

ХТА отдельных групп лекарственных веществ

Барбитураты
Бензодиазепины

2014

Подходы к анализу
производных барбитуровой
кислоты

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;

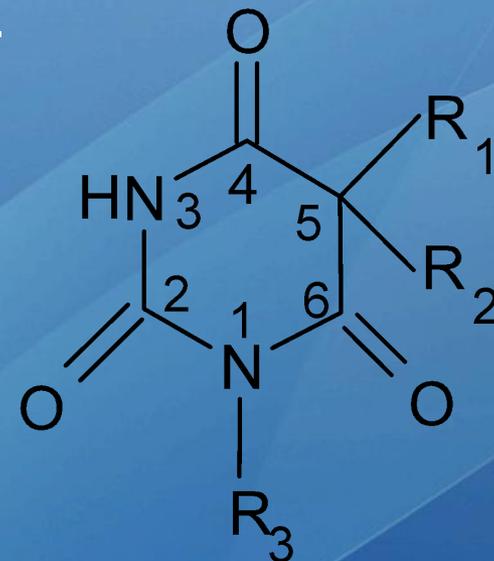
Барбитураты - 5,5'-дизамещенные производные барбитуровой кислоты. Атом азота в положении 1 может метилироваться, (метилфенобарбитала), а замещение кислорода серой в положении 2 приводит к образованию тиobarбитуратов, (тиопентала).

- Низкий терапевтический индекс

- Широкое применение

- Синергизм с алкоголем и др. психоактивными средствами.

- Быстро всасываются после орального введения (биодоступность 90—100 %)



Свойства производных барбитуровой кислоты

Препарат	Доза Мг/сут	pKa	Vd л/кг	Бел, %	T 1/2 час	CI мл/мин	AU %
Барбитал	300-600	8,0	0,5	20	48		40
Фенобарбитал	60-180	7,4	0,5-0,7	50	100	5	30
Барбамил	100-200	7,9	1,0	50	8-40	35	1
Этаминал -натрий	100-200	8,0		50	35-50		10
Циклобарбитал	100-400	7,6	0,5	70	8-17	35	менее 10
Гексобарбитал	250-500	8,2	1,0	50	3-6		

Свойства.

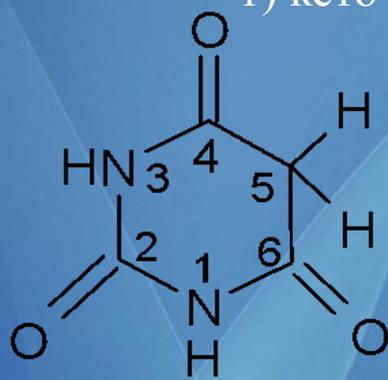
Барбитураты плохо растворяются в воде, хорошо растворимы в этаноле, хлороформе, эфире, в водных растворах щелочей.

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 щелочных значениях рН, которые характеризуют поглощение ионизированных форм первой (238 — 240 нм) и второй (254 — 256 нм) ступени диссоциации.

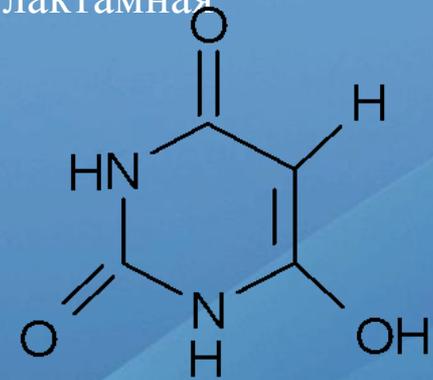
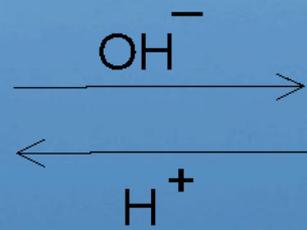
Барбитуровая кислота является циклическим уреидом,

возможны два типа изомерии:

