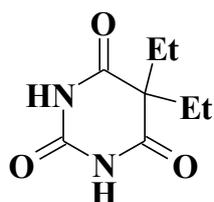
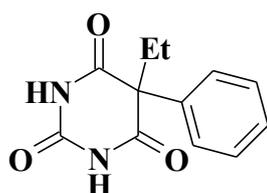


ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРОИЗВОДНЫХ БАРБИТУРОВОЙ КИСЛОТЫ

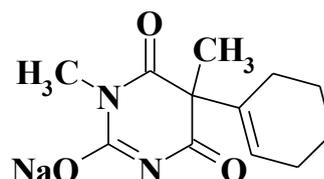
Впервые снотворное действие барбитуратов было обнаружено в начале XX в. Э.Фишером и Ф.Мерингом. Важным действием барбитуратов на организм является угнетение центральной нервной системы (коры головного мозга и центров ствола мозга). С лечебной целью производные барбитуровой кислоты находят применение 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).



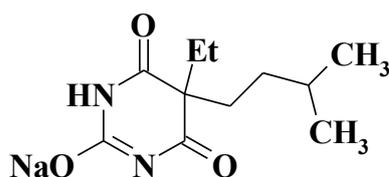
Барбитал



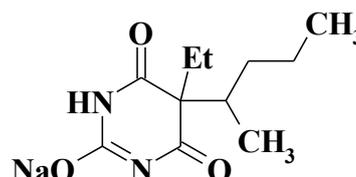
Фенобарбитал



Гексенал



Барбамил



Этаминал-натрий

1. Токсикологическое значение производных барбитуровой кислоты

В настоящее время в медицинской практике находят применение барбитал и фенобарбитал. Барбитал назначают внутрь перед сном по 0,25-0,5 г, фенобарбитал – по 0,1-0,2 г. Фенобарбитал в качестве снотворного средства применяется редко. Его чаще используют как противосудорожный препарат в дозе 0,01-0,03 г 2-3 раза в день. Фенобарбитал входит в состав некоторых готовых лекарственных форм «Пенталгин», «Андипал», «Беллатаминал», «Теофедрин», «Корвалол», «Валокордин», «Барбовал» и др.

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

Барбитал и другие барбитураты используются как вспомогательные средства при общей анестезии и при судорожных состояниях. Барбитураты короткого действия используются в клинической практике в комплексе с другими лекарственными препаратами для ускорения введения в наркоз.

Токсикологическое, судебно-медицинское и химико-токсикологическое значение приобрели барбитал (веронал) и его натриевая соль барбитал-натрий (мединал), фенобарбитал (люминал), гексенал, барбамил, этаминал-натрий (нембутал).

Известно развитие пристрастия к барбитуратам и синергизма при приеме их с другими препаратами. Злоупотребление барбитуратами приводит к наркомании

(особенно барбитал и этаминал-натрия). Картина опьянения напоминает по внешним признакам 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. Резко меняется соматическое состояние, наступает одряхление, снижается давление. Характерны неврологические расстройства - дрожание, атаксическая походка, ослабление многих рефлексов. При барбитуровой наркомании возникают психозы, подобные алкогольным, с наплывом зрительных и слуховых галлюцинаций угрожающего характера. Длительность стадии 2-3 суток. Возможны сумеречные расстройства сознания, связанные с абстиненцией, судорожные припадки, доходящие до эпилептического статуса при отнятии барбитуратов. Отравления барбитуратами встречаются относительно редко. Чаще эти препараты используются с целью самоубийства. Большинство острых отравлений барбитуратами имеют сходную клиническую картину и характеризуются незначительными морфологическими изменениями. Клиническое течение отравления связано с принятой дозой вещества и чувствительностью организма. Токсические дозы барбитуратов вызывают первоначально наркотическое опьянение, затем коматозное состояние, которое осложняется сердечно-сосудистой или дыхательной недостаточностью. Тяжелые отравления характеризуются глубокой комой, редким поверхностным дыханием, слабым пульсом, цианозом. Зрачки у пострадавшего узкие, не реагирующие на свет. В заключительной стадии отравления, вследствие поражения дыхательного центра, дыхание становится неравномерным, после чего наступает его остановка.

Токсическое действие барбитуратов усиливают наркотики, алкоголь, транквилизаторы. Токсическими дозами для барбитала считают 3-4 г, для барбитала – 1-3 г, для фенобарбитала – 0,6-1 г; смертельными – 6-10, 4-6 и 4-10 г соответственно.

