

Prikazi bolesnika/
Case reports

ANALITIČKA POTVRDA TROVANJA
KARBOFURANOM METODOM HPLC-PDA
Prikaz slučaja

Correspondence to:

Dipl. bioh. Gordana Brajković,
specijalista toksikološke hemije
Vojnomedicinska akademija, Centar za
kontrolu trovanja, Beograd
Tel: +381-11-3609481

E-mail: gocab@panet.rs

ANALYTICAL CONFIRMATION
OF POISONING CARBOFURAN
BY HPLC-PDA METHOD/*Case report*

Gordana Brajković, Dragana Rančić, Miodrag Jovanović,
Vesna Kilibarda

Vojnomedicinska akademija, Centar za kontrolu trovanja, Beograd

Ključne reči

Karbofuran, furadan; holinesteraza;
toksikološko-hemijska analiza;
tačna hromatografija; krv; urin.

Key words

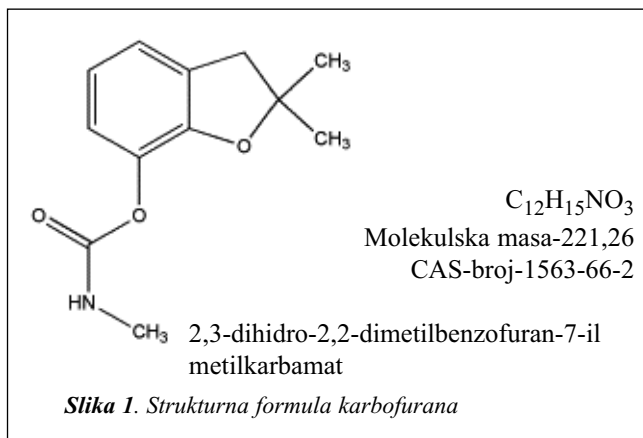
Carbofuran; Furadan; cholinesterase;
toxicology-chemical analysis;
liquid chromatography; blood; urine.

Apstrakt

U radu je prikazan slučaj akutnog samotrovanja furadanom gde je dominirala inhibicija holinesteraze. Pacijentkinja je bez svesti, u stanju kome hospitalizovana na Kliniku za urgentnu toksikologiju, Centra za kontrolu trovanja, Vojnomedicinske akademije. Uzorci krvi i urina poslani su na kompletnu toksikološku analizu, koja uključuje analizu pesticida u krvi metodom tačne hromatografije (HPLC-PDA). Karbofuran je detektovan u uzorku krvi u koncentraciji 16650 ng/mL. Koncentracija karbofurana u urinu bila je 10610 ng/mL. Određivanje karbofurana dokazano je metodom HPLC-PDA, a primenjena metoda za karbofuran je linearna u opsegu od 50-1000 ng/mL, sa koeficijentima korelacije $r > 0.99$. Limit kvantifikacije (LOQ) bio je 50 ng/mL. Prinos ekstrakcije za karbofuran iz seruma bio je 91 – 100%. Uzrok trovanja bio je akutna intoksikacija karbofuranom.

UVOD

Karbofuran je sintetički derivat monometil karbaminske kiseline i prema hemijskoj podeli pripada karbamatima. Karbofuran je antiholinergični karbamat koji se koristi kao insekticid, nematocid i akaricid u poljoprivrednoj praksi širom sveta. Zbog široke primene u poljoprivredi neizbežna je kontaminacija vode, zemljišta i vazduha pa na taj način ima uticaj na zdravlje čoveka, životinjski i biljni svet. (5) Pripada visoko toksičnim pesticidima. Najviše stradaju ptice (8) pa se iz tog razloga Agencija za zaštitu životne sredine *Environmental Protection Agency* (EPA) protivi njegovom korišćenju.

