

Лекция № 4.

Характеристика групп ксенобиотиков, вызывающих одурманивание. Химико-токсикологический анализ производных барбитуровой кислоты и опиатов.

Приказ по МЗ СССР г.Москва

№ 1021 от 25 декабря 1973г

**«О введении нового перечня токсикологических веществ,
подлежащих судебно – химическому исследованию в лабораториях
бюро судебно – медицинской экспертизы»**

1. Группы веществ, на которые должны производиться исследования при общем анализе

1.3. Органические вещества, изолируемые подкисленной водой или подкисленным спиртом, другими органическими растворителями:

Барбитал, фенобарбитал, барбамил, этаминал, циклобарбитал, гексобарбитал, бензонал.

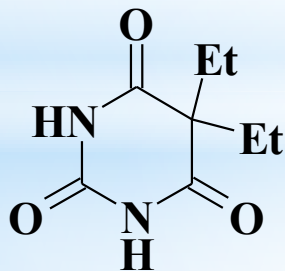
2. Вещества, на которые расширяют общий анализ в зависимости от клинической и секционной картины, результатов гистологического, гистохимического исследования, особенностей течения химических реакций и т. д.

производные барбитуровой и тиобарбитуровой кислот, не указанные в п.1.3;

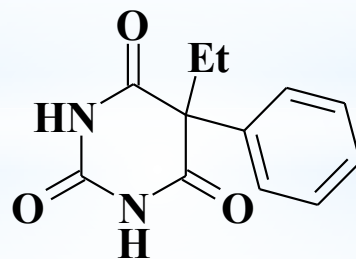
Впервые снотворное действие барбитуратов было обнаружено в начале XX в.

Э.Фишером и Ф.Мерингом. Важным действием барбитуратов на организм является угнетение центральной нервной системы (коры головного мозга и центров ствола мозга).

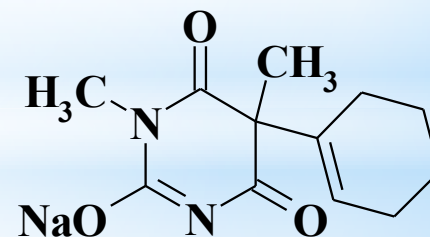
С лечебной целью производные барбитуровой кислоты находят применение в медицинской практике в качестве снотворных и успокаивающих средств. По продолжительности сна, вызываемого барбитуратами, их делят на 3 группы: длительного действия (барбитал, фенобарбитал); средней продолжительности действия (барбамил, этаминал-натрий); короткого действия (гексенал).



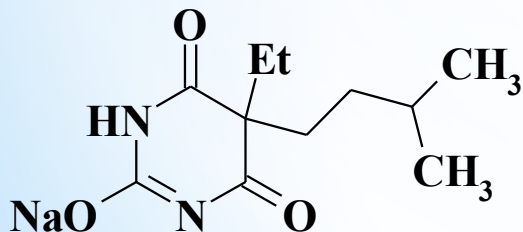
Барбитал



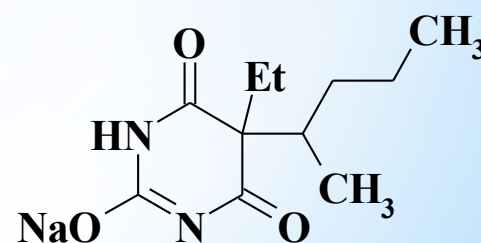
Фенобарбитал



Гексенал



Барбамил



Этаминал-натрий

Токсикологическое значение производных барбитуровой кислоты

- снотворное;
- противосудорожное;
- в составе комбинированных ЛП («Пенталгин», «Андипал», Беллатаминал», «Теофедрин», «Корвалол», «Валокордин»)
- синергизм с алкоголем и др. психоактивными средствами.

Этаминал-натрий и барбамил исключены из Государственного реестра лекарственных средств РФ и внесены в **Список наркотических и психотропных средств, оборот которых в РФ ограничен.**

Злоупотребление барбитуратами приводит к наркомании. Картина опьянения напоминает алкогольное опьянение: приятное ощущение состояния эйфории, общего благополучия. Позже наступает оглушенность, сонливость, вплоть до комы. Состояние барбитуровой абстиненции развивается на следующие сутки и характеризуется мрачным настроением, тревогой, кишечными коликами, атаксией, тремором рук, судорогами, психической опустошенностью. При барбитуровой наркомании возникают психозы с наплывом зрительных и слуховых галлюцинаций угрожающего характера. Токсические дозы барбитуратов вызывают первоначально наркотическое опьянение, затем коматозное состояние, которое осложняется сердечно-сосудистой или дыхательной недостаточностью.

Пути метаболизма производных барбитуровой кислоты

Принимают перорально в виде таблеток, порошков.

Быстро всасываются после орального введения (биодоступность 80-100 %)

Барбитураты **кумуляируют** в организме, и их длительное применение может привести к острым отравлениям, особенно при недостаточной функции почек.