Патологоанатомическая картина при отравлении барбитуратами нехарактерна. При вскрытии в головном мозге обнаруживают точечные кровоизлияния, дегенеративные изменения и некрозы в подкорковых центрах. В ряде случаев на коже обнаруживают характерные пузырьки различной величины с резко очерченными границами, наполненные желтовато-коричневой жидкостью. Они появляются в течение 24 ч после приема яда, что связано с токсическим поражением капилляров кожи.

Данные о сохранности в трупe производных барбитуровой кислоты разноречивы. Одни авторы считают, что барбитал сохраняется в трупe около месяца, другие исследователи утверждают, что этот срок составляет до 1-2 лет.

1. Пути метаболизма производных барбитуровой кислоты

Обычно барбитураты принимают перорально в виде таблеток, порошков. Большинство барбитуратов всасываются в ЖКТ достаточно быстро, фенобарбитал всасывается относительно медленно, его биодоступность составляет 80%. Барбитураты способны кумулировать в организме, и их длительное применение может привести к острым отравлениям, особенно при недостаточной функции почек.

В организме человека и животных барбитураты подвергаются, в основном в печени, ряду превращений. К I фазе метаболизма относятся следующие процессы:

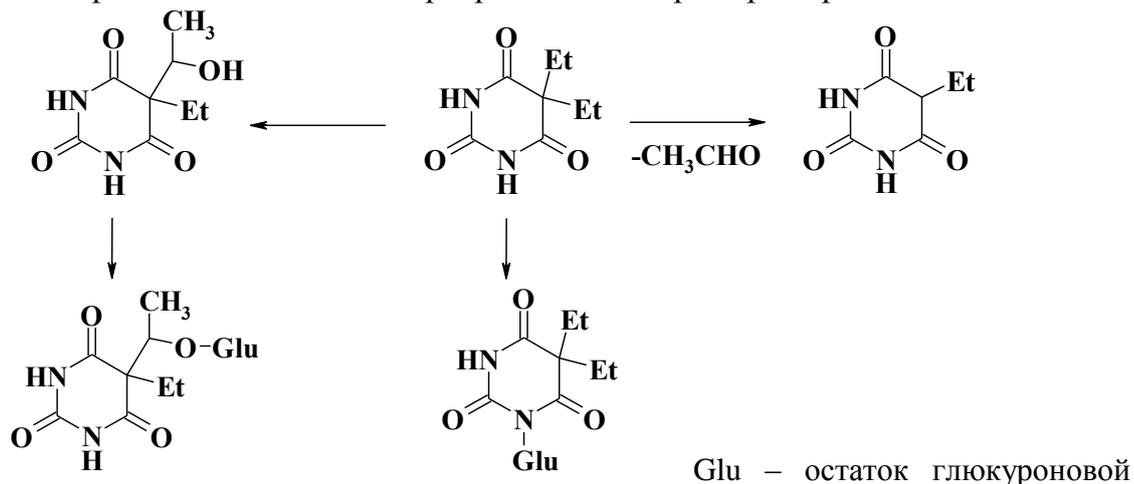
1. Окисление одного из радикалов в положении 5 до спиртов.

2. Окисление до кислот и кетонов.
3. Десульфирование (тиобарбитураты).
4. Дезалкилирование и дебензоилирование (N-бензоилпроизводные барбитуровой кислоты).
5. Гидролиз.

Барбитал и фенобарбитал метаболизируются на 15%, этаминал и барбамил – на 90%. Остальная часть выводится почками в неизменном виде. Процесс разрушения пиримидинового цикла идет в незначительной степени на 8%.

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

Рассмотрим метаболические превращения на примере барбитала:



кислоты

2. Методы изолирования

Для выделения барбитуратов из биологического материала долгое время применялись общие методы, которые были разработаны для выделения алкалоидов (методы Стаса-Отто, Васильевой). Однако в последние десятилетия предложен ряд специальных методов (Швайковой, Валова, Поповой).