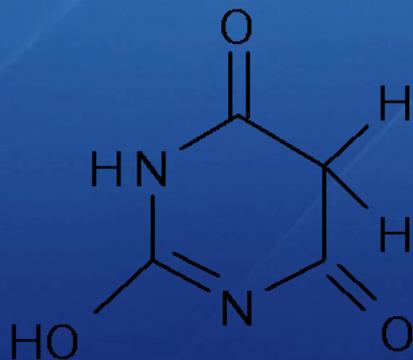
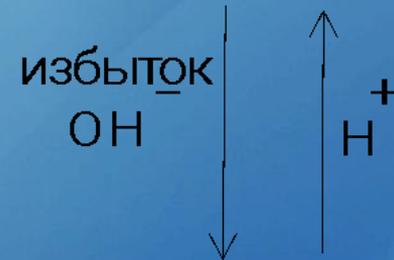
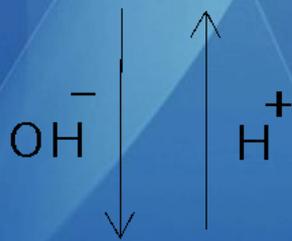
1) кето - енольная и 2) лактим – лактамная



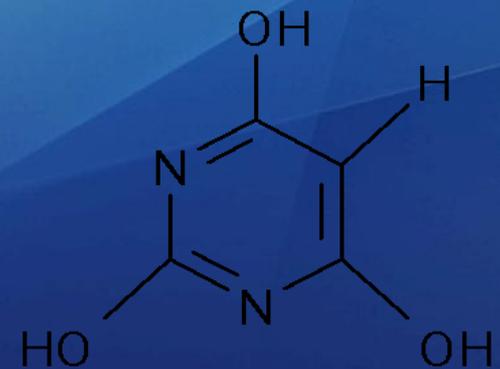
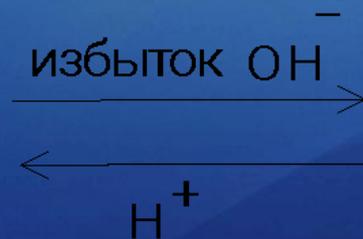
кето-форма
(лактамная)



енольная форма



лактимная форма



Основные характеристические частоты ИК-спектров барбитуратов (см⁻¹):

–NH– (деформационные) 1680–1693;

C=O (валентные) 1712–1725;

–CONH–(валентные) 1744–1770;

=C–N– (валентные) 1300–1320;

C=O(деформационные) 1210–1245;

=C–H (деформационные) 830–875.

Биотрансформация

- Фенобарбитал –
 1. N-глюкозилирование по азоту в 1.
 2. окисление фенольного фрагмента в пара-положении и его конъюгация с глюкуроновой кислотой.
- Этаминал натрия –
 1. гидроксילирование: азота в положении 1;
 2. в радикале в положении 3 и его окисление через кетон до карбоновой кислоты

Биотрансформация

- Барбитал –

1. конъюг. с глюкуроновой кислотой по азоту в 1.

2. Окисление в радикале по 3 положению до карбоновой кислоты.

Циклобарбитал – окисление до кетоциклобарбитала в мета- положении радикала.

Выделение

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

Частные методы:

Метод Валова (подщелоченой водой)

Метод Швайковой (подкисленной водой, с очисткой переэкстракцией)

Метод Попова (водой подкисленной серной кислотой)

Метод Валова

100 г измельченного биологического материала, + 180 мл воды и 20 мл 10 %-го раствора гидроксида натрия. Оставляют на 30 мин при частом перемешивании, а затем центрифугируют в течение 30 мин (3000 об/мин). К центрифугату + 120 мл 10 %-го раствора вольфрамата натрия и 1 н. раствор серной кислоты (до $\text{pH}=2$). нагревают на кипящей водяной бане 20 мин, а затем подвергают центрифугированию (30 мин). Центрифугат + 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 $\text{pH}=2$ и взбалтывают с равным объемом диэтилового эфира. Полученную при этом эфирную вытяжку используют для обнаружения и количественного определения барбитуратов.

Обнаружение барбитуратов

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

Цветные реакции

- Реакция барбитуратов с изопропиламином и солями кобальта.(Парри) (фиолетовое окрашивание)
- Реакция с солями кобальта и щелочами в безводной среде. (Цвиккер)
(розовая или красная окраска)
- Реакция с пиридином и солями меди. (аморфный осадок)
- Мурексидная проба (розовая окраска)
- Реакция с родамином 6Ж (комплексы светло-оранжевые или оранжевокрасные в четыреххлористом углероде)

Микрокристаллические реакции

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 онцентрированной 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.

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

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).*

Реакция с диодокупратом калия в растворе иода. *образуются кристаллические осадки.*

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

УФ спектроскопия

К сухому остатку, полученному при выпаривании вытяжек из биологического материала или лекарственных форм, прибавляют 5 мл воды.

