

О.М. Щербина¹, канд. фарм. наук, доцент, А.О. Бедзай²

¹ (Львівський державний університет безпеки життєдіяльності,

² Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького)

ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДУ ЕКСКЛЮЗІЙНОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ ДЛЯ АНАЛІЗУ ДЕЯКИХ БАРБИТУРАТИВ В БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ ОРГАНІЗМУ

Гексобарбітал (похідне барбітурової кислоти) використовується як лікарський засіб, що відноситься до снодійних засобів короткої дії. Відомі летальні випадки при його неконтрольованому використанні. Запропоновано методику виділення гексобарбіталу із сечі, підбрано умови очистки від домішок у витяжках із біологічних рідин за допомогою ексклюзійної хроматографії на гелях сефадексів. Проведено порівняльну оцінку різних носіїв для ексклюзійної хроматографії (гелів сефадексів G-10 (40-120 мк), G-25 (50-150 мк) і G-25 (100-300 мк). Найоптимальніші результати отримано при використанні гелю сефадексу G-25 (100-300 мк). Для контролю за розподілом гексобарбіталу та сполук біологічного походження, що містяться в сечі, і для його кількісного визначення був використаний спектрофотометричний метод. Запропонованим методом можна визначити 21-24% гексобарбіталу, виділеного із сечі.

Ключові слова: барбітурати (гексобарбітал), біологічні об'єкти, виділення, очистка, ексклюзійна хроматографія, спектрофотометричний метод.

О.М. Scherbina , А.О. Bedzay

METHOD OF EXCLUSION CHROMATOGRAPHY IN ANALYSIS OF SOME BARBITURATES IN BIOLOGICAL FLUIDS

Hexobarbital (a derivative of barbituric acid) is used as a medicinal product. It refers to hypnotics of short action. Its uncontrolled use can lead to lethal cases. A method for isolating hexobarbital from urine is proposed, the conditions for purification from impurities of biological origin that are in the braces of biological fluids are selected using sephadex gel exclusion chromatography. A comparative evaluation of various carriers for exclusion chromatography (Sephadex G-10 (40-120 microns), Sephadex G-25 (50-150 microns), and Sephadex G-25 (100-300 microns) was obtained. Optimal results were obtained using Sephadex G-25 (100-300 microns). Spectrophotometric method was used to control the distribution of hexobarbital and compounds of biological origin in urine, and to quantify it. The method is suitable for determining 21-24% of hexobarbital isolated from urine.

Key words: barbiturates (hexobarbital), biological objects, isolation, purification, exclusion chromatography, spectrophotometric method.

Постановка проблеми. Сильнодіючі лікарські засоби є об'єктами хіміко-токсикологічного аналізу. Вони у відносно малих кількостях токсично діють на організм. До таких препаратів належать барбітурати. В медичній практиці застосовується багато похідних барбітурової кислоти. Перший лікарський барбітурат (діетилбарбітурова кислота) був синтезований ще в 1883 р., а з 1903 р. під торговою назвою «Веронал» він почав використовуватися в медицині. 50-60 роки ХХ ст. характеризуються піком зловживання барбітуратами, особливо серед діячів культури, артистів і політиків. Вважається, що від наркотиків цього типу загинуло багато відомих всьому світу людей. Такі отруєння бувають суїцидальні, кримінальні та побутові [1].

Як сильнодіючий препарат (у відповідності з Конвенцією ООН про психотропні речовини 1971 р.) вважається гексобарбітал. Він відноситься до препаратів короткої дії, ефект від якого починається через 15-20 хв після приймання. В великих дозах викликає наркотичну дію, ознаки якої включають ейфорію і агресію. Інші ознаки: зниження температури тіла, наліт на язиці, розлад координації, невпевненість в ходьбі, падіння, багато зайвих рухів. Завершується дія препарату загальною слабкістю і сном. Хронічна інтоксикація розвивається при щоденному прийманні до 0,5 г препарату, що веде до розвитку залежності через 3-4 місяці. При частому прийманні доза препарату сумується, що створює загрозу для здоров'я навіть при застосуванні невеликих разових доз. В важких випадках спостерігаються напади і довгі психози, які переходять в кому внаслідок набряку мозку із смертельним наслідком [2]. Летальна доза гексобарбіталу для людини 11 г. Випадки отруєння ним описані в літературі [3].

Фармакологічні характеристики гексобарбіталу наведені в таблиці 1 [1].

