

## ОБОСНОВАНИЕ НЕОБХОДИМОСТИ ПРОБОПОДГОТОВКИ ПРИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОМ ОПРЕДЕЛЕНИИ ГАММА-ГИДРОКСИМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ И ЕЁ ПРЕКУРСОРОВ

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, г.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. Проведена апробация разработанной ранее методики спектрофотометрического определения гамма-гидроксимасляной кислоты и её прекурсоров в моче, полученной от пациентов отделения острых отравлений БУЗОО «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи № 1». Выявлены особенности использования реактивов гидроксамовой реакции, которые возможно объяснить различиями в составе мочи в норме и в состоянии токсического шока. Показана необходимость изолирования гамма-гидроксимасляной кислоты и её прекурсоров перед применением разработанной ранее спектрофотометрической методики определения в целях химико-токсикологического и судебно-химического анализа.

Ключевые слова: гамма-гидроксимасляная кислота, натрия оксибутират, спектрофотометрия, желчные пигменты, пробоподготовка.

## RATIONALE FOR SAMPLE PREPARATION IN SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF GAMMA-HYDROXYBUTYRIC ACID AND ITS PRECURSORS

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 approbation of the previously developed methods for the spectrophotometric determination of gamma-hydroxybutyric acid and its precursors in the urine obtained from patients of department of acute poisoning Budget Institution of Health Omsk Region "City Clinical Emergency Hospital №1" is presented. The features of the use of reagents for hydroxamic reactions is found out. This may be explained by differences in the composition of the urine in health humans and in humans stating of toxic shock. The necessity of isolating gamma-hydroxybutyric acid and its prekursors before using previously developed spectrophotometric methods for determining the purpose of the chemical-toxicological and forensic chemical analysis is shown.

Keywords: gamma-hydroxybutyric acid, gamma-hydroxybutyrate sodium (GHB), spectrophotometry, bile pigments, sample preparation.

В настоящее время наблюдается увеличение количества случаев употребления натрия оксибутирата и его прекурсоров, как одного из «клубных наркотиков» [9; 10], наряду с психотропными препаратами амфетаминового ряда. Рост немедицинского употребления натрия оксибутирата на территории РФ, и в частности Омской области, отмечается в основном с 2010 года [3; 4]. Применение гамма-гидроксимасляной кислоты (натрия оксибутирата) и её прекурсоров (бутиролактона) с целью получения наркотического опьянения 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 требует лабораторного подтверждения диагноза. Нами ранее была разработана методика спектрофотометрического определения натрия оксибутирата в водных растворах, основанная на гидроксамовой реакции. Данная методика отличается экспрессностью, экономичностью и доступностью реактивов и оборудования, не требует концентрирования объекта и применима в диапазоне концентраций 0,1-0,6 мг/мл [1].

Изучение литературных источников показало, что при поступлении в токсической дозе натрия оксибутират выделяется с мочой в неизменном виде в количестве около 1% от принятой дозы и соответствует интервалу 0,1-1,6 мг/мл [7; 8]. Таким образом, разработанная нами методика обнаружения гамма-гидроксимасляной кислоты и её прекурсоров в растворах может быть применима для определения натрия оксибутирата в моче людей, находящихся в состоянии острого отравления.

При анализе литературных данных выявлено, что состав мочи человека в норме и в состоянии шока различного генеза может значительно варьироваться. Наблюдаются олиго- и анурия, липидурия, возможно появление таких компонентов, как желчные пигменты (уробилин, билирубин), белки и продукты их распада, клеточные элементы, гемоглобин, слизь и др. Современными высокочувствительными инструментальными методами исследования в моче возможно обнаружить около 3000 химических веществ (метаболиты естественных, лекарственных, токсических веществ и т.п.) [5; 6]. В данном исследовании устанавливается возможность применения спектрофотометрической методики определения натрия оксибутирата в нативной моче лиц, находящихся в состоянии острого отравления (токсического шока).