После растворения сухого остатка полученный раствор фильтруют, затем к фильтрату

1. прибавляют каплю 2 н. раствора аммиака ($\text{pH} \sim 10$) и снимают спектр поглощения.

5,5-замещенные (барбамил, барбитал, бутобарбитал, фенобарбитал, циклобарбитал, этаминал) и 1,5,5-замещенные (гексенал, гексобарбитал) барбитуровой кислоты имеют максимум поглощения при длине волны около 240 нм, производные тиобарбитуровой кислоты имеют 2 максимума (при 305 и при 255 нм).

2. прибавляют 1—2 капли 2 н. раствора серной кислоты ($\text{pH} \sim 2$), и максимум поглощения 1,5,5- и 5,5-замещенных барбитуровой кислоты исчезает.

В этих условиях для тиобарбитуратов максимумы поглощения смещаются до 290 и 239 нм.

3. После прибавления к указанным растворам 1—2 капель 4 н. раствора гидроксида натрия ($\text{pH} \ll 13$) появляется максимум поглощения 1,5, 5- замещенных барбитуровой кислоты при 240 нм, а для 5,5-производных этой кислоты—при 255 нм. Для тиобарбитуратов появляется максимум при 305 нм, а второй максимум исчезает.

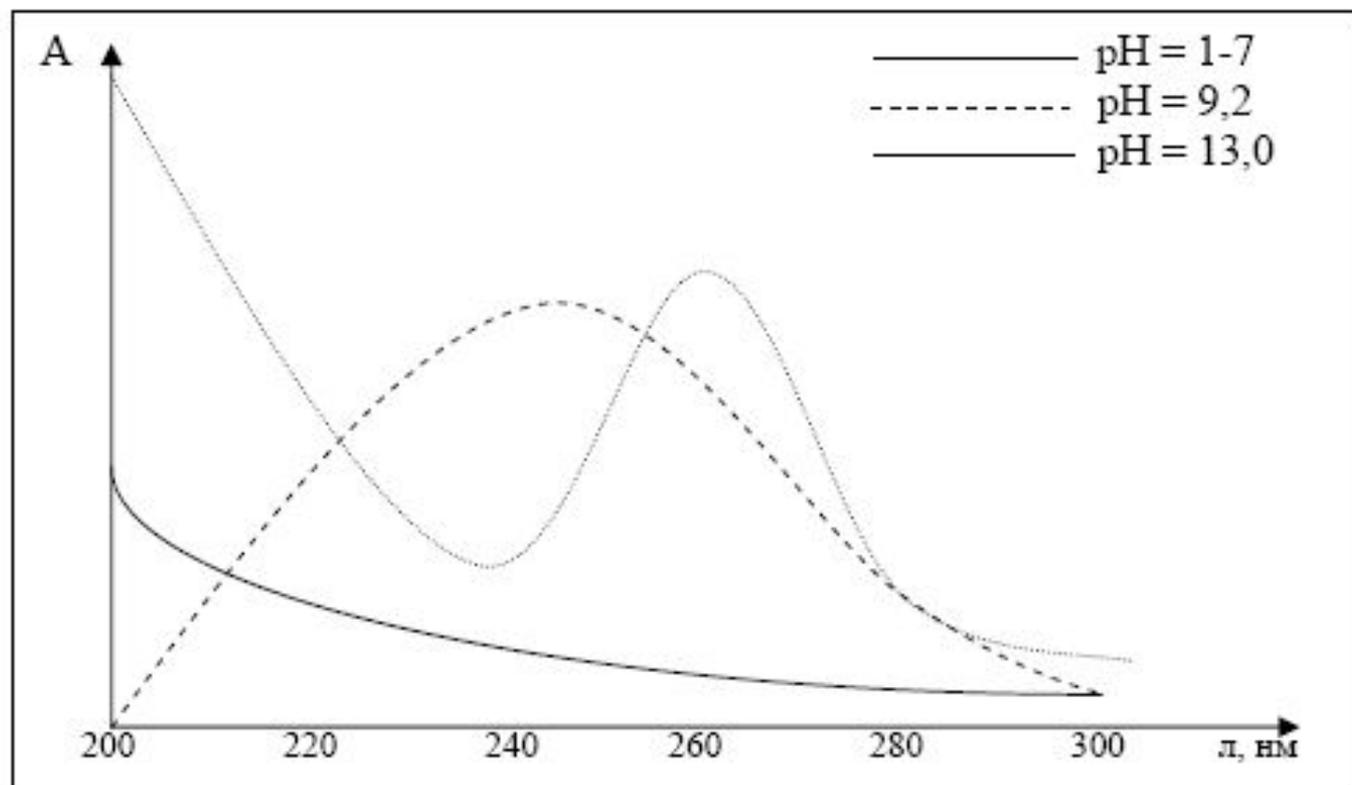


Схема УФ-спектра барбитуратов.