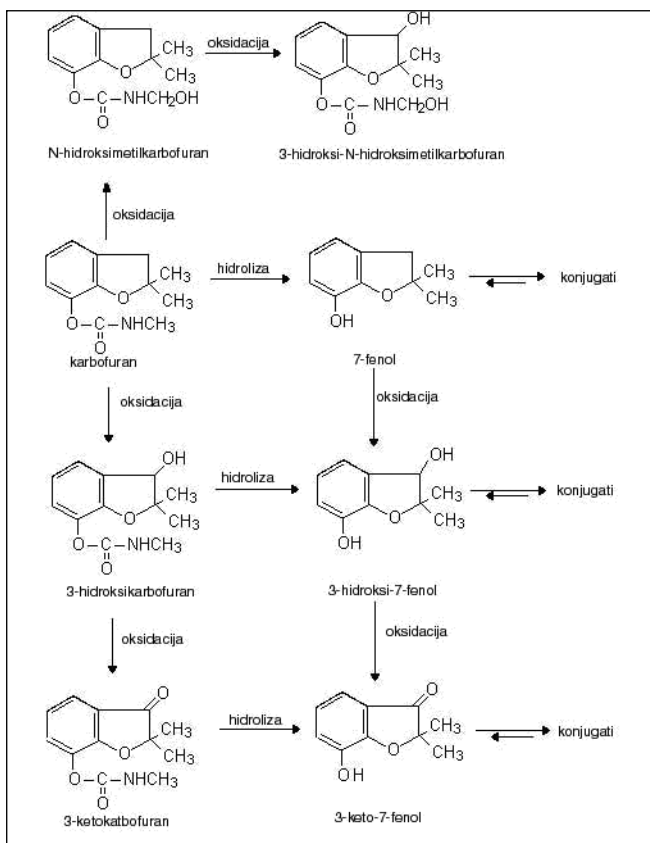


Slika 1. Strukturna formula karbofurana

Akutno trovanje karbamatima je praćeno inhibicijom aktivnosti acetilholinesteraze koje je reverzibilne prirode. U prvom stadijumu reakcije je zastupljeno je karbamilovanje holinesteraze. Ovaj kompleks nije tako stabilan pa se brzo razgrađuje uz regeneraciju enzima. Razgrađuje se putem oksidacije i hidrolize, a produkti razgradnje se brzo eliminišu. (1,3,4.)

Karbofuran se brzo absorbuje preko kože, sluzokože, gastrointestinalnog i respiratornog trakta. Eliminacija započinje oksidacijom u metabolite 3-hidroksi-N-hidroksimetilkarbofuran, 3- hidroksikarbofuran i 3-ketokarbofuran koji su manje aktivni od samog karbofurana. Hidrolizom pomoću esteraza dalje nastaju karbofuran fenoli, 3-ketokarbofuran-7-fenol i 3-hidroksikarbofuran-7-fenol i njihovi konjugati (uglavnom glikozidi i sulfati). Većim delom se izlučuje urinom i manje fecesom. (10,11)

Posledica akutne intoksikacije karbamatima je akumulacija acetilholina na nervnim završecima što se manifestuje muskarinskim, nikotinskim efektima, a kod težih trovanja i efektima na CNS. Simtomi su povećan bronhijalni sekret, preterano znojenje, salivacija, suženje očiju, grčevi, povraćanje, proliv i tahikardija, depresija respiratornog sistema i koma.