Таблиця 1

Фармакологічні характеристики гексобарбіталу

Речовина	Тип дії	Середня доза, г	Термін дії, год	Початок дії, хв	Виведення з сечею, %	Концентрація в плазмі крові		
						мкг/мл		
						терапевтична	токсична	летальна
Гексобарбітал	VS-S	0,25-0,4	1-4	15	2, незмінена речовина	1-5	8-20	50

Примітка: VS-S – коротка дія

Гексобарбітал (1,5-Диметил-5-(циклогексен)-1-іл)-барбітурова кислота – це білий кристалічний порошок, без запаху і смаку, темп. плавл. 145-147 °С. Розчинний в 3000 частках води, в 250 частках киплячої води, в 45 частках 90% етилового спирту, в 20 частках етеру і в 4 частках хлороформу. Розчинний в розчинах лугів, але не розчинний в розчинах карбонатів лужних металів. Гексобарбітал має ряд синонімів: Barbidorm, Evipal, Evipan, Nexonal, Narcosan, Somnoran та ін. [4].

Аналіз останніх досліджень та публікацій. В літературі містяться дані, що для виявлення гексобарбіталу застосовуються реакції забарвлення і мікрокристалоскопічні, спектральні і хроматографічні методи [5]. Реакції ідентифікації гексобарбіталу, які застосовуються в судово-хімічному аналізі є малоспецифічними, тому важко відрізнити гексобарбітал від інших барбітуратів. Це пов'язане з тим, що в молекулах всіх барбітуратів є однаковий цикл – піримідиновий. Функціональні групи різних барбітуратів не мають виражених хімічних властивостей, які можна було б використати для ідентифікації цих речовин. В зв'язку з обмеженою специфічністю реакцій забарвлення заслуговують на увагу фізико-хімічні методи. До таких методів відносяться методи хроматографії. Для виявлення гексобарбіталу застосовувався метод газової хроматографії [6], хроматографії в тонкому шарі сорбенту [7], для кількісного визначення були використані фотоколориметричні методи [8], для очистки витяжок із біологічного матеріалу – методи екстракції [9].

Широкий асортимент різних за своїми властивостями барбітуратів робить задачу їх дослідження дуже складною, тому необхідно мати доступні і чутливі методики виявлення в біологічних рідинах кожного барбітурату зокрема. При отруєннях гексобарбіталом виникає необхідність у проведенні прижиттєвої лабораторної діагностики з метою надання ефективно кваліфікованої допомоги потерпілим та посмертної діагностики – для встановлення причини смерті. Тому розробка методик хіміко-токсикологічного аналізу гексобарбіталу в біологічних об'єктах є актуальною проблемою.

Мета дослідження. Вивчити можливість застосування методу ексклюзивної хроматографії в поєднанні з спектральними методами для вибору умов виділення, очистки та визначення гексобарбіталу в біологічних рідинах організму з метою використання отриманих даних для досліджень в токсикологічних, судово-хімічних та хімічних лабораторіях.

Виклад основного матеріалу

Застосування методу спектрофотометрії. Для виявлення гексобарбіталу у фракціях елюатів з гелів сефадексів і для його кількісного визначення, виділеного із сечі, ми використали метод УФ-спектрофотометрії. Це метод аналізу, при якому вимірювання оптичної густини проводиться при певній довжині хвилі, а не при інтервалі довжин хвиль, він є чутливим і достовірним. Для зняття спектрів гексобарбіталу готували розчини цього препарату в гарячій воді і в етиловому спирті (20 мкг в 1 мл). До водних розчинів додавали розчин сульфатної кислоти або розчин амоніаку до відповідного рН і вимірювали оптичну густину в діапазоні довжин хвиль від 220 до 350 нм (спектрофотометр СФ-26, кювета 1 см). При довжинах хвиль, що відповідали максимуму світлопоглинання визначали питомий та мольний показники поглинання. Одержані результати аналізу наведені в таблиці 2.

Таблиця 2

Залежність оптичної густини розчинів гексобарбіталу від рН середовища (максимальне значення на згині, середнє значення з 4-х вимірювань)

Довжина хвилі, нм	Оптична густина водних розчинів гексобарбіталу при різних рН					Оптична густина спиртового розчину
	1,6	6,7	10,5	11,6	12,4	
245	0,057	0,050	0,690	0,692	0,690	0,175

З даних, наведених в таблиці 2, можна зробити висновок, що кислі і нейтральні водні розчини, а також спиртові розчини, не мають вираженого максимуму світлопоглинання. Лужні розчини (рН 10,5; 11,6; 12,4) гексобарбіталу поглинають максимальну кількість енергії при 245 нм. У зв'язку з тим, що світлопоглинання розчинів гексобарбіталу залежить від рН середовища і найбільш інтенсивно світлопоглинання відбувається при рН 11,6, при подальших дослідженнях ми вимірювали оптичну густина водних розчинів гексобарбіталу, підлужненого розчином амоніаку до рН 11,6.