**Цель исследования** – апробация спектрофотометрического экспресс-метода качественного и количественного определения натрия оксибутирата на моче пациентов с подозрением на отравление натрия оксибутиратом.

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

*Исследуемые образцы мочи* были получены от трёх пациентов Отделения острых отравлений БУЗОО «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи № 1», мужского пола, 22-25 лет, находящихся в бессознательном состоянии с подозрением на отравление натрия оксибутиратом.

*Реактивы:* 50%-ный раствор кислоты серной, 1М раствор гидроксиламина гидрохлорида, 20%-ный раствор натрия гидроксида, кислота хлористоводородная концентрированная, 15%-ный раствор железа (III) хлорида.

*Оборудование:* центрифуга ОПН-3, спектрофотометр-2000.

*Оценка физических свойств мочи* проводилась в соответствии с методикой, предоставленной клинико-диагностической лабораторией БУЗОО «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи № 1».

*Методика пробоподготовки:* в чистые сухие химические стаканы помещали образцы мочи по 5,0 мл, добавляли 0,5 мл 50%-ного раствора кислоты серной и 1,0 г кристаллического натрия сульфата, перемешивали в течение 5 мин, затем жидкость центрифугировали в течение 2 мин при 1500 об/мин; надосадочную жидкость помещали в чистую сухую делительную воронку и проводили трёхкратную экстракцию хлороформом порциями по 2,5 мл в течение 3 мин; хлороформные извлечения объединяли и упаривали на песчаной бане при температуре 55 °С.

*Методика определения:* в чистые сухие пробирки помещали по 1,0 мл исследуемых образцов, к каждой пробе добавляли 0,5 мл 50%-ного раствора кислоты серной (до рН=1-2), выдерживали 5 мин при 20 °С; добавляли 0,5 мл 1М раствора гидроксиламина гидрохлорида, 2,5 мл 20%-ного раствора натрия гидроксида (до рН=12-13) и выдерживали 30 мин при 20 °С; добавляли 0,5 мл кислоты хлористоводородной концентрированной (до рН=1-2) и 0,5 мл 15%-ного раствора железа (III) хлорида, тщательно перемешивали в течение 10 мин. В случае развития розово-фиолетовой окраски проводили спектрофотометрирование при длине волны 520±2 нм в кюветах с толщиной слоя 1 см. Раствор сравнения: к 5,0 мл воды очищенной добавляли 0,5 мл 15%-ного раствора железа (III) хлорида и тщательно перемешивали.

### **Результаты эксперимента и их обсуждение**

Образцы мочи пациентов № 1 и № 2 были насыщенно-жёлтого цвета с коричневатым оттенком, со стойкой пеной белого цвета. Образец мочи пациента № 3 был жёлто-коричневого цвета, со стойкой пеной светло-жёлтого цвета. Образцы мочи от всех трёх пациентов имели выраженную опалесценцию. Данные результаты указывают на присутствие таких патологических компонентов, как белки и продукты их распада, желчные пигменты, липиды и др.