Slika 2. Karbofuran i metaboliti karbofurana

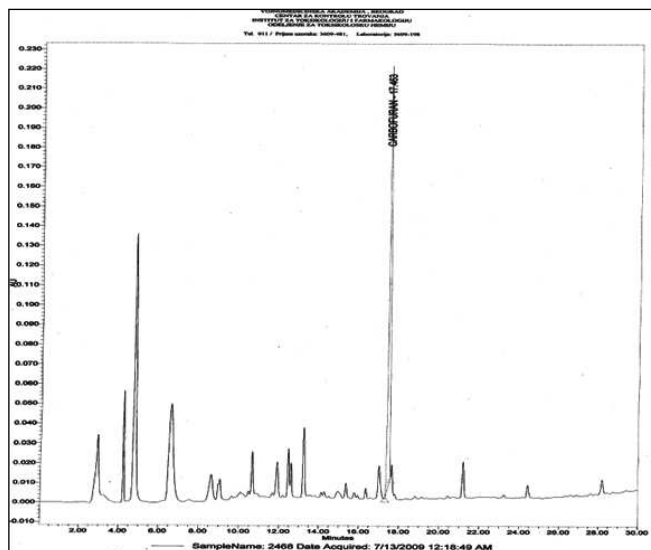
MATERIJAL I METODE

Uzorci krvi i urina uzeti su od pacijenta S.D. Hloroform, amonijak, acetonitril i metanol (HPLC čistoće) nabavljeni su od firme Merck, Nemačka. Reagensi mobilne faze natrijum dihidrogen fosfat i standard karbofurana koji je korišćen za analizu dobijeni su od *Sigma-Aldrich*. Karbofuran je određen tehnikom tečne hromatografije u sprezi sa PDA detektorom i bibliotekom UV spektara. Hromatografski uslovi za HPLC-PDA: Mobilna faza: acetonitril : natrijum dihidrogen fosfat 50 mM pH 3,6 doteran sa H₃PO₄ (20%). Mobilna faza je filtrirana i degazirana preko membranskog filtra; kolona Symmetry® C8 4,6x250mm Waters sa pretkolonom Sentry Guard Symmetry® C18, temperatura kolone: 30°C, brzina protoka mobilne faze: 1-1,5 mL/min gradijent: PDA detektor: $\lambda = 210,0$ nm; retenciono vreme za karbofuran: $Rt \approx 17,463$ min.

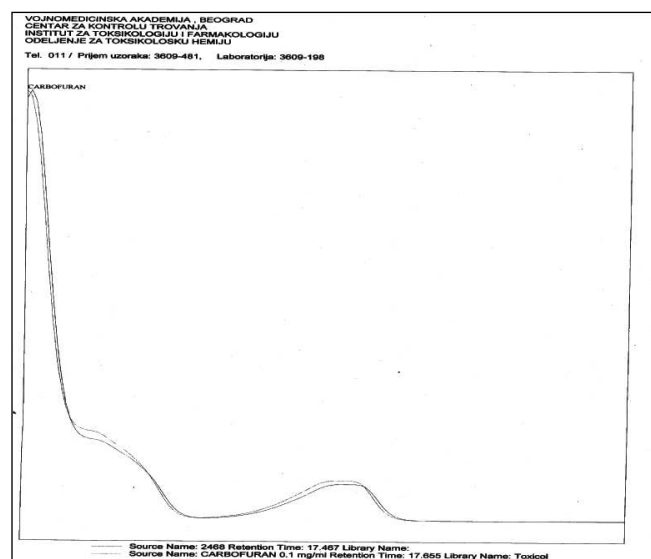
Izolovanje karbofurana rađeno je na Oasis® HLB ketridžima zapremine 3 mL, čija je veličina pora 30 μ m, metodom čvrsto-fazne ekstrakcije. Nakon centrifugiranja uzorak seruma je ekstrahovan. Kolona HLB ketridža je kondicionirana sa 1mL metanola, a potom uravnotežena sa 1mL vode. Posle aktivacije na kolonu je nanet uzorak seruma i propušten uz protok 2mL/min. Kolona je isprana sa 1 mL 5% metanola. Eluiranje je vršeno 1 mL metanola i nakon toga uzorak je hromatografisan.

