

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГАММА-ГИДРОКСИМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ И ЕЁ ПРЕКУРСОРОВ В РАСТВОРАХ МЕТОДОМ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

Попова А.П.<sup>1</sup>, Гончаров Д.С.<sup>1</sup>, Чернышева О.В.<sup>1</sup>, Лукша Е.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО Омская Государственная Медицинская Академия Минздрава России, Омск, Россия (644043, Омск, ул. Ленина, 12), e-mail: [Kuzimanza@mail.ru](mailto:Kuzimanza@mail.ru)

Разработка недорогих, чувствительных экспресс-методов определения психотропных веществ в биологических жидкостях человека является актуальной задачей современного химико-токсикологического и судебно-химического анализа. На настоящий момент наблюдается рост числа отравлений гамма-гидроксимасляной кислотой (натрия оксибутиратом) и её прекурсорами. Разработана методика определения гамма-гидроксимасляной кислоты (натрия оксибутирата) и её прекурсоров в растворах спектрофотометрическим методом в видимом диапазоне на основе гидроксамовой реакции. Подобраны оптимальные условия спектрофотометрирования: pH, концентрации реактивов, температура и время реакции, обнаружен максимум поглощения на длине волны 521±2 нм. Для водных растворов в диапазоне концентраций 0,1 – 0,6 мг/мл обнаружена линейная зависимость оптической плотности от содержания натрия оксибутирата. Показано, что данная методика применима для анализа модельных растворов и может быть использована для целей химико-токсикологического и судебно-химического анализа.

Ключевые слова: гамма-гидроксимасляная кислота, натрия оксибутират, спектрофотометрия, гидроксамовая реакция.

## DETERMINATION OF GAMMA-HYDROXYBUTYRIC ACID AND ITS PRECURSORS IN SOLUTIONS BY SPECTROPHOTOMETRY

Popova A.P.<sup>1</sup>, Goncharov D.S.<sup>1</sup>, Chernysheva O.V.<sup>1</sup>, Luksha E.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Omsk State Medical Academy Russian Ministry of Health, Omsk, Russia (644043, Omsk, Lenin str., 12).e-mail: [Kuzimanza@mail.ru](mailto:Kuzimanza@mail.ru)

Developing inexpensive, sensitive express methods for determining psychotropic substances in human body fluids is an important task of modern toxicological and forensic chemical analysis. At present, an increasing number of poisoning by gamma-hydroxybutyric acid (sodium salt) and its precursors is found out. The method of determination of gamma-hydroxybutyric acid (sodium salt) and its precursors in solutions by spectrophotometry in the visible range based hydroxamic reaction was presented. Optimal conditions spectrophotometry were found: pH, concentration of reagents, temperature and reaction time, absorption maximum at a wavelength of 521 ± 2 nm. For aqueous solutions in the concentration range 0.1 - 0.6 mg/ml, a linear dependence of optical density from the concentration of gamma-hydroxybutyrate sodium was shown. It is shown that this technique is applicable for the analysis of model solutions and can be used for the purposes of toxicological and forensic chemical analysis.

Keywords: gamma-hydroxybutyric acid, gamma-hydroxybutyrate sodium (GHB), spectrophotometry, hydroxamic reaction.

### Введение

Гамма-гидроксимасляная кислота является естественным тормозным медиатором ЦНС, в анестезиологии, психиатрии, неврологии, офтальмологии и других областях медицины широко применяется её натриевая соль (натрия оксибутират). Благодаря уникальному для наркотических средств антигипоксическому эффекту этот препарат незаменим для многих стандартов лечения. Также натрия оксибутират находит применение в спортивной медицине в качестве снотворного, антиоксидантного и рекреационного средства. К сожалению, психотропный и рекреационный эффекты стали причинами немедицинского

употребления натрия оксibuтирата в качестве наркотического средства и допинг-препарата [1, 2, 3].

В начале XXI века резко возросло число случаев немедицинского употребления натрия оксibuтирата и его прекурсоров за рубежом, как одного из «клубных наркотиков» [8, 10], рост немедицинского употребления натрия оксibuтирата на территории РФ и, в частности, Омской области отмечается в основном с 2010-го года [4, 5]. Применение гамма-гидроксимасляной кислоты (натрия оксibuтирата) и её прекурсоров (бутиролактона) с целью «кайфа» в токсических дозах вызывает угнетение ЦНС, кому и апноэ, что без своевременной квалифицированной помощи может привести к летальному исходу. Неспецифическая картина отравления депримирующими и психотропными средствами, характерная для отравлений натрия оксibuтиратом, требует лабораторного подтверждения диагноза. При анализе литературных данных выявлено, что основной метод анализа натрия оксibuтирата – газовая хроматография/масс-спектрометрия (ГХ/МС) [1].