Анализируемое вещество	pH=9,2		pH=13,0	
	E_a	λ, нм	E_a	λ, нм
Фенобарбитал	452	239	342	254

ФЭК – метод Поповой

Сухие остатки барбитуратов, растворяют в хлороформе или в метиловом спирте.

Сухие остатки барбитала, гексенала, фенobarбитала и циклобарбитала растворяют в 6 мл хлороформа, а сухие остатки барбамила и этаминала — в 2 мл метилового спирта. Объемы растворов барбамила и этаминала в метиловом спирте доводят хлороформом до 6 мл.

К полученным растворам барбитуратов прибавляют по 5 мл 0,125 %-го раствора ацетата кобальта в метиловом спирте и по 1 мл 50 %-го раствора изопропиламина в метиловом спирте.

*Оптическую плотность окрашенных в **фиолетовый цвет** растворов измеряют при помощи **фотоэлектроколориметра** (светофильтр зеленый, кювета 20 мм)*

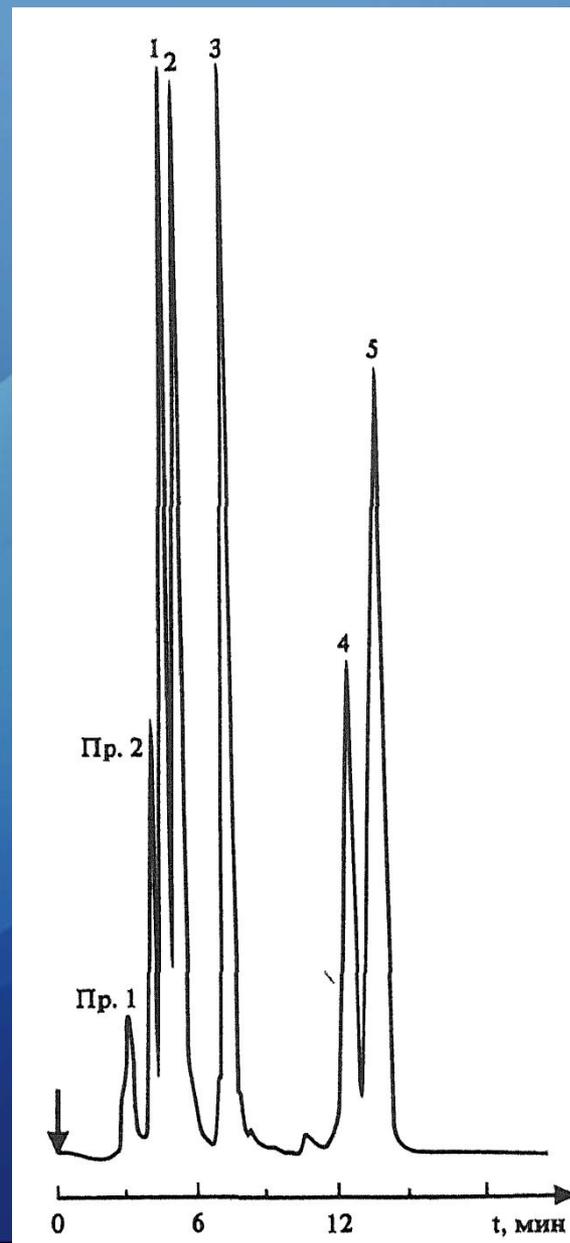
В качестве раствора сравнения применяют смесь перечисленных выше реактивов.