REZULTATI

Dostavljeni su uzorci krvi i urina pacijentkinje D.S. sa zahtevom da se izvrši analiza na prisustvo insekticida kao i zahtev za određivanje aktivnosti acetilholinesteraze. Toksikološko-hemijskom analizom primenom tečne hromatografije (HPLC) sa PDA detektorom i poređenjem retencionih vremena i UV spektara sa UV bibliotekom u uzorku



Slika 3. UV hromatogram karbofurana iz uzorka krvi



Slika 4. UV spektar karbofurana iz uzorka krvi i biblioteke

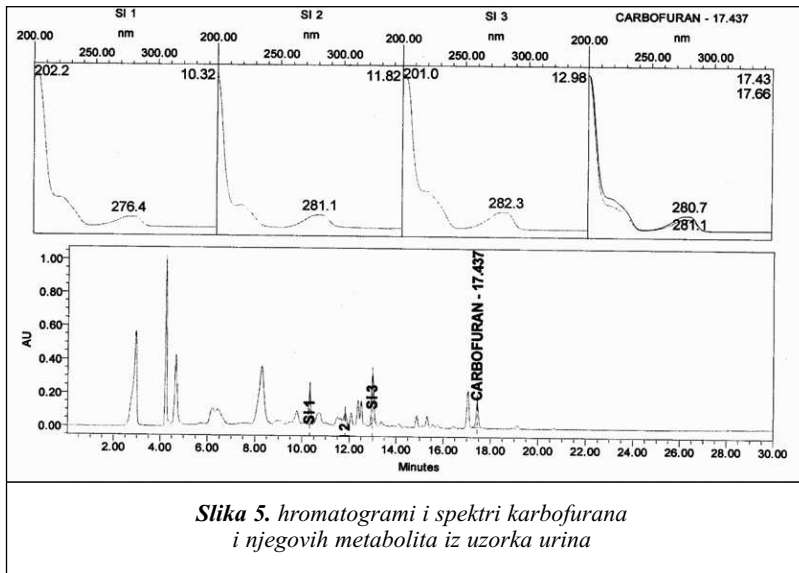
krvi koji je dostavljen dokazano je prisustvo karbofurana u koncentraciji od 16650 ng/mL, prisustvo fluoksetina 230 ng/mL, njegovog metabolita, lorazepamama 250 ng/mL i nimesulida 1480 ng/mL čiji su UV spektri potvrđeni. U dostavljenom uzorku urina dokazano je prisustvo karbofurana u koncentraciji od 10610 ng/mL, metabolita karbofurana i prisustvo metabolita fluoksetina i lorazepamama. Određena je aktivnost acetilholinesteraze i ona je iznosila 2075,39 IJ/L.

Uvedena je metoda HPLC/PDA za dokazivanje i određivanje karbofurana metodom čvrsto-fazne ekstrakcije u biološkom materijalu.

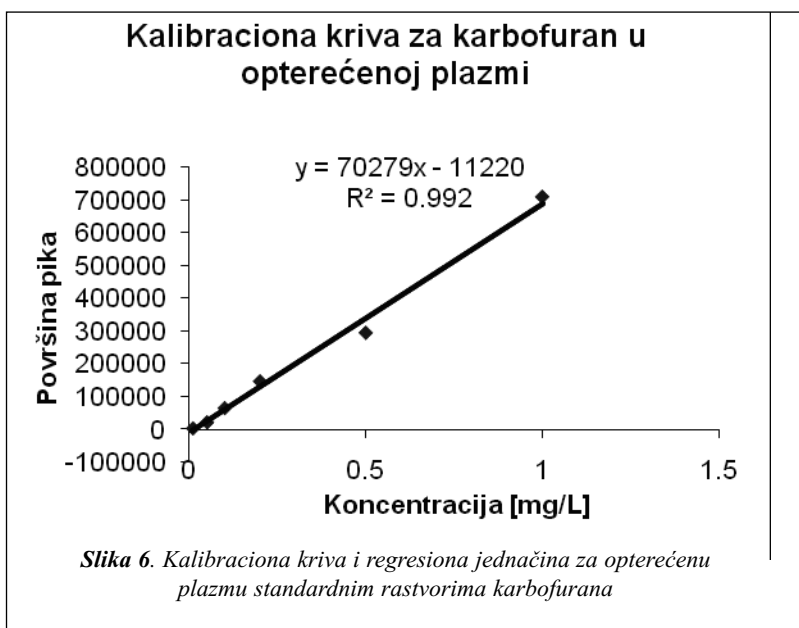
Na slikama 3, 4 i 5 prikazani su hromatogrami i UV spektri karbofurana u uzorku krvi i urina koji se poklapa sa UV spektrom iz biblioteke spektara.