Метод Стаса-Отто. Биологический материал несколько раз настаивают с этиловым спиртом, подкисленным щавелевой кислотой. Полученные кислые спиртовые вытяжки сливают с твердых частиц биологического материала и фильтруют. Профильтрованные спиртовые вытяжки упаривают до густоты сиропа, прибавляют абсолютный (или 96°) этиловый спирт, осаждающий примеси белковых и других веществ в виде хлопьев. Эти хлопья отфильтровывают. Фильтр промывают этиловым спиртом. Фильтрат и этиловый спирт, взятый для промывания фильтра, соединяют и снова выпаривают до густоты сиропа, а затем примеси осаждают этиловым спиртом. Эту операцию повторяют несколько раз (до тех пор, пока из сиропообразной жидкости не прекратится осаждение примесей этиловым спиртом). Кислые спиртовые вытяжки, из которых осажены белковые и другие вещества, разбавляют водой и взбалтывают с диэтиловым эфиром, в который переходят примеси, неосаждающиеся абсолютным этиловым спиртом. Освобожденные таким образом от примесей кислые спиртовые вытяжки из биологического материала подщелачивают карбонатом натрия или аммиаком и взбалтывают с диэтиловым эфиром, в который переходят азотистые основания. Затем эфирные вытяжки выпаривают, а полученные остатки подвергают анализу.

Метод Васильевой. Трупный материал измельчают и заливают водой, подкисленной щавелевой кислотой. Вытяжку процеживают через марлю. Процеженную кислую водную вытяжку взбалтывают с хлороформом, который отделяют от водной фазы. После этого кислую водную вытяжку подщелачивают и взбалтывают с хлороформом. В хлороформной вытяжке определяют наличие токсикантов.

Метод Швайковой. В коническую колбу или стакан вносят 100 г тщательно измельченных органов трупов, прибавляют 200 мл воды, подкисляют насыщенным водным раствором щавелевой кислоты до $\text{pH} = 2$ (по универсальному индикатору) и оставляют на 2 ч при частом перемешивании. Затем содержимое колбы переносят в стакан для центрифугирования вместимостью 500 мл и центрифугируют в течение 30 мин (3000 об/мин). Центрифугат сливают с осадка и процеживают через ватный тампон. Процеженную жидкость собирают в делительную воронку и проверяют pH этой жидкости. В случае необходимости доводят до $\text{pH} = 2$. Содержимое делительной воронки взбалтывают с тремя порциями хлороформа (по 20, 15 и 15 мл) в течение 5 мин. Если образуется эмульсия, то ее разрушают центрифугированием.

Хлороформные вытяжки соединяют, доводят хлороформом до 50 мл и переносят в делительную воронку, в которую прибавляют 25 мл 0,1 н. раствора гидроксида натрия, и взбалтывают. Водную фазу отделяют от хлороформной вытяжки. Эту вытяжку взбалтывают с двумя порциями воды по 1,5 мл. Первую и вторую порции воды (по 1,5 мл), которыми промывали хлороформные вытяжки, присоединяют к щелочной водной фазе. Потом водную фазу подкисляют соляной кислотой до $\text{pH} = 2$, вносят в делительную воронку и взбалтывают с двумя новыми порциями хлороформа (по 20 мл) в течение 5 мин. Хлороформные вытяжки соединяют и доводят хлороформом до 50 мл. В них определяют наличие и количественное содержание барбитуратов.

Метод Поповой. Биологический материал настаивают с водой, подкисленной серной кислотой ($\text{pH} = 2-3$). Полученные вытяжки освобождают от примесей методом гель-хроматографии. Для этой цели используется гель сефадекса $G = 25$.

В стакан вносят 100 г измельченного биологического материала, прибавляют 80 мл 0,02 н. раствора серной кислоты, перемешивают и проверяют pH среды. При необходимости смесь доводят до $\text{pH} = 2-3$ (по универсальному индикатору) 30%-м раствором серной кислоты. Смесь биологического материала и подкисленной воды настаивают в течение 2 ч при частом перемешивании. Затем вытяжку сливают, а биологический материал еще 2 раза настаивают с новыми порциями 0,02 н. раствора серной кислоты (по 80 мл) в течение 1 ч. Кислые водные вытяжки соединяют, процеживают через сложенную в три слоя марлю и центрифугируют в течение 25-30 мин.

Надосадочную жидкость (центрифугат) сливают с осадка и очищают от примесей методом гель-хроматографии. Этот метод обеспечивает хорошую очистку барбитуратов, выделенных из биологического материала.