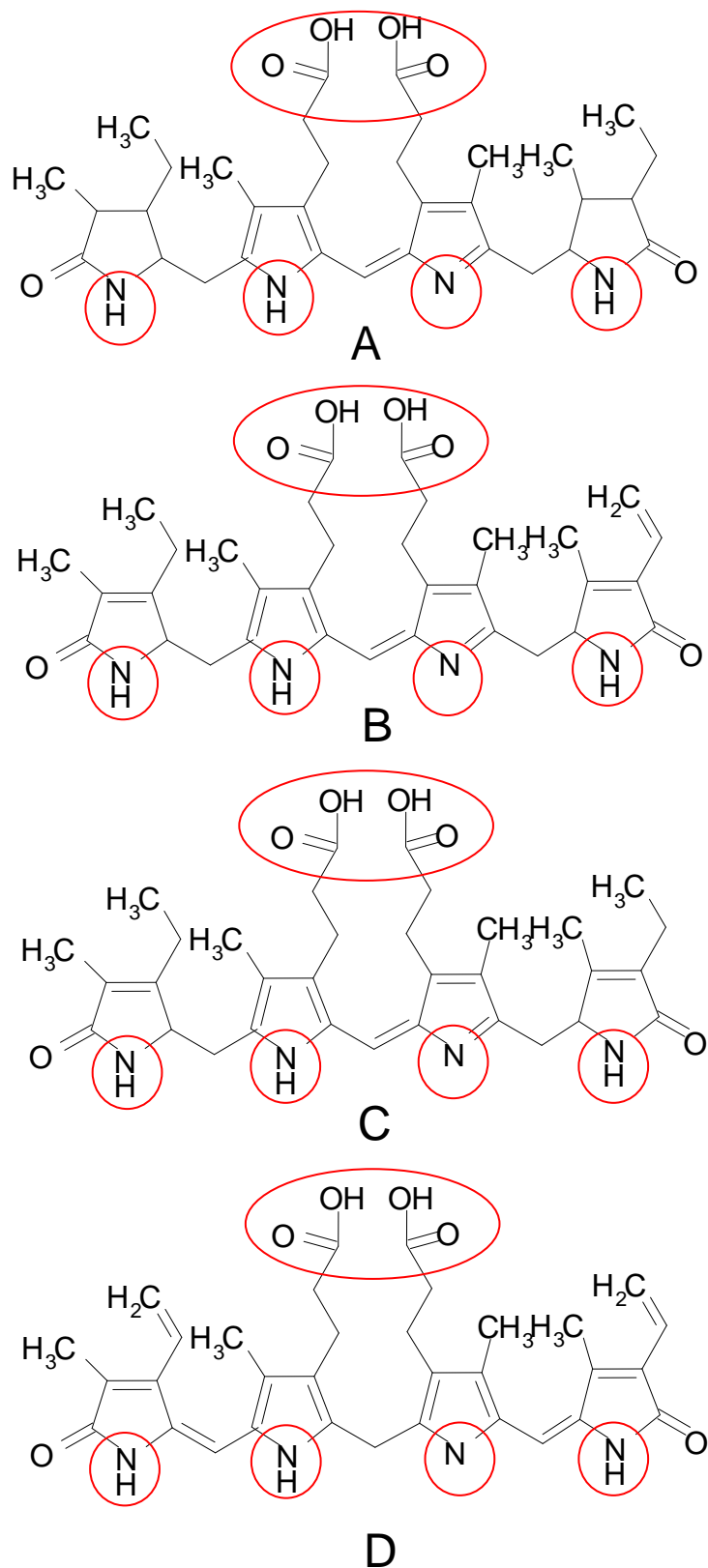
При проведении спектрофотометрической методики в отсутствии пробоподготовки во всех трёх образцах мочи развивалась насыщенная малиновая окраска, значительно превышающая максимальное значение оптической плотности, известное для натрия оксибутирата в диапазоне концентраций, характерных для острого отравления. Значения оптической плотности превышали оптимальный диапазон для измерения оптической плотности (0,1-1,0) и достигали значений 2,1-2,4. Превышение максимального значения оптической плотности более чем в 2 раза делает расчёт концентраций недостоверным. Изменение оттенка продукта реакции с розово-фиолетового на малиновый и интенсивности

окраски возможно объяснить взаимодействием патологических компонентов мочи с указанными в методике реактивами.