Metoda je validovana i linearna u rasponu 50-1000 ng/mL ($r^2 > 0,99$). Granica detekcije je 10 ng/mL, a limit kvantifikacije je 50 ng/mL sa prinosom karbofurana od 91 – 100%. Korišćenjem veće zapremine uzorka od 5 mL možemo postići LOD i LOQ 5 i 10 ng/mL.

Na slici 6. je prikazana je kalibraciona kriva za karbofuran u plazmi opterećenju različitim koncentracijama standarda na HPLC-u.



Slika 5. hromatogrami i spektri karbofurana i njegovih metabolita iz uzorka urina



Slika 6. Kalibraciona kriva i regresiona jednačina za opterećenu plazmu standardnim rastvorima karbofurana

Prikaz slučaja trovanja karbofuranom

Pacijentkinja S.D. životne dobi 67 godine, primljena je u Kliniku za urgentnu i kliničku toksikologiju VMA zbog akutne intoksikacije preparatom Furadan. Pacijentkinja je zatečena u kući bez svesti i disanja, miotičnih zenica, sa tragovima povraćanog sadržaja, penom na ustima i ostacima prosutog furadana. Reč je o recidivantnom samotrovanju.

Na prijemu stanje svesti je nivoa kome, reaguje na draži, insuficijentnog disanja, kože i vidljive sluzokože blede ciklama prebojene, zenice miotične, tromo reaktivne, hemodinamski kompenzovana. Srčana radnja ritmična, tonovi tiši, frekvence 90/min. TA120/85 mmHg.

Tokom opservacije registrovano je pogoršanje stanja svesti pacijenta do nivoa izrazite pospanosti, uz konfuznost, dezorjentisanost, nepovezan govor, povremene halucinacije, ataksiju. Toksikološkim analizama krvi i urina dokazano je prisustvo karbofurana. Eritrocitna holinesteraza je bila 2075 IJ/L prvog dana, a serumska holinesteraza 1188 IJ/L.

Zaključeno je da se kod pacijentkinje radilo o akutnom samotrovanju karbofuranom. U kliničkoj slici dominirala je inhibicija holinesteraze. Trovanje je bilo teškog stepena i zahtevalo je visoke doze atropina i mehaničku ventilaciju u trajanju od dva dana. Pacijentkinja se toksikološki izlečena otpušta iz Klinike za urgentnu toksikologiju, VMA i upućuje

na dalje lečenje na odeljenje psihijatrije u ZC Sremska Mitrovica.

Diskusija

U navedenom slučaju trovanja toksikološko-hemijskom analizom krvi dokazano je prisustvo karbofurana u koncentraciji od od 16650 ng/mL. U uzorku urina koji je dostavljen dokazano je prisustvo karbofurana u koncentraciji od 1061 ng/mL i njegovih metabolita.

Primena tehnike tačne hromatografije sa PDA detekcijom je od velikog značaja za praćenje koncentracija karbofurana u urgentnim i sudsko-medicinskim analizama.^(6,8) Metoda čvrsto-tečne ekstrakcije je brza i jednostavna za pripremu uzoraka a ujedno efikasna, ekonomična i laka za rad.^(2,6,10) Metoda je validovana i linearna u rasponu 50-1000 ng/mL ($r^2 > 0,99$). Granica detekcije je 10 ng/mL, a limit kvantifikacije je 50 ng/mL sa prinosom od 91 – 100%. Korišćenjem veće zapremine uzorka možemo postići niži LOD i LOQ.