После очистки вытяжек из биологического материала с помощью метода гель-хроматографии получают большие объемы элюатов, в одном миллилитре которых содержатся малые количества барбитуратов. Поэтому барбитураты, находящиеся в элюатах, подвергают экстракционному концентрированию. С этой целью объединенные кислые элюаты 3 раза взбалтывают с новыми порциями хлороформа (по 50 мл) в течение 7 мин. Хлороформные вытяжки, полученные после каждой экстракции, соединяют и на водяной бане при $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ отгоняют из них 120-130 мл

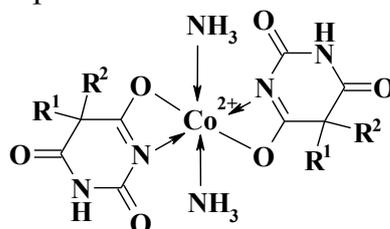
хлороформа. Оставшуюся упаренную хлороформную вытяжку при комнатной температуре выпаривают досуха. Сухие остатки используют для идентификации и количественного определения барбитуратов при помощи соответствующих реакций и методов.

Метод Валова. Метод изолирования подщелоченной водой. В стакан или в коническую колбу вносят 100 г измельченного биологического материала, прибавляют 180 мл воды и 20 мл 10 %-го раствора гидроксида натрия. Содержимое стакана (или колбы) оставляют на 30 мин при частом перемешивании, а затем центрифугируют в течение 30 мин (3000 об/мин). От осадка отделяют надосадочную жидкость (центрифугат), к которой прибавляют 120 мл 10 %-го раствора вольфрамата натрия и 1 н. раствор серной кислоты (до pH = 2). Жидкость нагревают на кипящей водяной бане в течение 20 мин, а затем подвергают центрифугированию (30 мин). Центрифугат сливают с осадка и процеживают через ватный тампон, смоченный водой. Процеженную жидкость собирают в делительную воронку. Тампон промывают водой (10 мл). Промывную воду тоже выливают в делительную воронку. К процеженной жидкости прибавляют равный объем диэтилового эфира и взбалтывают в течение 15 мин. Эфирный слой отделяют и взбалтывают с 50 мл 10 %-го раствора гидроксида натрия.

Щелочной водный слой отделяют, подкисляют 25 %-м раствором серной кислоты до pH = 2 и взбалтывают с равным объемом диэтилового эфира. Полученную при этом эфирную вытяжку используют для обнаружения и количественного определения барбитуратов.

3. Методы определения

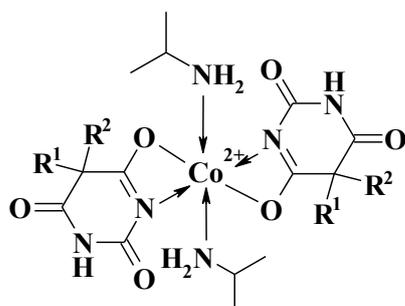
Реакция с аммиачным раствором нитрата кобальта. К части остатка после испарения хлороформного (эфирного) экстракта, помещенного в фарфоровую чашку, добавляют с помощью стеклянной палочки смесь из 1% спиртового раствора ацетата кобальта и 25% раствора аммиака в соотношении 1:1.



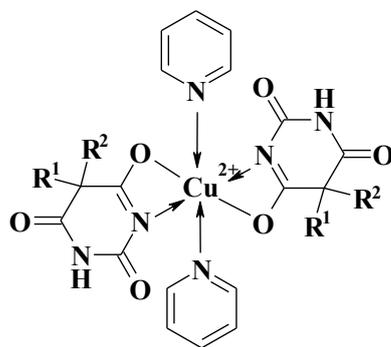
При наличии в остатке производных барбитуровой кислоты появляется красно-фиолетовое окрашивание.

Реакция чувствительна. Имеет судебно-химическое значение при отрицательном результате.

Реакция барбитуратов с изопропиламином и солями кобальта. К 2 мл хлороформного раствора исследуемого вещества 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.



Чувствительность реакции для барбитала составляет 13,7 мкг при разведении 8:10000. Фенобарбитал, барбамил, этаминал характерных кристаллов с меднопиридиновым реактивом не образуют. 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.

Выполнению этой реакции мешает вода, которая разлагает окрашенное соединение. Поэтому при выполнении указанной реакции используют реактивы, растворенные в абсолютном этиловом или метиловом спирте. Оттенок и интенсивность окраски зависят от применяемого спирта, что объясняется различной сольватирующей способностью образовавшихся соединений этими спиртами. Метод может быть использован для предварительного обнаружения барбитуратов в моче. Указанную реакцию дают некоторые гидантоины, сульфаниламидные препараты, пурины, пиримидины и др.