Для розрахунку питомого і мольного коефіцієнтів світлопоглинання готували розчини гексобарбіталу різної концентрації, які мали рН 11,6. Оптичну густина цих розчинів вимірювали з допомогою спектрофотометра при 245 нм. Розчином порівняння був 1% розчин амоніаку. Розрахунки питомого коефіцієнта поглинання проводили за формулою:

$$E\ 1\%,\ 1\text{см} = A / L \times C$$

де: А – оптична густина досліджуваних розчинів;

L – товщина шару рідини в см;

C – концентрація гексобарбіталу в грамах в 100 мл розчину.

Величину мольного коефіцієнта поглинання розраховували за формулою:

$$\epsilon = A / L \times C$$

де: А – оптична густина досліджуваних розчинів;

L – товщина шару рідини в см;

C – концентрація гексобарбіталу в молях.

Після статистичної обробки одержаних даних ми дійшли висновку, що світлопоглинання розчинів гексобарбіталу підпорядковується закону Бугера-Ламберта-Бера в межах концентрацій від 10-50 мкг вказаного препарату в 1 мл розчину. В межах вказаних концентрацій $E_{1\%,1\text{см}}$ становить $330 \pm 5,6$, а $\epsilon - 7796 \pm 133,2$. Результати цих розрахунків наведені в таблиці 3.

Таблиця 3

Залежність оптичної густини розчинів від вмісту в них гексобарбіталу

Барбітурат	Довжина хвилі, нм	Концентрація мкг/мл	Оптична густина А*	$E_{1\%,1\text{см}}$	ϵ
Гексобарбітал	245	10	0,326	326	7702
		20	0,680	340	8033
		30	1,000	333	7868
		40	1,340	335	7915
		50	1,650	330	7796

* – кожне значення А є середнім з 4-х вимірювань.

Одержані дані надалі були використані для виявлення гексобарбіталу в окремих фракціях, після елюювання цього препарату із гелів сефадексів і для його кількісного визначення.

Застосування методу гель-хроматографії. Метод гель-хроматографії базується на тому, що на пористих гелях розділяються речовини залежно від розміру і форми молекул та їх хімічного складу. В цьому методі використовуються агарові, поліакриламідні гелі, сефаде-

кси та ін. Сефадекси – це гранульовані, поперечно зшиті декстрини (полісахариди), які отримують шляхом взаємодії лужного розчину декстрану з епіхлоргідрином. Вони в набухломому стані мають гелеву структуру. Принцип методу заснований на різниці в молекулярних масах досліджуваних речовин. Домішки, що містяться у витяжках з досліджуваних об'єктів, як правило, мають більшу молекулярну масу, а значить і розміри молекул, ніж токсикологічно важливі речовини (барбітурати). Тому при пропусканні витяжок через колонки з гелями, барбітурати вимиваються з колонки пізніше, ніж домішки.

В наших дослідженнях ми використали сефадекси марок G-10 (40-120 мк), G-25 (50-150 мк) і G-25 (100-300 мк), як елюент – 0,02 н. розчин сульфатної кислоти. Літературні дані [10] свідчать, що кислоти і луги не руйнують структуру гелів, спирти (метиловий, етиловий) зменшують об'єм гелів, що впливає на їх розподільну властивість. Найкращі результати були одержані при використанні сефадексу G-25 (100-300 мк).

Щоб застосувати гель сефадексу G-25 для відокремлення гексобарбіталу від домішок, необхідно дослідити, в яких фракціях елюатів збираються домішки. Для цього були проведені досліді, при яких до 50 мл сечі, що не містила гексобарбіталу і інших 50 мл сечі, що містила гексобарбітал, додавали 0,02 н. розчин сульфатної кислоти. Суміші настоювали протягом двох годин, центрифугували, 50 мл центрифугату вносили в колонку, заповнену гелем сефадексу G-25, і елюювали 0,02 н. розчином сульфатної кислоти. Елюати збирали фракціями по 10 мл, доводили до рН 11,6 розчином амоніаку і вимірювали оптичну густину спектрофотометричним методом при 245 нм. Ці досліді показали, що домішки виходять з колонки в перших 12 фракціях елюату, а гексобарбітал в наступних 16 фракціях.

Фракції, що містили гексобарбітал, 2 рази екстрагували хлороформом по 100 мл. Хлороформні витяжки об'єднували і хлороформ випалювали насухо. Сухі залишки розчиняли в 20 мл водного розчину (рН 11,6) і вимірювали оптичну густину при 245 нм (спектрофотометр СФ-26, кювета 1см). Ці досліді показали, що гексобарбітал можна виявити в біологічних рідинах (сеча) методом спектрофотометрії в УФ ділянці спектра, оскільки характер спектральних кривих і положення максимумів світлопоглинання чистого гексобарбіталу і виділеного з сечі, збігаються.