Образцы мочи подвергали пробоподготовке по общепринятой методике жидкость-жидкостной экстракции с целью устранения балластных веществ (белков) и извлечения определяемых веществ кислого и нейтрального характера в органическую фазу (хлороформ). После упаривания хлороформного извлечения и разведения остатка в воде проводили спектрофотометрическую методику определения натрия оксибутирата – в результате развивалась слабая грязно-коричневая окраска, не соответствующая ожидаемой окраске продукта взаимодействия натрия оксибутирата с реактивами методики. Отсутствие розово-фиолетовой окраски интерпретировалось как отрицательный результат обнаружения натрия оксибутирата. В отсутствие розово-фиолетовой окраски спектрофотометрирование не проводилось.

Учитывая структуру таких веществ, как желчные пигменты, белки и продукты их распада, липиды, клеточные элементы и т.п., образующих патологический состав мочи, содержащиеся в них пиррольные циклы, ненасыщенные (двойные) связи, первичные и вторичные аминогруппы, иминогруппы, гидроксо-, оксо- и карбоксильные группы, вероятно предположить их взаимодействие с концентрированными минеральными кислотами и солями железа (III) [2].

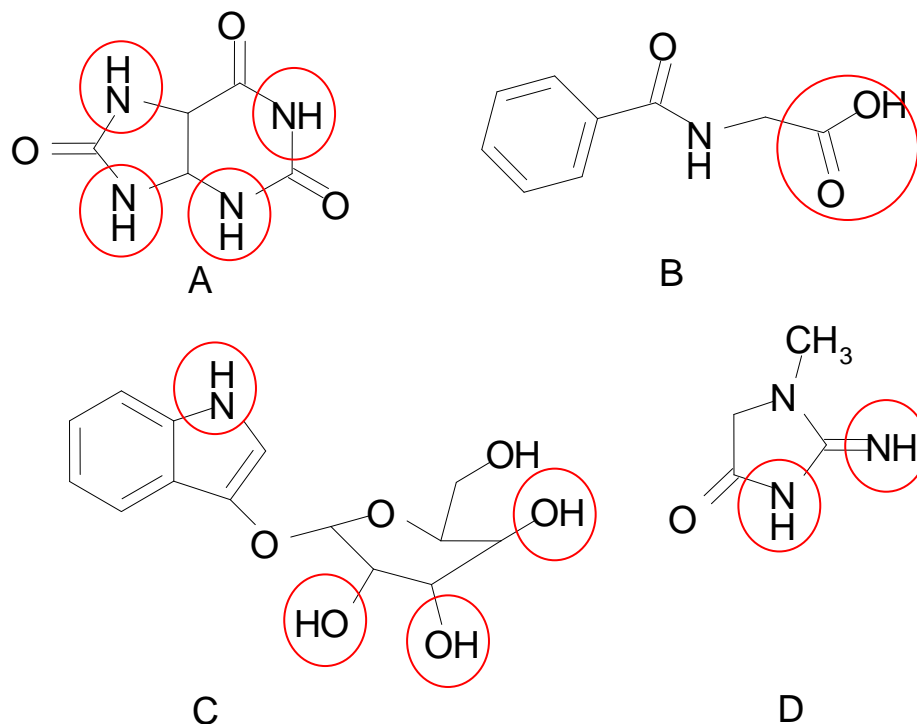
Такие желчные пигменты, как уробилины I и D, стеркобилин и билирубин, могут вступать в реакцию комплексообразования с солями железа (III) из-за наличия третичных атомов азота, карбоксильных, имидных групп. Строение молекул желчных пигментов приведено на рисунке 1, указанные функциональные группы выделены красным цветом:



**Рис. 1.** Структура молекул желчных пигментов: А – стеркобилин, В – уробилин D, С – уробилин I, D – билирубин.

В состоянии токсического шока в моче может повышаться содержание азотистых продуктов распада белков и пуриновых оснований, таких как мочевая и гиппуровая кислоты, креатинин, ксантин, индикан и др. В указанных веществах также присутствуют

функциональные группы, способные к комплексообразованию с солями железа (III) – гидроксильные, имидные и карбоксильные группы. Структура веществ приведена на рисунке 2, указанные функциональные группы выделены красным цветом:



**Рис. 2.** Структура молекул продуктов распада азотистых соединений: А – мочевая кислота; В – гиппуровая кислота; С – индикан; D – креатинин.