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 (к 0,1 г соли Мора прибавляют 0,5 мл 25 %-го раствора соляной кислоты, а затем воду до 100 мл; к 5 мл полученного раствора прибавляют 4 г хлорида аммония и воду до 100 мл). 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.

Реакция обнаружения кислотной формы барбитуратов. На предметное стекло наслаивают экстракт путем его последовательного испарения. Полученный сухой остаток растворяют в капле концентрированной серной кислоты. Рядом наносят 1 каплю воды очищенной, после чего обе капли осторожно соединяют с помощью тонкой стеклянной палочки. Через 10-20 мин (иногда через 60 мин и даже через 3 сут.) при хранении стекла во влажной камере наблюдают образование кристаллического осадка (под микроскопом) с характерной для каждого барбитурата формой кристаллов.

Барбитал кристаллизуется в виде бесцветных прозрачных прямоугольных призм. Фенобарбитал образует сфероиды и сростки в виде «снопов», «ежей», состоящих из тонких бесцветных игольчатых кристаллов. Барбамил образует прозрачные шестиугольные пластинки и длинные призмы, группирующиеся в сфероиды. Этаминал кристаллизуется в виде характерных сростков из призматических кристаллов.

Эта реакция характеризуется высокой специфичностью, но низкой чувствительностью. Реакция приемлема при относительно больших количествах барбитуратов

Реакция с хлорцинкйодом. На предметное стекло наносят экстракт и испаряют досуха. К сухому остатку прибавляют 1 каплю раствора хлорцинкйода. Стекло помещают во влажную камеру. Через 10-15 мин наблюдают под микроскопом характерную форму образовавшихся кристаллов.

С хлорцинкйодом этаминал образует сростки из окрашенных в коричневый или оранжево-коричневый цвет призматических кристаллов. Барбитал образует прямоугольные пластинки темно-красного, зеленого, фиолетового, серо-розового цветов. Барбамил образует пластинки, окрашенные в красный, оранжевый цвет или сростки из них. Фенобарбитал с хлорцинкйодом кристаллов не образует. Реакция чувствительна, является подтверждающей.

Реакция с подкисленным спиртовым раствором йодида калия. На сухой остаток на предметном стекле наносят каплю реактива и помещают во влажную камеру. Через 5-10 мин наблюдают образование характерного кристаллического осадка.

Барбитал образует прямоугольные пластинки, окрашенные в красный, зеленый, серо-зеленый цвет, часто с рассеченными концами. Этаминал образует оранжевые призматические кристаллы, собранные в сростки. Реакция чувствительна, позволяет обнаружить в пробе до 0,5 мкг барбитуратов, является

подтверждающей. Фенобарбитал и барбитал с подкисленным спиртовым раствором йодида калия кристаллического осадка не образуют.

Реакция со смесью растворов хлорида железа (III) и йодида калия (железйодидной комплексной солью). На сухой остаток на предметном стекле наносят каплю реактива и стекло выдерживают во влажной камере 10-15 мин. Под микроскопом наблюдают образование кристаллов в виде призм и сростков из них. Кристаллы характерной формы образуют барбитал, этаминал, фенобарбитал. Барбитал с железйодидным реактивом характерных кристаллов не образует. Реакция чувствительна, является подтверждающей.

Реакция с динодокупратом калия в растворе иода. К 3 мл 10 %-го раствора хлорида железа (III) прибавляют 1 мл концентрированной соляной кислоты и 3 г йодида калия, а затем прибавляют воду до 10 мл. Через сутки реактив сливают с осадка и сохраняют в склянке из темного стекла. На предметное стекло к сухому остатку, полученному после выпаривания раствора исследуемого вещества, прибавляют каплю реактива. При наличии барбитуратов (барбитал, бутобарбитал, этаминал) образуются кристаллические осадки.