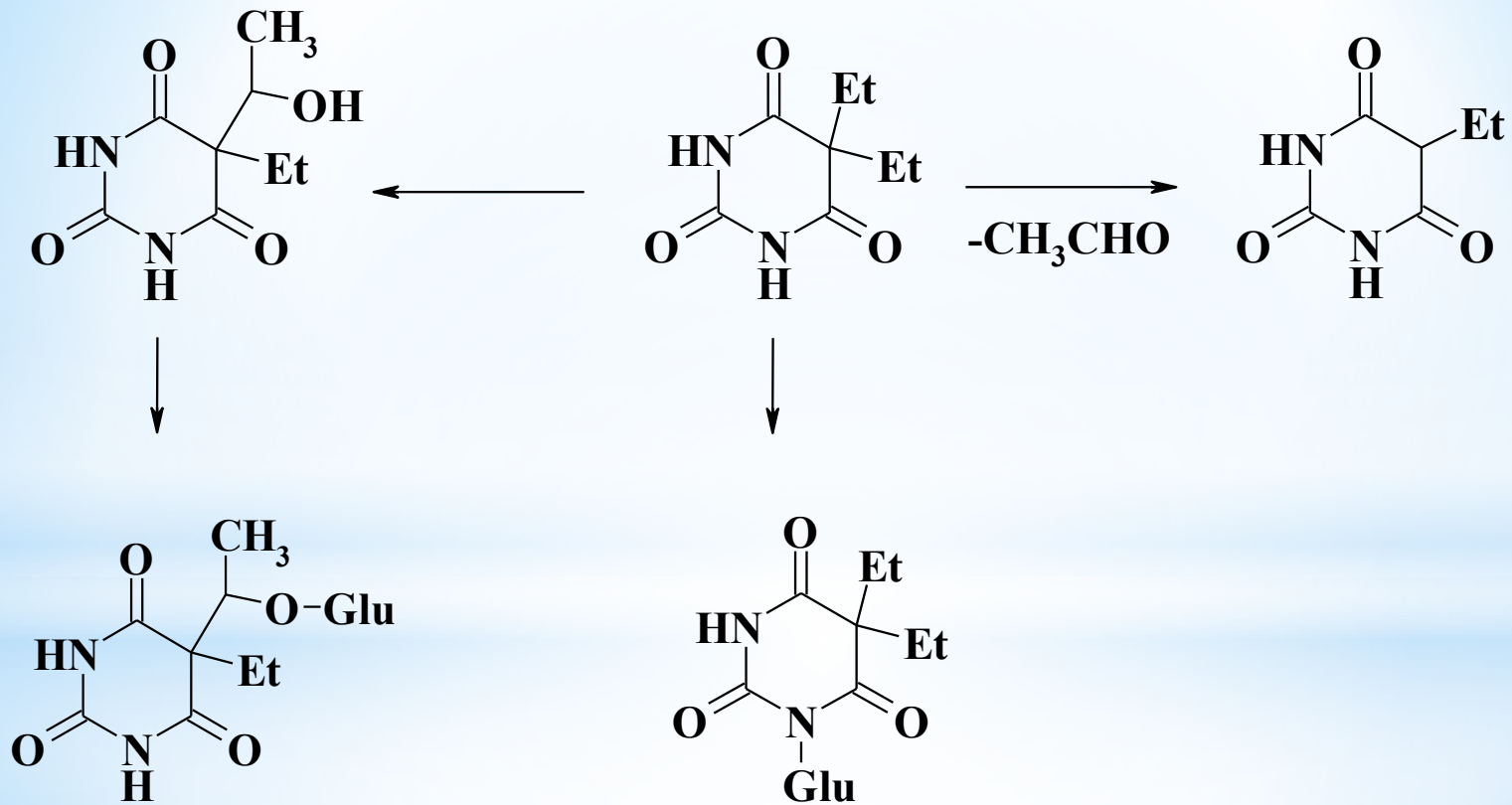
В организме барбитураты подвергаются, в основном в печени, ряду превращений.

К **I фазе метаболизма** относятся следующие процессы:

1. Окисление одного из радикалов в положении 5 до спиртов.
2. Окисление до кислот и кетонов.
3. Десульфирование (тиобарбитураты).
4. Дезалкилирование и дебензоилирование (N-бензоилпроизводные барбитуровой кислоты).
5. Гидролиз.

Во **II фазе метаболизма** образуются конъюгаты нативных барбитуратов и их окисленных производных с глюкуроновой кислотой.