Присутствие щавелевой кислоты, кетоновых тел, сахаров, жиров, гетероциклических азотсодержащих соединений, веществ с амино- и иминогруппами в моче может привести к протеканию окислительно-восстановительных реакций с концентрированными минеральными кислотами или солями железа (III), в результате которых образуются конденсированные соединения, продукты осмоления, имеющие различную окраску. Производные пиррола (входят в состав желчных пигментов) являются электронообогатёнными ароматическими системами, способными к реакциям электрофильного замещения. С сильными кислотами протекает реакция протонирования, протонированный катион вступает в реакцию полимеризации с нативными молекулами пирролов, что приводит к образованию смолистых веществ, часто имеющих красную окраску [2].

Таким образом, развитие малиновой окраски при проведении спектрофотометрической методики без пробоподготовки и отсутствие необходимой окраски при проведении экстракции является следствием взаимодействия патологических компонентов мочи с реактивами гидроксамовой реакции. В данном исследовании установлено влияние патологических компонентов мочи пациентов, находящихся в

состоянии токсического шока, на проведение определения гамма-гидроксимасляной кислоты и её прекурсоров методом спектрофотометрии, а также установлена необходимость пробоподготовки. Спектрофотометрическая методика без пробоподготовки применима для плановых скрининговых исследований мочи лиц, не находящихся в состоянии токсического шока.

В виду наличия в моче значительных количеств компонентов, мешающих протеканию гидроксамовой реакции, появление которых обусловлено различными патологическими состояниями, приёмом лекарственных препаратов, алкоголя и т.п., нами рекомендовано предварительное проведение пробоподготовки для выявления отравления натрия оксидуриатом у лиц, находящихся в состоянии токсического шока.

### **Выводы**

Показано влияние патологических компонентов мочи на протекание гидроксамовой реакции. Показана необходимость проведения пробоподготовки перед спектрофотометрическим определением гамма-гидроксимасляной кислоты и её прекурсоров в моче пациентов.

### **Список литературы**

1. Попова А.П. Определение гамма-гидроксимасляной кислоты и её прекурсоров в растворах методом спектрофотометрии / Попова А.П., Гончаров Д.С., Чернышева О.В., Лукша Е.А. // Современные проблемы науки и образования. – 2014. - № 3.
2. Реутов О.А., Курц А.Л., Бутин К.П. Органическая химия. В 4-х частях. – М. : Бином, 2005. - Т. 1. - 544 с.
3. 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.
4. 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.
5. Урология. Национальное руководство / под ред. Лопаткина Н.А. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. — 1024 с.
6. Bouatra S. The Human Urine Metabolome / Bouatra S., Aziat F., Mandal R., Guo A.C., Wilson M.R. et al // PLoS ONE. – 2013. – September. – 8(9): e73076. DOI:10.1371/journal.pone.0073076.

7. Brianne E. Akins, Estuardo Miranda, J. Matthew Lacy. A multi-drug intoxication fatality involving Xyrem (GHB) // *Journal Forensic Science*. – 2009. – March. - Vol. 54, No.2. - P. 495-496.
8. Christine Haller, Dung Thai, Peyton Jacob etc. GHB urine concentrations after single-dose administration in humans // *Journal of Analytical Toxicology*. – 2006. - Vol. 30. - July/August. - P. 360-364.
9. Paul M. Gahlinger. Club Drugs: MDMA, Gamma-Hydroxybutyrate (GHB), Rohypnol, and Ketamine // *American Family Physician*. – 2004. - June 1. – 69 (11). - P. 2619-2627.
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.

Пеньевская Н.А., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фармацевтической технологии с курсом биотехнологии ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Омск.