Тонкослойная хроматография в частной системе растворителей. Метод очистки и идентификации барбитуратов. Чаще всего для очистки барбитуратов используют сочетание экстракции с хроматографией в тонком слое. Например, проводят реэкстракцию барбитуратов из «кислой» хлороформной вытяжки в 0,1 н. раствор едкого натра, а затем, после подкисления до $pH = 2,0$ соляной кислотой, вновь в хлороформный слой (2 порции по 20 мл). Хлороформные вытяжки объединяют, доводят (в мерной колбе) до 50 мл и подвергают качественному и количественному анализу после хроматографирования в тонком закрепленном слое силикагеля КСК на пластинках размером 9×12 см.

Система растворителей: хлороформ–н-бутанол–25% водный аммиак 70:40:5. Длина пробега фронта растворителя – 10 см; время хроматографирования 45-60 минут.

Для предварительного обнаружения барбитуратов 2 мл хлороформной вытяжки упаривают до 0,25 мл и количественно наносят в виде точки на стартовую линию хроматографической пластинки. На расстоянии 2 см от этой точки на ту же стартовую линию наносят по 0,02 мл (20 мкг) метаноловых растворов барбитала, фенобарбитала и этаминала натрия – свидетели (метчики). Обнаружение на пластинке производят опрыскиванием 0,01% раствором дифенилкарбазона в хлороформе, а затем 5% раствором $HgSO_4$, наблюдая красно- или сине-фиолетовые пятна в зоне расположения барбитуратов.

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. При получении пятен и соответствующем значении R_f проводится повторное хроматографирование больших объемов хлороформных экстрактов из кислых растворов для дальнейшего качественного обнаружения барбитурата и его количественного определения.

Для качественного анализа 10-20 мл хлороформного извлечения упаривают до 0,5 мл и наносят на новую хроматографическую пластинку в виде полосы длиной 3-4 см. Метчик 0,5-2 мл извлечения. Хроматографируют при описанных выше условиях. Часть пластинки со свидетелем проявляют 0,02% раствором дифенилкарбазона и сульфата ртути (II). С другой половины пластинки параллельно

проявленным пятнам снимают участок сорбента площадью 4-5 см², на фильтре промывают 5 мл смеси спирта и эфира в соотношении 1:1 и подвергают исследованиям на тот или иной барбитурат (ориентирует предварительное исследование и соответствующее значение R_f) микрокристаллическими реакциями.

Для количественного определения барбитурата аналогичным путем подвергают хроматографированию 5-10 мл хлороформного раствора, с той только разницей, что элюирование производится 2 раза по 10 мл (настаивание 5 минут) боратым буфером рН = 10,0 (для внутренних органов трупа). Элюаты отфильтровывают под вакуумом, доводят буфером до объема 25 мл и исследуют спектрофотометрически.

УФ-спектрофотометрия. Для регистрации УФ-спектра поглощения остаток после испарения экстракта из водной вытяжки со значением рН=2 растворяют в 5 мл воды очищенной, к которой была добавлена 1 капля 2 М раствора аммиака (рН=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 (рН=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.

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 (HP) - 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 n-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). Расчет проводят по формуле:

$$I_x = 100n + (I_{n+1} - I_n) \times \frac{\lg t_x - \lg t_n}{\lg t_{n+1} - \lg t_n},$$

где I_x – индекс удерживания анализируемого вещества; t_x, t_n, t_{n+1}, – исправленное время удерживания неизвестного вещества (t_x) и ближайших к нему реперных n-алканов с числом атомов углерода n (t_n) и n+1 (t_{n+1}); I_{n+1} и I_n - индексы удерживания n-алканов.

Индексы удерживания и предел обнаружения барбитуратов методом ГЖХ приведены в таблице 1.

Таблица 1. Индексы удерживания и предел обнаружения барбитуратов методом ГЖХ.

Барбитурат	Индекс удерживания	Предел обнаружения в моче, мкг/мл	
		NPD	ТАД
Барбамил	1732	0,6	0,10
Барбитал	1490	0,6	0,10
Бутобарбитал	1680	0,6	0,10
Фенобарбитал	1974	0,8	0,15
Этаминал	1743	0,6	0,10

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. Барбитураты извлекают из биологических объектов при pH = 1-2 хлороформом, смесью хлороформ - изопропанол 9:1 или диэтиловым эфиром. Предварительно рекомендуется при анализе мочи провести кислотный гидролиз для разрушения метаболитов - глюкуронидов.