ТСХ

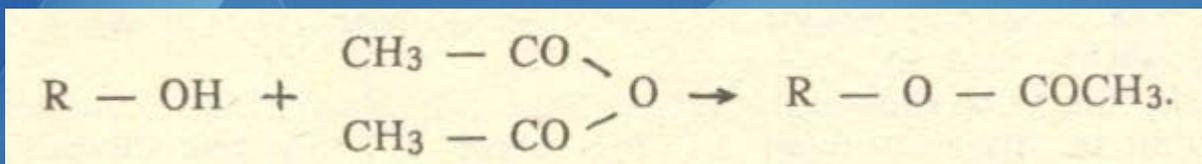
- Сорбент – силикагель КСК, забуференный 0,1 н раствором борной кислоты.
- Растворители – хлороформ:н-бутанол:25% раствор аммиака (70:40:5)
- Время насыщения камеры парами растворителя – 10 мин
- Высота поднятия фронта растворителя – 10 см
- Обнаружение – дифенилкарбазоном (ДФК) – 0,1% раствор в хлороформе и раствором сульфата ртути – 5% раствор в концентрированной серной кислоте.
- R_f фенобарбитала = 0,4

ВЭЖХ

- Детекция - 240нм
- Сорбент – ODS
- Элюэнт – смесь метанол – р-р фосфата аммония
- Количественное определение – метод добавок



- Дериватизация - получение ацетилпроизводных по реакции с уксусным ангидридом в безводном растворителе (пиридине):



- Внутренний стандарт.

Подходы к анализу
производных
1,4 бенздиазепина

Приказ по МЗ СССР г.Москва

№ 1021 от 25 декабря 1973г

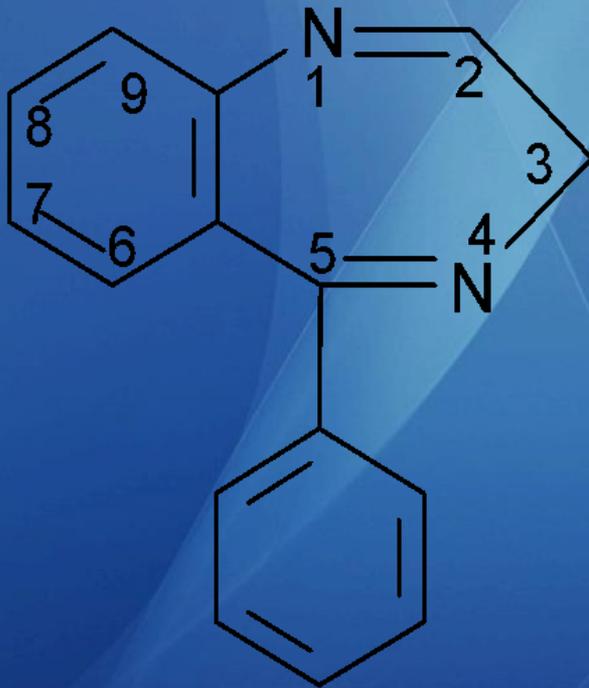
«О введении нового перечня токсикологических веществ, подлежащих судебно – химическому исследованию в лабораториях бюро судебно – медицинской экспертизы»

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.
 - элениум, нитразепам, седуксен;

1,4 Бенздиазепины

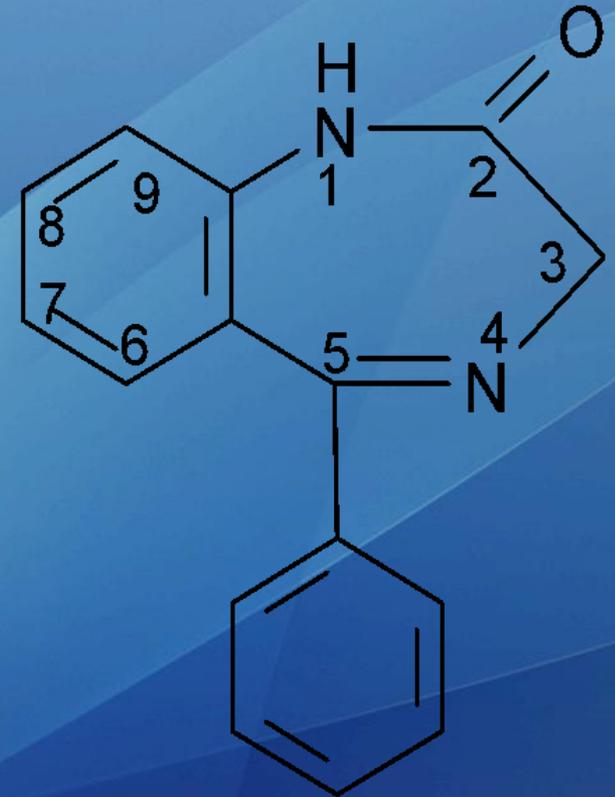
- Доступность
- Высокий терапевтический индекс
- Широкий спектр действия
- Меньшее количество побочных эффектов
- Высока частота случаев отравления феназепамом.