**Цель нашего исследования** – разработка доступного экспресс-метода качественного и количественного определения натрия оксibuтирата в биологических жидкостях человека и вещественных доказательствах.

Известны способы обнаружения и определения лекарственных препаратов фотоколориметрическим методом на основе гидроксамовой реакции, в том числе и натрия оксibuтирата [9], однако данный метод является качественным. Итогом нашего исследования явилась разработка метода фотометрического количественного определения натрия оксibuтирата в растворе для целей химико-токсикологического и судебно-химического анализа. Методика может быть использована в обычных лабораториях, исключает применение дорогостоящего оборудования, высокотоксичных и летучих реактивов.

#### **Материалы и методы эксперимента**

*Исследуемые образцы* с концентрациями 0,1, 0,2, 0,4, 0,5 и 0,6 мг/мл готовили с использованием лекарственного препарата «Натрия оксibat», раствор для внутривенного и внутримышечного введения 200 мг/мл; амп. 5 мл; «Московский эндокринный завод» (Россия), воды очищенной (водные растворы) и мочи (модельные растворы), полученной от здоровых лиц 25-30 лет обоих полов, не принимавших лекарственных препаратов в течение 24 часов.

*Реактивы:* 50% раствор кислоты серной, 1М раствор гидроксиламина гидрохлорида, 20% раствор натрия гидроксида, кислота хлористоводородная концентрированная, 15% раствор железа (III) хлорида (по ГФ РФ XII издания).

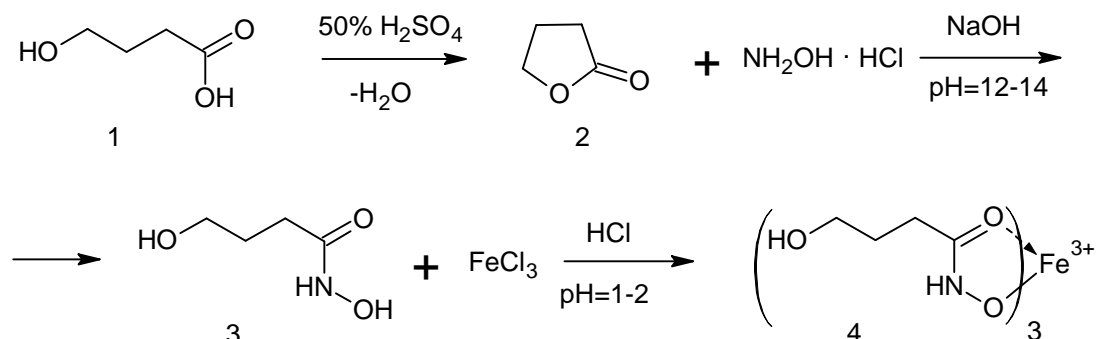
*Оборудование:* спектрофотометр СФ-2000.

*Методика:* в чистые сухие пробирки помещали по 1,0 мл исследуемых растворов с концентрациями 0,1, 0,2, 0,4 и 0,6 мг/мл натрия оксибутирата, к каждой пробе добавляли 0,5 мл 50% раствора кислоты серной (рН=1-2), выдерживали 5 мин при 20°C; добавляли 0,5 мл 1М раствора гидроксиламина гидрохлорида, 2,5 мл 20% раствора натрия гидроксида (до рН=12-13) и выдерживали 30 мин при 20°C; добавляли 0,5 мл кислоты хлористоводородной концентрированной (до рН=1-2) и 0,5 мл 15% раствора железа (III) хлорида, тщательно перемешивали в течение 10 мин (развитие фиолетовой окраски); полученные окрашенные растворы спектрофотометрировали в интервале длин волн 400-759 нм в кварцевых кюветах с длиной поглощающего слоя 1 см на спектрофотометре СФ-2000.

Статистическую обработку результатов эксперимента проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0 для доверительной вероятности  $p=0,95$ .