Для обнаружения с помощью ВЭЖХ рекомендованы следующие условия: хроматограф «Милихром», хроматографическая колонка (62x2 мм), заполненная обращеннофазовым сорбентом «Сепарон» С18 (5 мкм), 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 следующим образом:

1. Сопоставляются время (объем) удерживания и коэффициент емкости определяемого компонента и образца сравнения (контрольный раствор) индивидуальных барбитуратов;

2. Сравняются УФ-спектры предполагаемого компонента и образца сравнения;

3. Оценивается совпадение значений времени удерживания определяемого компонента и образца сравнения при добавлении контрольного раствора в раствор экстракта из биопробы (концентрация образца сравнения должна быть близка к концентрации определяемого компонента);

4. Сопоставляются УФ-спектры определяемого компонента и образца сравнения при двух длинах волн, и оценивается их спектральное отношение.

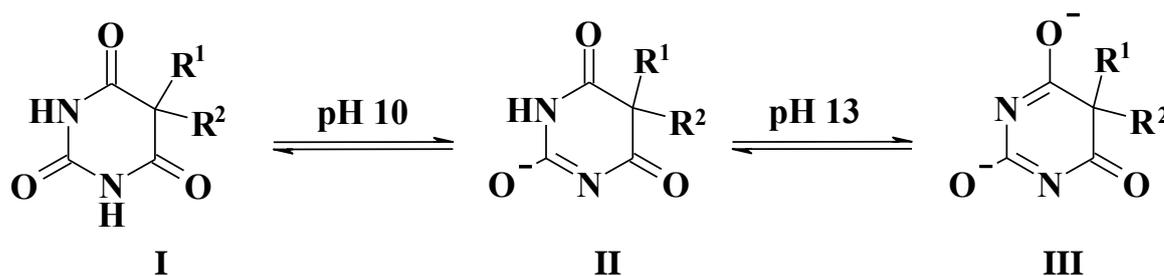
4. Количественное определение

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 изопропиламина 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, этамиал). К полученным растворам добавляют по 5 мл 0,125% раствора ацетата кобальта в метиловом спирте и по 1 мл 50% изопропиламина 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 рН 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-лактамно́й (ими́до-ими́дольно́й) таутомерии.



В органическом растворителе после экстракции барбитураты находятся в лактамной форме (I). В этом случае спектр поглощения барбитурата представляет собой ниспадающую кривую 1 (рис. 1) в области 220-320 нм. Это связано с тем, что в лактамной форме в молекуле барбитурата отсутствуют сопряженные двойные связи.

При значении рН = 10 барбитураты перейдут в лактимную форму (II). При регистрации спектра такого раствора обнаруживается максимум светопоглощения при 240 нм (см. рис. 1, кривая 2).

При значении $pH = 13$ барбитураты перейдут в дилактимную форму (III). Спектр поглощения барбитурата в этом случае имеет полосу с максимумом при 260 нм (см. рис. 1, кривая 3).

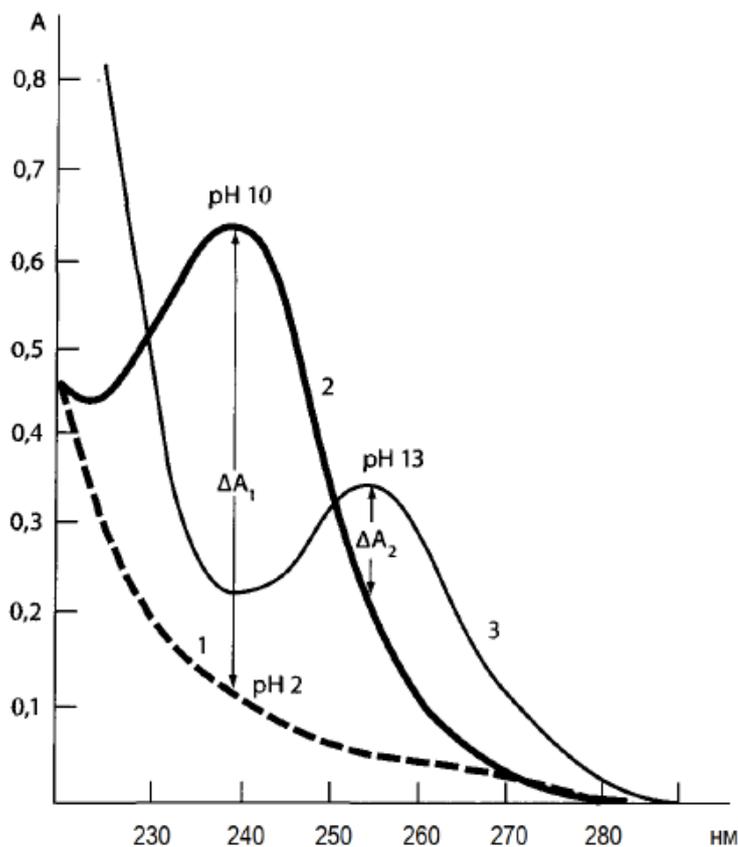


Рисунок 1. Спектры поглощения барбитуратов при различных значениях pH среды.