1,4 бенздиазепины

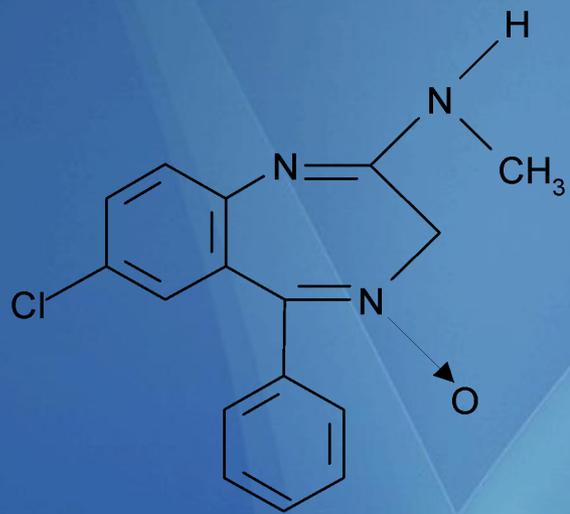


5-фенил-3Н-1,4-бензодиазепин •

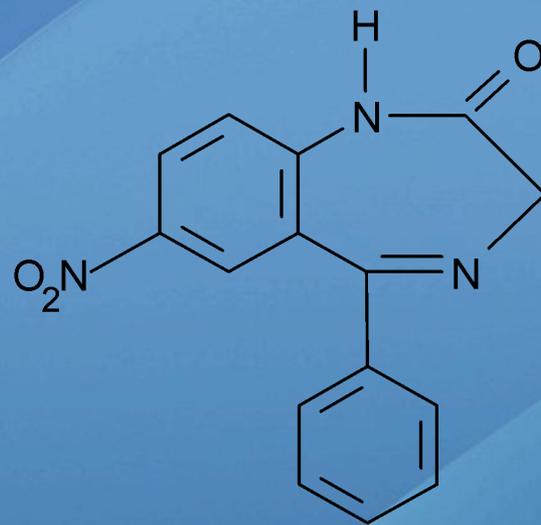
- Лекарственные вещества этой группы содержат фенильный радикал при C_5 и являются производными 5-фенил-3Н-1,4-бензодиазепина (хлзепид) и 1,2-дигидро-3Н-1,4-бензодиазепин-2-она (сибазон, нитразепам, нозепам, феназепам и др.):