Метаболические превращения барбитала:

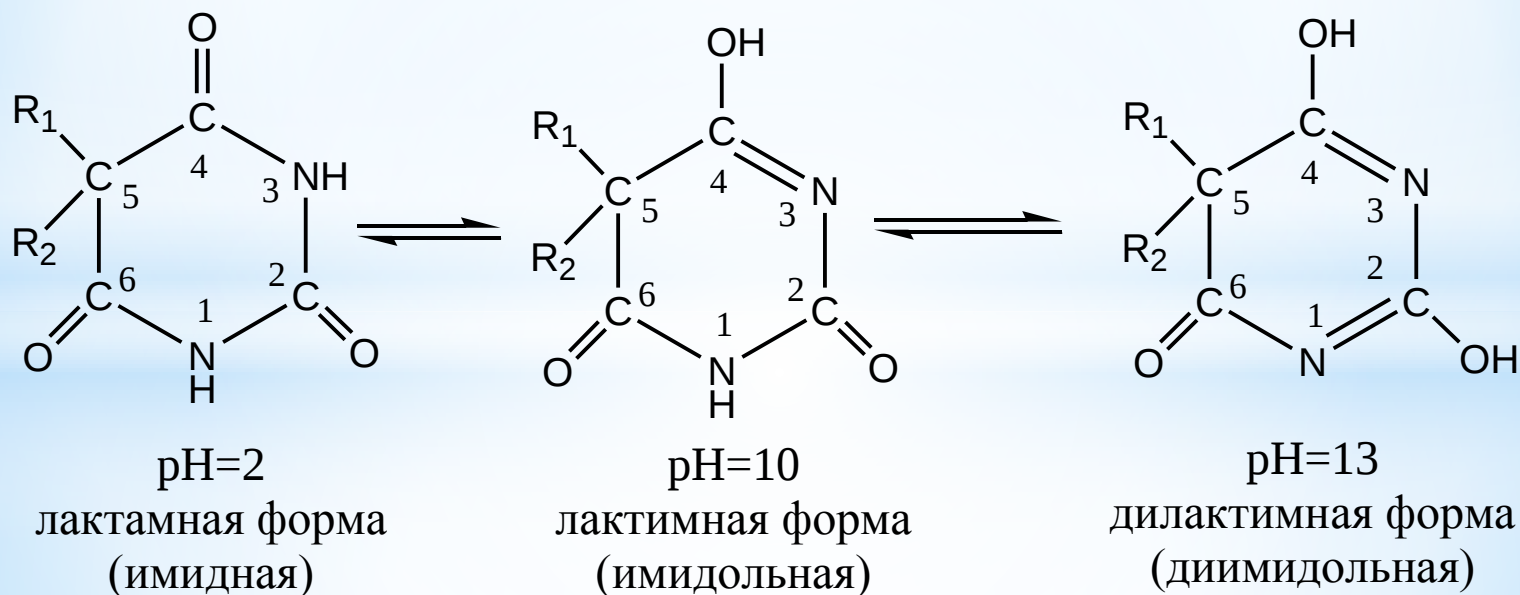


Glu – остаток глюкуроновой кислоты

Барбитураты плохо растворяются в воде, хорошо растворимы в этаноле, хлороформе, эфире, в водных растворах щелочей.

УФ-спектры большинства производных барбитуровой кислоты схожи, они не имеют заметного поглощения в области 200 — 330 нм при кислых и нейтральных значениях рН, но имеют два максимума поглощения при рН 10 (238 — 240 нм) и рН=13 (254 — 256 нм).

Лактим-лактимная таутомерия барбитуратов



Химико-токсикологическое исследование

1. Изолирование из объекта
2. Очистка полученного извлечения
3. Идентификация
4. Количественное определение

Методы изолирования

Общие методы (Швайковой-Васильевой, Стасса-Отто) –
кислое хлороформное извлечение.

Частные методы:

- Метод Вало́ва (подщелоченной водой)
- Метод Швайковой (подкисленной водой, с очисткой
переекстракцией)
- Метод Поповой (водой подкисленной серной кислотой, с
использованием гель-хроматографии)

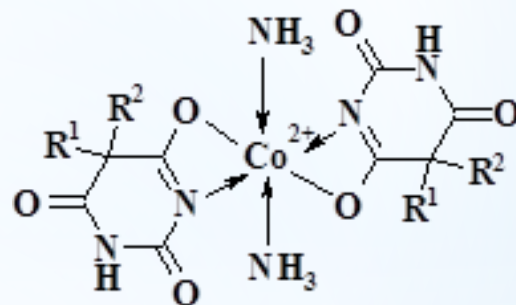
Методы определения

- Цветные и микрокристаллические реакции
- ТСХ в частных системах
- ИК и УФ спектроскопия
- Иммуно-ферментный анализ
- ВЭЖХ и ГЖХ
- Масс-спектрометрия

Цветные реакции:

- Реакция с аммиачным раствором нитрата кобальта.**

К части остатка после испарения хлороформного (эфирного) экстракта, помещенного в фарфоровую чашку, добавляют с помощью стеклянной палочки смесь из 1% спиртового раствора ацетата кобальта и 25% раствора аммиака в соотношении 1:1.