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

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

При исследовании биологических жидкостей определяют разницу в оптической плотности при $pH=13$ и $pH=10$ 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 pH для раствора стандартного образца:

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

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 pH = 2-2,5.

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Для количественного определения барбитуратов и других токсических веществ высокоэффективная жидкостная хроматография находит применение в трех вариантах: метод добавок, метод внешнего стандарта и метод внутреннего стандарта.

Метод добавок. Для выделения токсических веществ из мочи используют жидкость- жидкостную экстракцию. Анализ ведут с двумя пробами мочи. С помощью ВЭЖХ проводят анализ экстракта из одной пробы мочи и экстракта из второй пробы мочи с добавлением в нее определенного количества вещества (эталонного раствора), обнаруженного при качественном анализе. Расчет количества найденного вещества в экстракте из мочи ведут по формуле:

$$C_x = \frac{C_d \times V_d}{V_x + V_d} \times \frac{h_x}{h_{x+d} - h_x},$$

где C_x - концентрация найденного вещества в экстракте из мочи; C_d - концентрация добавленного вещества в растворе подвижной фазы; V_d - объем добавленного эталонного раствора; V_x - объем экстракта мочи с обнаруженным веществом; h_x - высота сигнала определяемого вещества в экстракте из мочи; h_{x+d} - высота сигнала экстракта из мочи с добавкой эталонного раствора.

Метод внешнего стандарта. В соответствии с методом внешнего стандарта и с учетом линейности зависимости выходного сигнала от массы вещества последовательно, с анализом раствора экстракта биопробы, проводят анализ контрольного раствора идентифицированного вещества. Концентрация контрольного раствора должна быть близка к концентрации определяемого вещества в растворе экстракта. Анализы контрольного раствора и экстракта биопробы должны проводиться в одном масштабе регистрации. Концентрация определяемого вещества в растворе экстракта рассчитывается по формуле:

$$C_x = \frac{C_d \times h_x}{h_d},$$

где C_x - концентрация определяемого вещества; h_x - высота сигнала в растворе экстракта из мочи; h_d - высота сигнала эталонного раствора; C_d - концентрация добавленного вещества в растворе подвижной фазы.

Метод внутреннего стандарта. В соответствии с данным методом в биообъект до операции пробоподготовки добавляется известное количество вещества, принятого за стандарт. В анализе барбитуратов в количестве внутренних стандартов рекомендуется использовать одно из следующих веществ: апробарбитал, метилфенобарбитал, фенилгидантоин и другие вещества, которые в данных условиях хроматографического разделения должны полностью отделяться от других компонентов образца, должны элюироваться близко к пику анализируемого соединения, не реагировать с другими компонентами, т.е. удовлетворять требованиям, предъявляемым к внутреннему стандарту. Можно использовать одновременно два и более внутренних стандарта. Концентрацию определяемого вещества рассчитывают по формуле:

$$C_x = \frac{C_{ст} \times h_x}{h_{ст}} \times \frac{1}{F_{C_x/C_{ст}}},$$

где C_x - концентрация определяемого вещества; $C_{ст}$ - концентрация внутреннего стандарта; h_x - высота (или площадь S_x) пика определяемого вещества; $h_{ст}$ - высота (или площадь $S_{ст}$) пика стандарта; $F_{C_x/C_{ст}}$ - относительный калибровочный фактор, предварительно определяемый по следующей формуле:

$$F_{C_x/C_{ст}} = \frac{h_x \times C_{ст}}{C_x \times h_{ст}}.$$

Методы добавок и внешнего стандарта для барбитуратов хорошо сопоставимы. Например, при определении в крови фенобарбитала при проведении химико-токсикологического анализа по методу добавок концентрация составила 0,03 мг/мл, по методу внешнего стандарта - 0,041 мг/мл.