which causes a reversible inhibition of the acetylcholinesterase enzyme. The poisoning is provoked by the accumulation of endogenous acetylcholine. Thus, it is important to determinate this enzyme. Apart from determining this action of acetylcholinesterase, it is of great importance to prove the existence of the carbofuran in the biological material of the poisoned patients, which was the objective of this work. The application of multicolumn liquid chromatography with UV spectral confirmation (HPLC-PDA) for fast and simple proving of carbofuran in the serum and urine of the poisoned patient is described in this work. Owing the computer which owns UV spectrum data of the large number of medicines and pesticides, the analysis of the biological samples by this technique is simple. For the more precise determination of the carbofuran concentration in biological material, especially when the analyses of the forensic and medical importance are concerned, the chosen technique is the gas chromatography with the mass spectrometry detector. By application of this technique the presence of carbofuran in the analyzed samples is confirmed.

LITERATURA

1. D. Soldatović, R. Šovljanski, D. Milenković, S. Milić, Toksikologija pesticide sa analitikom, Beograd, 1980;115-6, 122, 410-2
2. Mitić N. Pesticidi u poljoprivredi i šumarstvu u Jugoslaviji, 1994
3. Ecobichon DJ. Toxic effect of pesticides. Casarett and Doull's toxicology: The Basic Science of Poisons 5th, ed. New York: McGraw-Hill, 1996, 569
4. Moreno MJ, Abad A, Pelegri R, Marinez MJ, Saez A, Gamon M, Montoya A. Validation of a monoclonal enzyme immunoassay for the determination of carbofuran in fruits and vegetables, J Agric Food Chem. 2001;49(4):1713-9
5. Lopez-Blanco MC, Cancho-Grande B, Simal-Gandara J. Comparison of solid-phase extraction and solid-phase microextraction for carbofuran in water analyzed by high-performance liquid chromatography-photodiode-array detection, J Chromatogr A. 2002; 963(1-2):117-23
6. Briand O, Millet M, Bertrand F, Clement M, Seux R. Assessing the transfer of pesticides to the atmosphere during and after application. Development of a multiresidue method using adsorption on Tenax and thermal desorption-GC/MS, Anal Bioanal Chem. 2002; 374(5):848-57
7. Climent MJ, Miranda MA. Gas chromatographic-mass spectrometric study of photodegradation of carbamate pesticides, J Chromatogr A. 1996; 738(2): 225-31
8. Richter P, Sepulveda B, Oliva R, Calderon K, Seguel R. Screening and determination of pesticides in soil using continuous subcritical water extraction and gas chromatography-mass spectrometry, J Chromatogr A. 2003; 994(1-2): 169-77
9. Araoud M, Douki W, Najjar MF, Kenani A. Simple analytical method for determination of pesticide residues in human serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry, J Environ Sci Health B. 2010 Apr;45(3):242-8
10. Petropoulou SS, Tsarbopoulos A, Siskos PA. Determination of carbofuran, carbaryl and their main metabolites in plasma samples of agricultural populations using gas chromatography-tandem mass spectrometry, Anal Bioanal Chem. 2006 Aug;385(8):1444-56
11. Otieno PO, Lalah JO, Virani M, Jondiko IO, Schramm KW. Carbofuran and its Toxic Metabolites Provide Forensic Evidence for Furadan Exposure in Vultures (*Gyps africanus*) in Kenya, Bull Environ Contam Toxicol. 2010 Apr 7. ŠEpub ahead of print
12. Ameno K, Lee SK, In SW, Yang JY, Yoo YC, Ameno S, Kubota T, Kinoshita H, Ijiri I. Blood carbofuran concentrations in suicidal ingestion cases, Forensic Sci Int. 2001 Feb 1;116(1):59-61