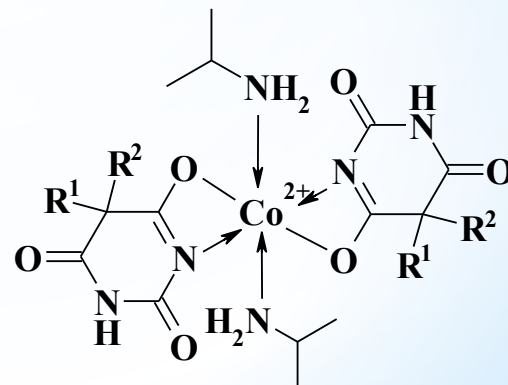


При наличии в остатке производных барбитуровой кислоты появляется красно-фиолетовое окрашивание. Реакция чувствительна. Имеет судебно-химическое значение при отрицательном результате.

- Реакция барбитуратов с изопропиламином и солями кобальта. (Парри)**

К 2 мл хлороформного раствора прибавляют 0,3 мл 1%-го раствора ацетата кобальта в безводном этиловом спирте и 1 мл 5%-го раствора изопропиламина в этиловом спирте.

При наличии барбитуратов появляется фиолетовое окрашивание.



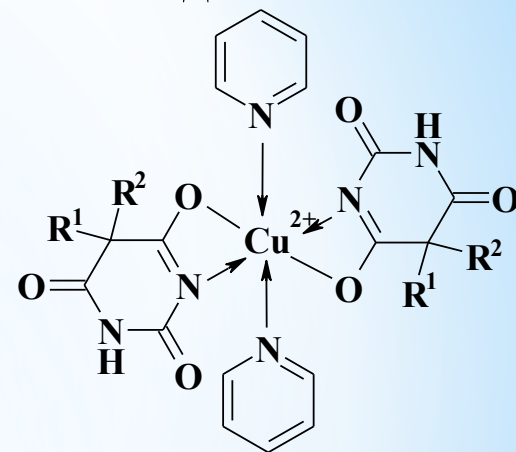
Реакция с меднопиридиновым реактивом (реакция Цвиккера).

К сухому остатку на предметном стекле прибавляют каплю 25% раствора аммиака и каплю меднопиридинового реактива. Стекло помещают во влажную камеру. Через 10-15 мин наблюдают образование сиреневого осадка.

Под микроскопом наблюдают кристаллы в виде

простых и сложных крестов, друз, звездочек и прямоугольников при наличии барбитала.

Реакция чувствительна, является подтверждающей.



Реакция с солями кобальта и щелочами. Исследуемое вещество или остаток, полученный после выпаривания вытяжек из соответствующих объектов, растворяют в 0,2-0,5 мл абсолютного этилового спирта. К этому раствору прибавляют 1-2 капли 1%-го раствора ацетата кобальта в абсолютном этиловом спирте и 1-2 капли 1%-го раствора гидроксида калия в абсолютном этиловом спирте. При наличии барбитуратов появляется розовая или красная окраска.

Метод может быть использован для предварительного обнаружения барбитуратов в моче.

Мурексидная реакция. В фарфоровую чашку к сухому остатку, полученному после выпаривания вытяжек из биологического материала, или к небольшому количеству сухого вещества прибавляют 3 капли 3 %-го раствора пероксида водорода и 3 капли реактива, содержащего соль Мора и хлорид аммония. Содержимое чашки выпаривают, сухой остаток нагревают до появления белых паров. После охлаждения прибавляют 3 капли 6 н. раствора аммиака.

При наличии некоторых барбитуратов и тиобарбитуратов появляется розовая окраска. Мурексидную реакцию дают барбамил, барбитал, фенобарбитал, этаминал-натрий и тиопентал. Не дают этой реакции гексенал, гексобарбитал и циклобарбитал.

Реакция с родамином 6Ж. В делительную воронку вносят 0,1 мл раствора исследуемого вещества, прибавляют 0,2 мл 0,1 %-го раствора родамина 6Ж и 1 мл четыреххлористого углерода. Смесь взбалтывают в течение 1 мин. При наличии солей барбитуратов слой четыреххлористого углерода приобретает светло-оранжевую или оранжево-красную окраску.

Эта реакция пригодна для обнаружения барбамила, гексенала и этаминал-натрия в фармакопейных препаратах и в лекарственных смесях.

Микрокристаллические реакции:

1. Выделение кислотной формы барбитуратов.

На предметное стекло наносят несколько капель раствора барбитурата в хлороформе, который выпаривают при комнатной температуре. Сухой остаток растворяют в одной капле концентрированной серной кислоты. Через 3—5 мин после охлаждения раствора рядом с ним наносят каплю воды. Затем эти капли соединяют при помощи капилляра. Через 10—20 мин (а при малых количествах барбитуратов через 1—2 ч) появляются кристаллические осадки. Для каждого барбитурата кристаллы имеют определенную форму.

2. Реакция с хлорцинкиодом в исследуемом растворе появляются кристаллические осадки.