Для розрахунку кількісного вмісту гексобарбіталу в досліджуваних пробах ми використали формулу :

$$C = A / L \times E_{1\%, 1\text{см}}$$

де: C – концентрація гексобарбіталу в пробі ;

L – товщина шару рідини в см;

A – оптична густина;

E 1%, 1см – питомий показник поглинання гексобарбіталу.

Результати цих розрахунків показали, що за пропонованою методикою можна визначити 21-24 % гексобарбіталу.

Висновки. На основі проведених досліджень запропонована методика виділення гексобарбіталу з біологічних рідин організму. Методика заснована на ізолюванні гексобарбіталу з сечі 0,02 н розчином сульфатної кислоти (рН 2), очищенні одержаних витяжок з допомогою гелю сефадексу G-25 (100-300 мк) і подальшому спектрофотометричному визначенні. Цим методом можна виявити і кількісно визначити 21-24.% гексобарбіталу, виділеного із сечі. Витяжки з біологічних рідин є чистими, метод не трудомісткий.

Список літератури:

1. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов. Учебное пособие для вузов (под ред. Н.И. Калетиной) // М.: ГЭОТАР – Медиа, 2007. – 1008 с.
2. Могутин Р.И., Кайргалиев Д.В., Лагун В.С. Криминалистическое исследование контролируемых веществ // Таврический научный обозреватель, М. – 2015. – № 2-3. – С. 94-98.

3. Steinbach M. Zur neurologischen Symptomatik der Barbituratvergiftungen. Dtsch. Z. Nervenheilkunde, 1965, 187, 1, 63-73.
4. Государственная фармакопея СССР 11-е издание. – М.: Медицина, 1987. – вып.1. – 384 с.
5. Крамаренко В.П. Токсикологічна хімія. – К.: Вища школа, 1995. – 424 с.
6. Токсикологическая химия. Учебник для вузов (под ред. Т.В. Плетеневой) // М.: ГЭОТАР – Медиа. – 2005. – 512 с.
7. Внуков В.И., Кайргалиев Д.В., Васильев Д.В., Мельников И.Н., Захарченко М.Ю., Тонкослойная хроматография при исследовании наркотических средств // Современные проблемы науки и образования. – 2015.– № 1, ч. 2. – 282 с.
8. Попова В.И., Щербина О.Н. Фотокolorиметрическое определение циклобарбитала и гексобарбитала // Материалы Всесоюзного симпозиума по методам анализа лекарственных средств, Рига, изд-во «Зинатне». – 1969. – С. 114.
9. Щербина О.М., Попова В.И. Экстракция гексобарбиталу органическими розчинниками // Фармацевтический журнал.– 1971.– 26, 1. – С. 76.
10. Детерман Г. Гель-хроматография.– М.: Мир, 1970. – 252 с.

References:

1. Toxicological chemistry. Metabolism and analysis of toxicants. Textbook for high schools (edited by N.I. Kaletina) // М.: GEOTAR – Media, 2007. – 1008 p.
2. Mohutin R.I., Kairgaliev D.V., Lagun V.S. Forensic study of controlled substances // Taurian Scientific Observer, M. – 2015. – No. 2-3. – P. 94-98.
3. Steinbach M. Zur Neurologischen Symptomatik der Barbituratvergiftungen. Dtsch Z. Nervenheilkunde, 1965, 187, 1, 63-73.
4. State Pharmacopoeia of the USSR 11th Edition. – Moscow: Medicine, 1987 – Issue 1. – 384 s.
5. Kramarenko V.P. Toxicological Chemistry. – K. : Higher School, 1995. – 424 pp.
6. Toxicological chemistry. Textbook for high schools (edited by T. V. Pleteneva) // М. : GEOTAR – Media. – 2005 – 512 p.
7. Vnukov V.I., Kairgaliev D.V., Vasiliev D.V., Melnikov I.N., Zakharchenko M.Yu., Thin-Film Chromatography in the Study of Narcotic Drugs // Modern Problems of Science and Education. – 2015. – № 1, part 2. – 282 p.
8. Popova V.I., Shcherbyna O.M. Photocolorimetric pretreatment of cyclobarbital and hexobarbital // Materials of the All-Union Symposium on Methods for the Analysis of Medicinal Products, Riga, issue Zinatne. – 1969. – P. 114.
9. Shcherbyna O.M., Popova V.I. Extraction of hexobarbital with organic solvents // Pharmaceutical Journal. – 1971. – 26, 1. – P. 76.
10. Determan G. Gel-chromatography. – М. : Mir, 1970. – 252 p.