### Результаты эксперимента и их обсуждение

Гидроксамовая проба основана на взаимодействии гидроксиламина гидрохлорида в щелочной среде с определяемым веществом, сопровождается гидроксиламинолизом с образованием гидроксамовой кислоты, которую фиксируют по образованию окрашенного комплекса с раствором железа (III) хлорида. Применение гидроксамовой пробы для определения натрия оксибутирата требует предварительного перевода исследуемого соединения в лактон. Схема реакции приведена на рисунке 1:



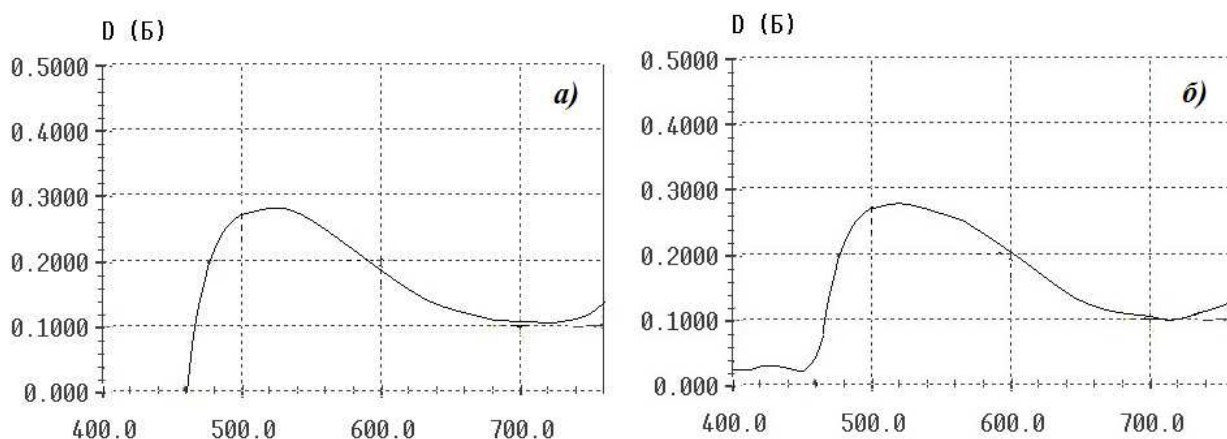
**Рисунок 1** – Схема гидроксамовой реакции:

1 – гамма-гидроксимасляная кислота, 2 – бутиролактон, 3 – гидроксамовая кислота, 4 – комплекс гидроксамовой кислоты с солями железа (III).

Подбор оптимальных условий гидроксамовой реакции (концентрация реактивов, рН, температура и время различных этапов реакции) выполняли согласно принципам проведения полного факторного эксперимента. Результат оценивали по достижению максимального значения оптической плотности раствора с известной концентрацией.

Регистрировали спектры 20 образцов для каждой концентрации водных растворов и 10 образцов для каждой концентрации модельных растворов. На всех полученных спектрах отмечены характерной формы максимумы поглощения при длине волны  $521 \pm 2$  нм и минимумы при  $720 \pm 2$  нм, что свидетельствует об отсутствии влияния компонентов

биологических жидкостей на продукт реакции. Спектры поглощения полученного комплекса в водных и модельных растворах представлены на рисунке 2.



**Рисунок 2** – Спектр поглощения комплекса продукта реакции с железа (III) хлоридом в кислой среде в водном растворе (а) и в модельном растворе (б).

Результаты статистической обработки экспериментальных данных представлены в таблицах 1 и 2.

**Таблица 1.**

Статистические параметры результатов спектрофотометрирования водных растворов (n=20, p=0,95).

C (мг/мл)	A, X <sub>ср</sub>	A, S <sub>r</sub>	A, σ	A, доверительный интервал	A, коэффициент вариации, %
0,1	0,1297	0,0307	0,0009	±0,017	23,67
0,2	0,1980	0,0368	0,0014	±0,0136	18,59
0,4	0,2439	0,0256	0,0007	±0,0112	10,50
0,5	0,2985	0,0344	0,0018	±0,015	15,46
0,6	0,3351	0,0459	0,0021	±0,0225	13,70