3. Реакция со смесью растворов хлорида железа и иодида калия. под микроскопом наблюдают форму образовавшихся кристаллов, которые появляются при наличии ряда барбитуратов (барбамил, бутобарбитал, фенобарбитал, этаминал).

4. Реакция с диiodокупратом калия в растворе иода. образуются кристаллические осадки.

5. Реакция с подкисленным спиртовым раствором иодида калия. появляются кристаллические осадки.

Тонкослойная хроматография в частной системе растворителей

- Сорбент – силикагель КСК, забуференный 0,1н раствором борной кислоты.
- Растворители – хлороформ:н-бутанол:25% раствор аммиака (70:40:5)
- Время насыщения камеры парами растворителя – 10 мин
- Высота поднятия фронта растворителя – 10 см
- Обнаружение – дифенилкарбазоном (ДФК) – 0,1% раствор в хлороформе и раствором сульфата ртути – 5% раствор в концентрированной серной кислоте.
- Реакция взаимодействия барбитуратов с солями ртути и дифенилкарбазоном имеет отрицательное судебно-химическое значение, т.е. при отсутствии на хроматограмме красно- или сине-фиолетовых пятен дальнейшее исследование на барбитураты не производят

УФ-спектрофотометрия.

Для регистрации УФ-спектра поглощения остаток после испарения экстракта из водной вытяжки со значением $\text{pH}=2$ растворяют в 5 мл воды очищенной, к которой была добавлена 1 капля 2 М раствора аммиака ($\text{pH}=10$), и измеряют величину светопоглощения полученного раствора в интервале длин волн 210-320 нм. В спектре обнаруживают максимум при 240 нм (лактимная форма барбитурата). При добавлении к этому раствору 1-2 капель 4 М раствора гидроксида натрия ($\text{pH}=13$) в спектре поглощения обнаруживают максимум при 255-260 нм (дилактимная форма барбитурата). Этот метод чувствителен, но требует тщательной очистки извлечений от присутствующих эндогенных примесей.

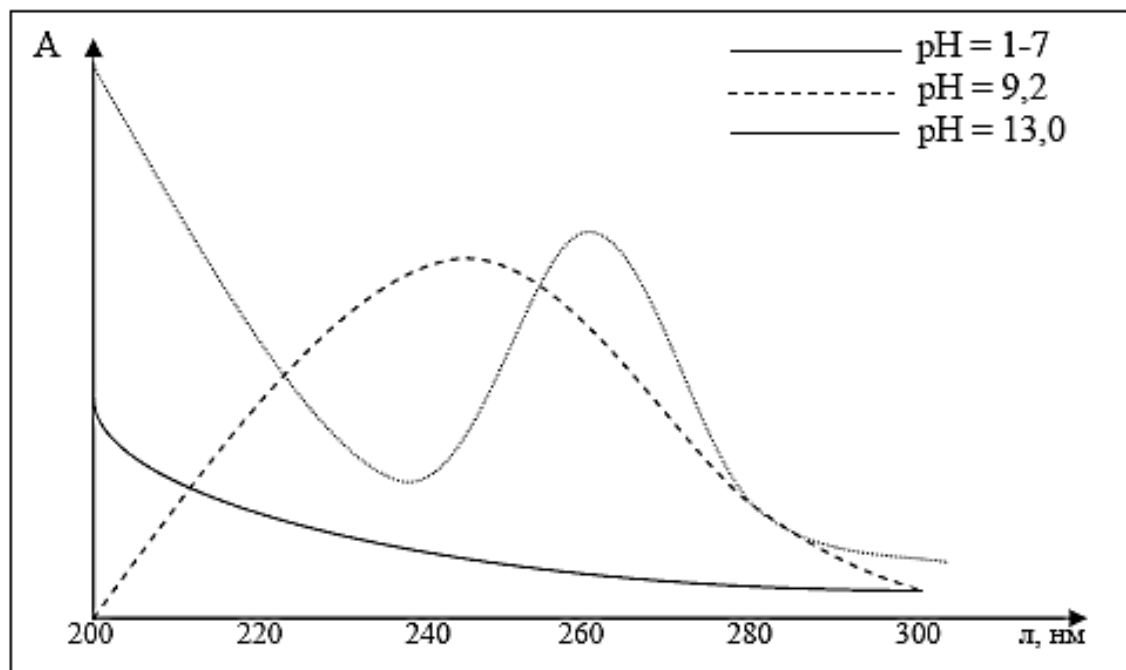


Схема УФ-спектра барбитуратов.

ИК-спектрометрия.

Для регистрации ИК-спектра остаток после органического растворителя растирают с бромидом калия и после прессования помещают в прибор для снятия спектра. Производные барбитуровой кислоты имеют основные характерные для каждого барбитурата волновые числа в ИК спектре.