U radovima je prikazana priprema uzoraka voda za detekciju i kvantifikaciju karbofurana SPE ekstrakcijom uz primenu tačne hromatografije sa PDA detekcijom koje smo primenili u pripremi uzoraka biološkog materijala.^(2,3,7) Česta primena i prednost GC-MS metode je 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 detekcije LC-MS-MS metode bio je 0,015-0,15 ng/mL.^(2,9,13)

ZAKLJUČAK

Određivanje koncentracije karbofurana u uzorcima je značajno u urgentnoj i forezničkoj toksikologiji zbog slučajnih trovanja koja mogu biti i namerna kao u datom prikazu. Postupak pripreme uzoraka je jednostavan i brz, a detekcija na HPLC- PDA precizna i specifična.

Abstract

This report presents a case of acute selfpoisoning by furadan where inhibition cholinesterase was dominated. Patient with state of consciousness was hospitalized at the Clinical for Toxicology, Poison Control Centre, Military Medical Academy in Belgrade. Blood and urine were submitted for a full toxicological analysis, including an pesticides analysis by using liquid chromatography-photodiode array detection (HPLC-PDA). Carbofuran was identified in the blood at 16650 ng/mL. Concentration of carbofuran in urine was 10610 ng/mL. No other drugs and alcohol were detected. The determination of carbofuran in the biological sample was achieved by the HPLC-PDA method. The applied method for carbofuran was linear in the range of 50-1000 ng/mL, with the correlation coefficient $r > 0.99$, for booth. The limit of quantification (LOQ) was 50 ng/mL. Recovery of the extraction of carbofuran from serum was 91–100 %. The cause of poisoning was attributed to acute carbofuran intoxication.

LITERATURA

1. Alvito P, Alvares Pharmacology and toxicology of carbamates. In: Clinical and Experimental Toxicology of organophosphates and carbamates 1992; 40-46.
2. Carabias-Martínez R, García-Hermida C, Rodríguez-Gonzalo E, Ruano-Miguel L.. Behaviour of carbamate pesticides in gas chromatography and their determination with solid-phase extraction and solid-phase microextraction as preconcentration steps. J Sep Sci. 2005;28(16):2130-8.
3. D'Archivio AA, Fanelli M, Mazzeo P, Ruggieri F Comparison of different sorbents for multiresidue solid-phase extraction of 16 pesticides from groundwater coupled with high-performance liquid chromatography. Talanta. 2007;15;71(1):25-30.
4. D. Soldatović, R. Šovljanski, D. Milenković, S. Milić, Toksikologija pesticida sa analitikom, Beograd, 1980;115-6, 122, 410-2
5. Janjić V, Mitrić S. Pesticidi u poljoprivredi i šumarstvu u Jugoslaviji, 2004.
6. Kiyoshi Ameno, Carbamate pesticides. In: Drugs and Poisons in Humans A Handbook of Practical Analysis. 2006; (559-570).
7. 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.
8. 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. Bull Environ Contam Toxicol. 2010;84(5):536-44. Epub 2010 Apr 7.
9. 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;385(8):1444-56.
10. Paul W. Ferguson, Michael S. Dey, Sarah A. Jewell and Robert I. Krieger. Carbofuran Metabolism and Toxicity in the Rat. in Toxicol. Sci. 1984;4 (1); 14-21.
11. Ramesh C. Gupta Carbofuran toxicity. J. Toxicology 1994;43(4); 383 – 418.
12. S. Đorđević, V. Kilibarda, G. Tomašević. Određivanje karbofurana u biološkom materijalu – primena tačne hromatografije sa UV detekcijom i gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom. Med Data Rev 2010;2 (2); (155-159).
13. Wang S, Zhao P, Min G, Fang G. Multi-residue determination of pesticides in water using multi-walled carbon nanotubes solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr A. 2007;21;1165(1-2):166-71.