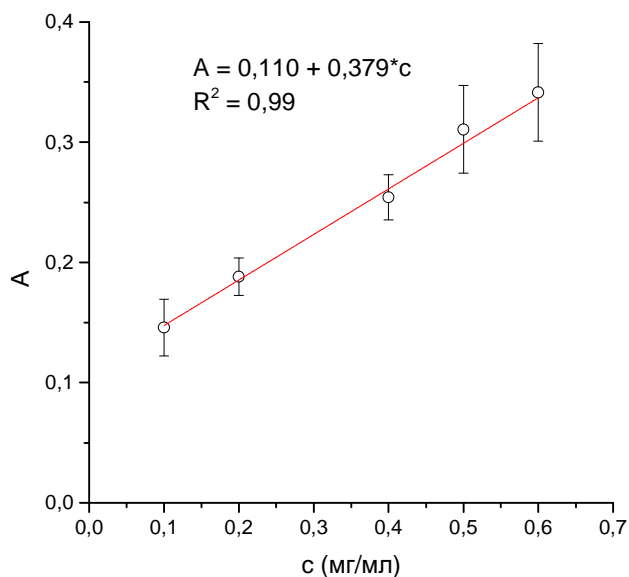
**Таблица 2.**

Статистические параметры результатов спектрофотометрирования модельных растворов (n=10, p=0,95).

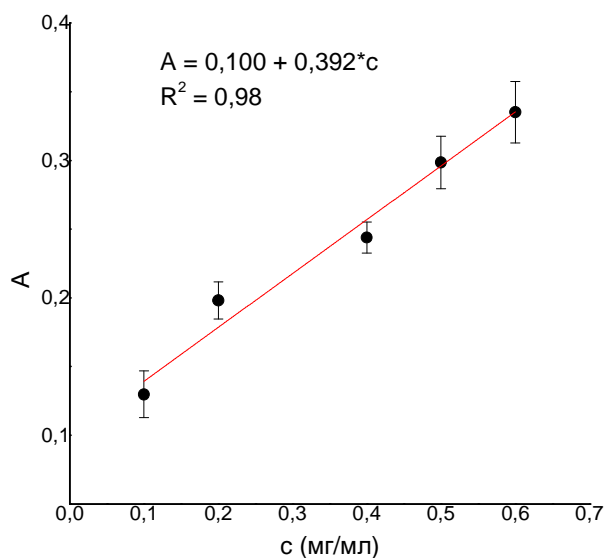
C (мг/мл)	A, X <sub>ср</sub>	A, S <sub>r</sub>	A, σ	A, доверительный интервал	A, коэффициент вариации, %
0,1	0,1458	0,0193	0,0004	±0,0161	12,97
0,2	0,1835	0,0045	0	±0,0047	2,39
0,4	0,2541	0,0325	0,0011	±0,0271	12,79
0,5	0,3106	0,0367	0,0017	±0,0109	13,46
0,6	0,3414	0,0486	0,0024	±0,0432	14,24

Из представленных данных следует, что компоненты биологической жидкости не оказывают значимого влияния на величину оптической плотности и последующий расчёт количественного содержания натрия оксibuтирата для всех исследуемых концентраций.

Для подтверждения линейной зависимости оптической плотности от концентрации натрия оксibuтирата строили градуировочный график на 5 уровнях концентраций его водных (рисунок 3) и модельных (рисунок 4) растворов.



**Рисунок 3** – График зависимости оптической плотности от концентрации натрия оксibuтирата в водном растворе.



**Рисунок 4** – График зависимости оптической плотности от концентрации натрия оксibuтирата в модельном растворе.

Зависимость оптической плотности от концентрации натрия оксibuтирата в водных растворах была аппроксимирована линейным уравнением с помощью метода наименьших квадратов. Полученное уравнение для водных растворов имеет вид:

$$A = 0,110 + 0,379 \cdot C,$$

где  $A$  – оптическая плотность (величина светопоглощения) раствора,

$C$  – концентрация исследуемого раствора.

На всём интервале концентраций наблюдалась линейная зависимость оптической плотности от концентрации раствора, что свидетельствует о выполнении закона Бугера-Ламберта-Бера. Критерием приемлемости линейности явился и коэффициент корреляции ( $R^2$ ), его расчетная величина близка к единице (0,99). Таким образом, в данных интервалах концентраций методика обеспечивает определение натрия оксibuтирата с требуемой линейностью.

Используя результаты построения градуировочного графика, рассчитывали молярный показатель поглощения и чувствительность определения натрия оксibuтирата, приняв за  $A_{\min}=0,01$ . Результаты расчётов представлены в таблице 3.

**Таблица 3.**

Характеристики спектрофотометрической методики.