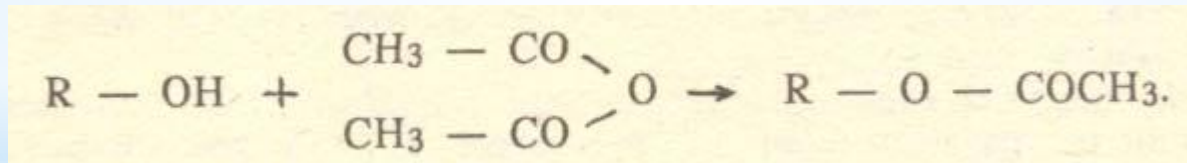
ГЖХ-анализ. Исследуемые вещества выделяют из мочи путем экстракции или сорбции. Для ГЖХ-скрининга достаточно использовать часть извлечения из объекта, которая соответствует по объему 10 мл мочи.

Условия хроматографического анализа: прибор ЛХМ-80, детектор термоаэрозольный (ТАД), термоионный или беспламенный азотно-фосфорный (NPD), колонка стеклянная, силанизированная, длиной 1 м, внутренний диаметр - 2-3 мм, сорбент - 3% SE-30 на хромосорбе W (НР) - 80-100 меш., скорость газа-носителя (азота) для ТАД 45 мл/мин и для NPD - 40 мл/мин (гелия), эффективность колонки 1200 т.т. (ТАД) и 1300 (NPD), температура детектора – 300 °С, температура испарителя 250 °С, температура испарителя по линейной программе от 130 до 290 °С, объем пробы – 2,5 мкл.

Для идентификации хроматографических пиков определяют индекс удерживания (I_x). С этой целью используют в качестве стандартов смесь н-алканов C_nH_{2n+2} с числом атомов углерода от 10 до 32, которым присвоены значения индексов, равные $100n$ (n - число атомов углерода в алкане).

Газовая хроматография в сочетании с масс-спектрометрией.

Метод используется для обнаружения нанограммовых количеств барбитуратов и позволяет вести анализ на фоне эндогенных соединений, выделенных из исследуемого объекта. Для выделения барбитуратов из объекта после гидролиза используют жидкость-жидкостную или твердофазную экстракцию. Концентрирование извлечений проводят упариванием при температуре 40-60 °С. В ряде случаев для повышения летучести проводят дериватизацию с уксусным ангидридом в безводном пиридине (фенобарбитал).



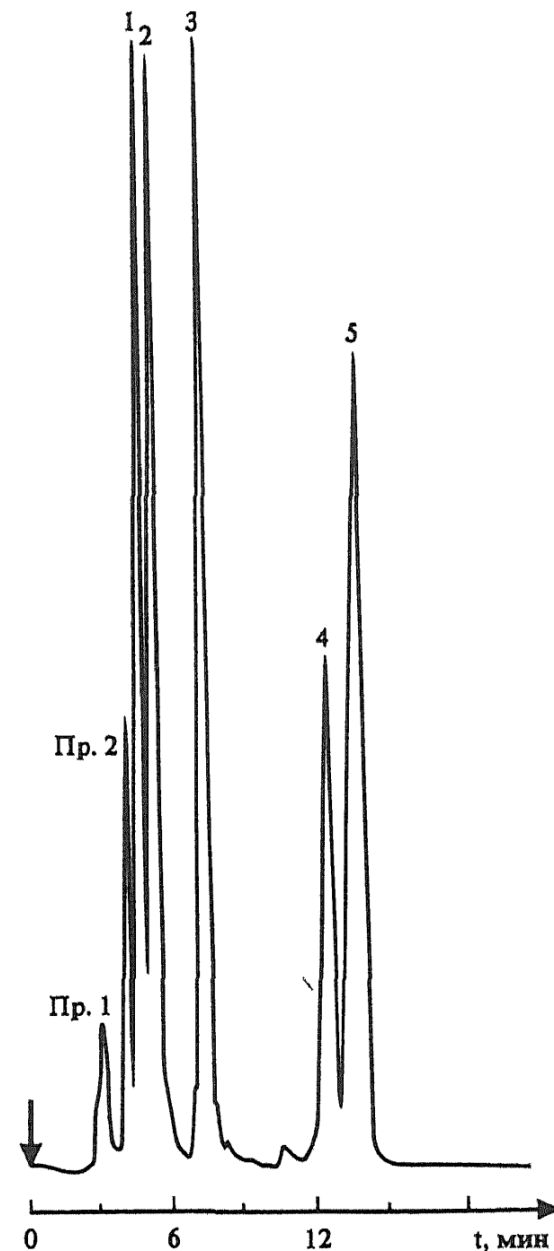
Идентифицируют барбитураты по времени удерживания (для барбитала – 5,18 мин) и по отношению массы ионов к заряду (204 для фенобарбитала).

ВЭЖХ при обнаружении барбитуратов.

Хроматограф «Милихром»,
хроматографическая колонка (62х2 мм), заполненная
обращеннофазовым сорбентом «Сепарон» С18,
подвижная фаза - смесь 0,05 М водного раствора
гидрофосфата аммония и метанола 60:40, скорость
элюирования равна 100 мкл/мин. Сухой остаток
растворяют в 100 мл подвижной фазы и вводят в
хроматограф 4 мкл.