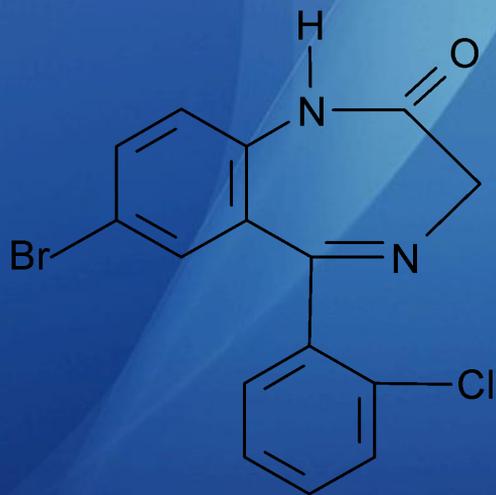
1,2-дигидро-3Н-1,4-бензодиазепин-2-он



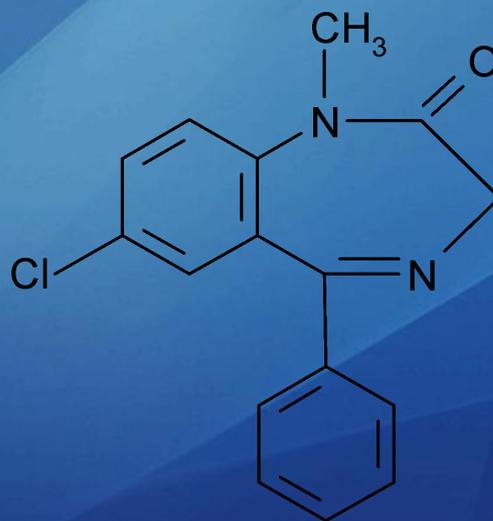
хлозепид



нитрозепам



феназепам



сибазон

Свойства

Растворимость. Большинство 1,4-бенздиазепинов представляют собой бесцветные, хорошо кристаллизующиеся вещества. Практически нерастворимы в воде, растворимы в воде соли 1,4-бенздиазепинов, содержащих амино- (как у хлордиазепоксида) или карбоксильную группу в качестве заместителей. В органических растворителях растворимость зависит от структуры. Наиболее высокая растворимость наблюдается в апротонных растворителях (диметилформамиде, диметилсульфоксиде).

Свойства

Кислотно-основные свойства 1,4-бенздиазепины являются слабыми основаниями. Основность увеличивается при наличии основных заместителей. Так, хлордиазепоксид дает устойчивые соли с сильными кислотами, выступая в качестве днокислотного основания.

При введении в ядро 1,4-бенздиазепинов нитро-, окси- и других групп основность соединений снижается.

1,2-дигидропроизводные 1,4-бенздиазепина (оксазепам, нитразепам) проявляют также слабокислые свойства за счет наличия в молекуле амидной группы.

Константы ионизации pK_{a1} и pK_{a2} , характеризующие соответственно основность атома азота в четвертом положении и кислотность амидной группы (положение 1,2).

соединения	pK_{a1}	pK_{a2}
диазепам (сибазон)	4,76	-
оксазепам (нозепам)	3,6	-
нитразепам (зуноктин)	1,6	11,1
хлордиазепоксид (хлозепид)	2,93	10,94

УФ - спектры

В электронных спектрах производных 1,4-бенздиазепина имеется 3 полосы поглощения с λ_{max} в областях:

1. 200-215 нм
2. 220-240 нм
3. 290-330 нм

Две первые полосы соответствуют возбуждению ароматических хромофоров. Третью длинноволновую полосу относят к азометиновой связи, сопряженной с бензогруппой.

По характеру поглощения в УФ-области 1,4-бенздиазепины относятся к соединениям, абсорбция которых **изменяется от величины значений pH:**

- в кислой среде – за счет протонирования атома азота;
- в щелочной среде в молекуле 1,2-дигидропроизводных 1,4-бенздиазепина наблюдается изменение хромофорной системы (увеличение сопряжения за счет лактим-лактамной таутомерии азометиновой связи в положения 1,2 - нитразепам, оксазепам).

Это свойство положено в основу идентификации соединений данной группы по электронным спектрам поглощения.