Определяемое вещество	Молярная масса, г/моль	Область линейности графика, мг/мл	Молярный коэффициент поглощения продукта реакции	Определяемый минимум, мкг/мл
Натрия оксibuтират	126,09	0,1 – 0,6	491,29	24

Установлено, что разработанная методика достаточно чувствительна для определения натрия оксibuтирата в диапазоне фармакокинетических концентраций в моче пострадавшего или умершего (0,1-0,6 мг/мл, в некоторых случаях до 1,6 мг/мл в зависимости от принятой дозы и индивидуальных особенностей организма [6,7]). Для модельных растворов в диапазоне концентраций 0,1 – 0,6 мг/мл при использовании разработанной нами методики также наблюдалась линейная зависимость оптической плотности от концентрации натрия оксibuтирата, уравнение имеет вид:

$$A = 0,100 + 0,392 \cdot C,$$

где  $A$  – оптическая плотность (величина светопоглощения) раствора,

$C$  – концентрация исследуемого раствора.

Расчётная величина коэффициента корреляции ( $R^2$ ) также близка к единице (0,98), что позволяет применять разработанную нами методику определения натрия оксibuтирата в моче для целей химико-токсикологического и судебно-химического анализа.

### **Заключение**

Разработана методика спектрофотометрического определения натрия оксibuтирата в водном растворе в диапазоне концентраций 0,1 – 0,6 мг/мл. Подобраны оптимальные значения рН, концентрации реагентов, температура и время реакций на этапах методики. Данная методика применима для определения натрия оксibuтирата в модельных растворах

для целей химико-токсикологического и судебно-химического анализа. Возможно применение данной методики для мониторинга эффективности экстракции натрия оксибутирата из биологических объектов для целей дальнейших исследований.

### Список литературы

1. Лупенко А.П. Частота немедицинского употребления натрия оксибутирата и методы его идентификации и количественного определения за рубежом и в РФ / А. П. Лупенко, Т. А. Тябина, А. В. Сяуткина, Е. А. Лукша // Современные наукоемкие технологии. – 2013. - №9. – С. 55-56.
2. Регистр лекарственных средств России РЛС Энциклопедия лекарств. – 15-ый вып. / Гл. ред. Г. Л. Вышковский. – М.: «РЛС-2007», 2006. – с. 1488.
3. Руководство по анестезиологии: Учебное пособие/ под. ред. Ф.С. Глумчера, А.И. Трещинского – К.: Медицина, 2008. - 608с.
4. Сабаев А.В., Голева О.П. Смертность населения Омской области в результате острых отравлений химической этиологии за 2003—2012 гг // Общественное здоровье и здравоохранение. – 2013. - №3. – С. 9-12.
5. Сабаев А.В., Голева О.П. Смертность населения Омской области в результате острых наркотических отравлений в 2002—2011 гг // Наркология, 2013. - т. 12. - №2 (134). - С. 35-37.
6. Brianne E. Akins, Estuardo Miranda, J. Matthew Lacy. A multi-drug intoxication fatality involving Xyrem (GHB) // Journal Forensic Science, March 2009. – Vol. 54. - No.2. – P. 495-496.
7. Christine Haller, Dung Thai, Peyton Jacob etc. GHB urine concentrations after single-dose administration in humans // Journal of Analytical Toxicology. – Vol. 30. – July/August 2006. – P. 360-364.
8. Paul M. Gahlinger. Club Drugs: MDMA, Gamma-Hydroxybutyrate (GHB), Rohypnol, and Ketamine // American Family Physician. – 2004 June 1. - 69(11). – P. 2619-2627.
9. William C. Alston, Karno Ng. Rapid colometric screening test for  $\gamma$ -hydroxybutyric acid (liquid X) in human urine // Forensic Science International. - 126 (2002). – P. 114-117.
10. Wood D.M. Medical and legal confusion surrounding gamma-hydroxybutyrate (GHB) and its precursors gamma-butyrolactone (GBL) and 1,4-butanediol (1,4BD) / D.M. Wood, C. Warren-Gash, T. Ashraf, S.L. Greene, Z. Shather, C. Trivedy, S. Clarke, J. Ramsey, D.W. Holt and P.I. Dargan // Quarterly Journal of Medicine. – 2008 (101). – P. 23–29.

**Рецензенты:**

Гришин А.В., д.фарм.н., профессор, заведующий кафедрой фармации ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Омск.

Огай М.А., д.фарм.н., доцент кафедры фармацевтической технологии с курсом биотехнологии ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Омск.