Идентификация барбитуратов,
содержащихся в биопробах, проводится
сопоставлением времени (объема) удерживания и
коэффициента емкости определяемого компонента и
образца сравнения (контрольный раствор)
индивидуальных барбитуратов.

Для количественного определения
барбитуратов в трех вариантах: метод добавок,
метод внешнего стандарта и метод внутреннего
стандарта.



Количественное определение барбитуратов проводится

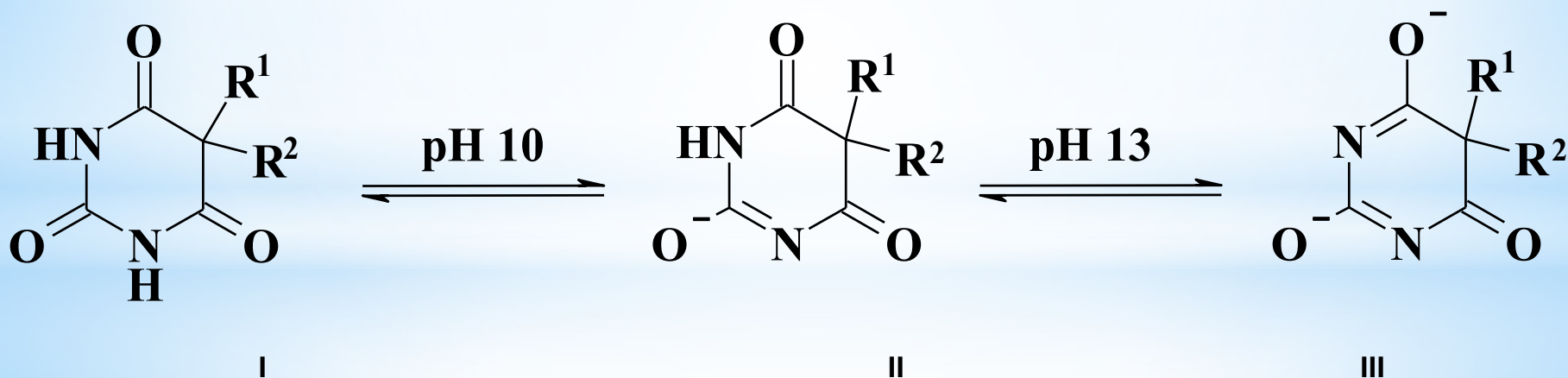
- прямым фотометрическим методом,
- с помощью дифференциальной спектрофотометрии
- и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Фотометрический метод основан на взаимодействии барбитуратов с раствором ацетата кобальта в присутствии изопрпиламина и метанола (метод предложен В.И. **Поповой**). Барбитураты из биологического материала извлекают водой, подкисленной серной кислотой. После очистки с помощью гель-хроматографии проводят концентрирование путем экстракции хлороформом. Хлороформный экстракт выпаривают до сухого остатка. Сухой остаток, в зависимости от обнаруженного барбитурата, растворяют в хлороформе (барбитал, фенобарбитал) или метиловом спирте (барбамил, этаминал). К полученным растворам добавляют по 5 мл 0,125% раствора ацетата кобальта в метиловом спирте и по 1 мл 50% изопрпиламина в метиловом спирте. Оптическую плотность растворов, окрашенных в фиолетовый цвет, измеряют с помощью фотоэлектроколориметра ФЭК-М при зеленом светофильтре в кювете со слоем раствора 20 мм. В качестве раствора сравнения применяют смесь реактивов. Предел обнаружения составляет 0,04-0,08 мг барбитурата в 1 мл исследуемого раствора.

Дифференциальная спектрофотометрия. Количественное

определение проводят по разности величины оптической плотности исследуемого и контрольного опытов. Этот метод приемлем в том случае, когда при различных значениях pH среды изменяется спектр поглощения исследуемого вещества, а спектр поглощения примесей (посторонних экстрактивных веществ) остается без изменений. Такая методика предложена для определения производных барбитуровой кислоты.

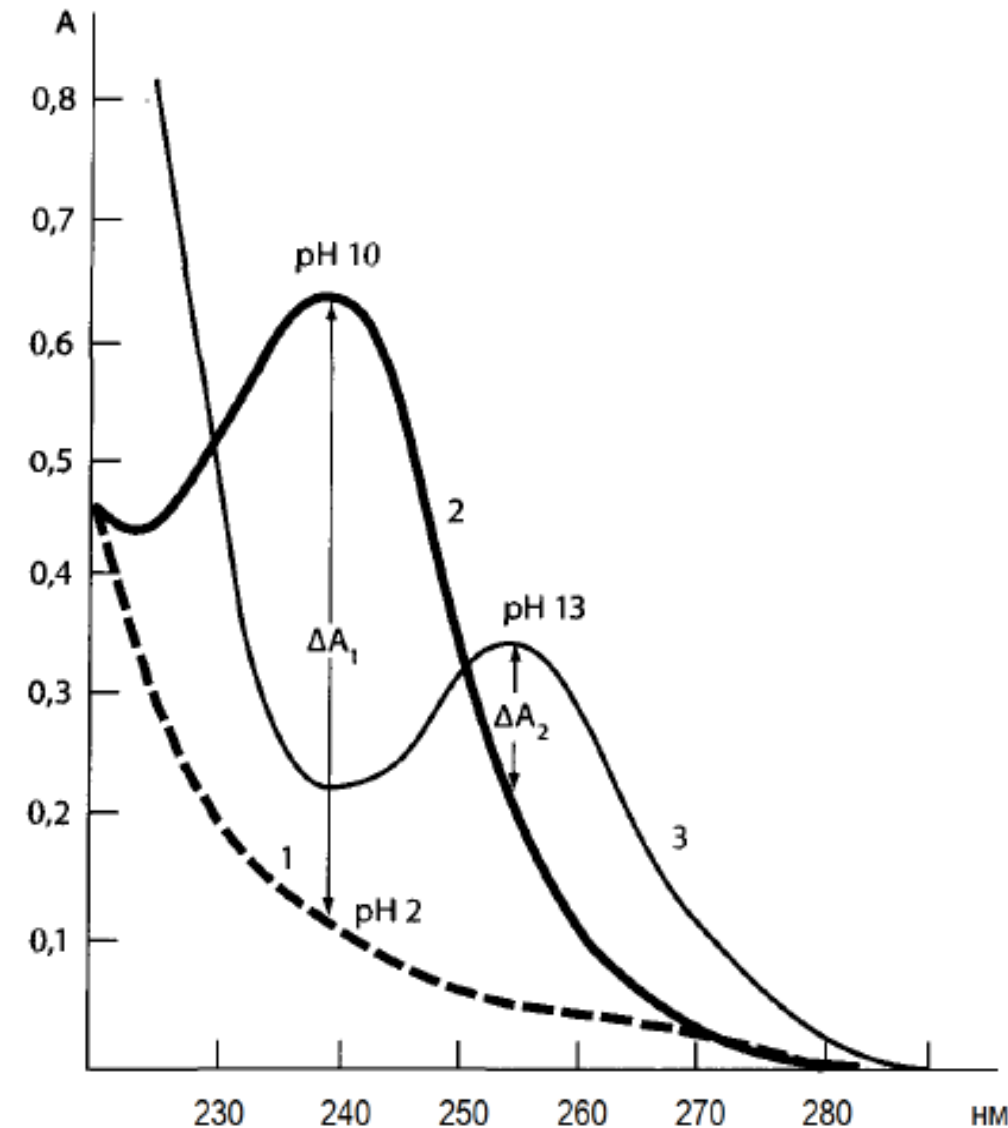
В основу метода дифференциальной спектрофотометрии положена способность барбитуратов к лактим-лактамной (имино-имидольной) таутомерии.



В органическом растворителе после экстракции барбитураты находятся в лактамной форме (I). В этом случае спектр поглощения барбитурата представляет собой ниспадающую кривую в области 220-320 нм. Это связано с тем, что в лактамной форме в молекуле барбитурата отсутствуют сопряженные двойные связи.

При значении $\text{pH} = 10$ барбитураты перейдут в лактимную форму (II). При регистрации спектра такого раствора обнаруживается максимум светопоглощения при 240 нм.

При значении $\text{pH} = 13$ барбитураты перейдут в дилактимную форму (III). Спектр поглощения барбитурата в этом случае имеет полосу с максимумом при 260 нм).



При исследовании **внутренних органов** определяют разницу в оптической плотности **при рН=10 и рН=2** при длине волны **240 нм**.

$$\Delta A_1 = A_{pH=10} - A_{pH=2}$$

При исследовании **биологических жидкостей** определяют разницу в оптической плотности **при рН=13 и рН=10** при длине волны **260 нм**.

$$\Delta A_2 = A_{pH=13} - A_{pH=10}$$

Расчет содержания барбитуратов проводят по удельному показателю поглощения, который рассчитывают при тех же значениях рН для раствора стандартного образца:

$$E_{1\text{ см}}^{1\%} = \frac{\Delta A}{C \times I}$$

Более воспроизводимые результаты получаются в том случае, когда расчеты проводят по стандартному образцу:

$$C_x = \frac{\Delta A_x \times C_{\text{ст}}}{\Delta A_{\text{ст}}}$$

Использование дифференциального варианта спектрофотометрического определения барбитуратов позволяет получить достаточно надежные результаты и исключить влияние посторонних веществ, экстрагируемых в процессе анализа вместе с барбитуратами из раствора при рН = 2-2,5.

Marilyn
Monroe

Спасибо за внимание!