Тосикокинетика

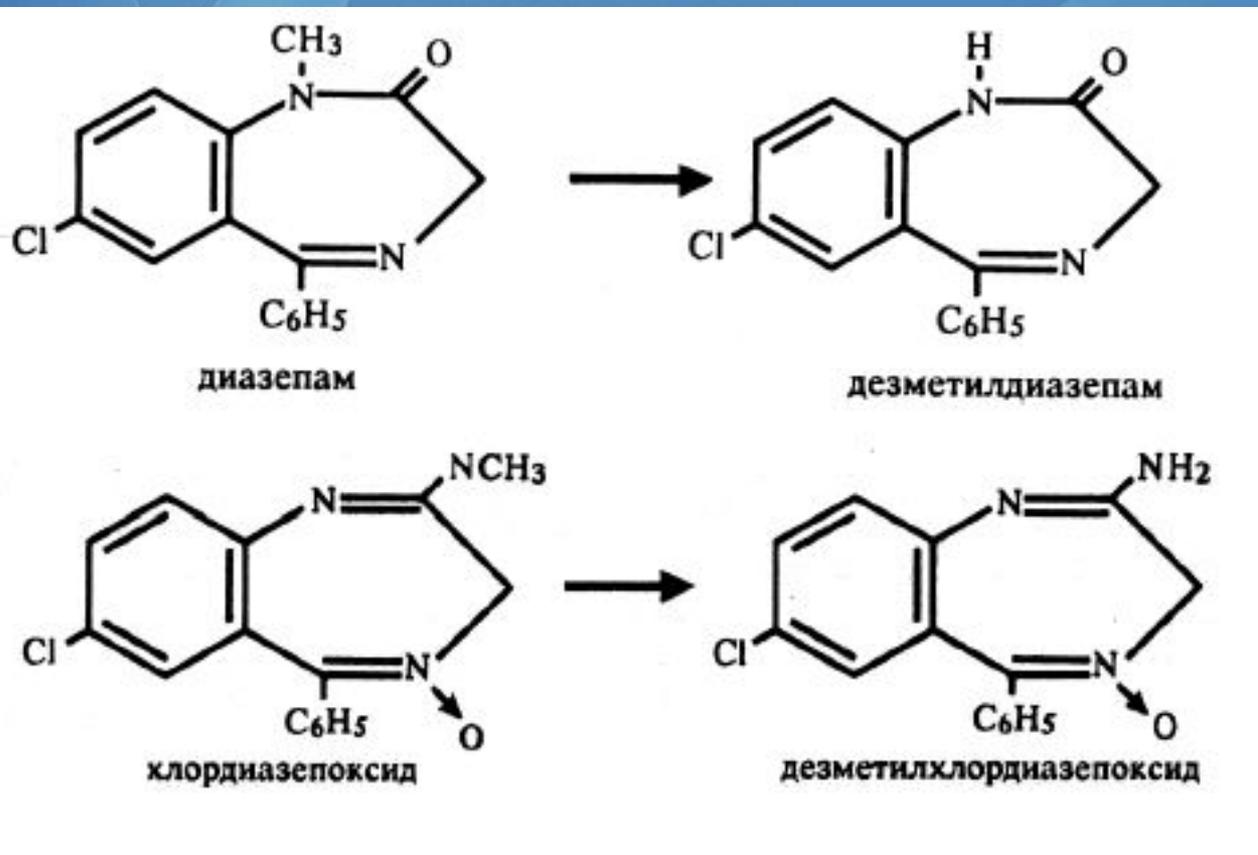
Механизм всасывания - простая диффузия. Попадая в кровь, на 80-95% связываются с белками плазмы, поэтому скорость абсорбции достаточно высокая (градиент концентрации направлен в кровь).

Максимальная концентрация в крови при введении через рот достигается через 2-5 часов после введения терапевтических доз и через 4-8 часов – токсических доз препаратов. Далее концентрация их в крови сохраняется в течение 2-х часов на одном уровне, после чего начинает медленно снижаться.

Наибольшее содержание 1,4-бенздиазепинов в ЖКТ, тканях печени, почек.

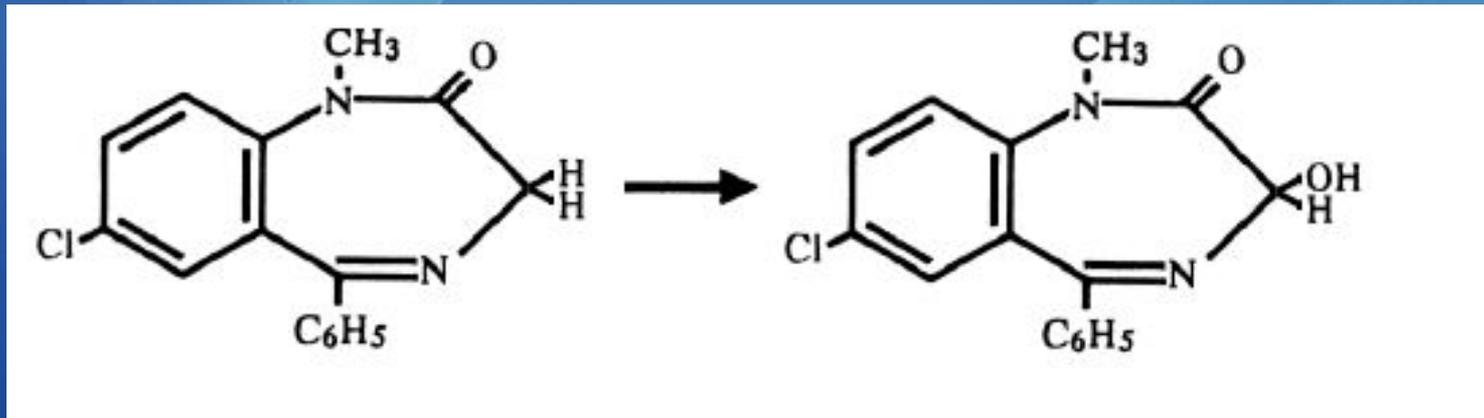
метаболизм

1. N - деметилирование



метаболизм

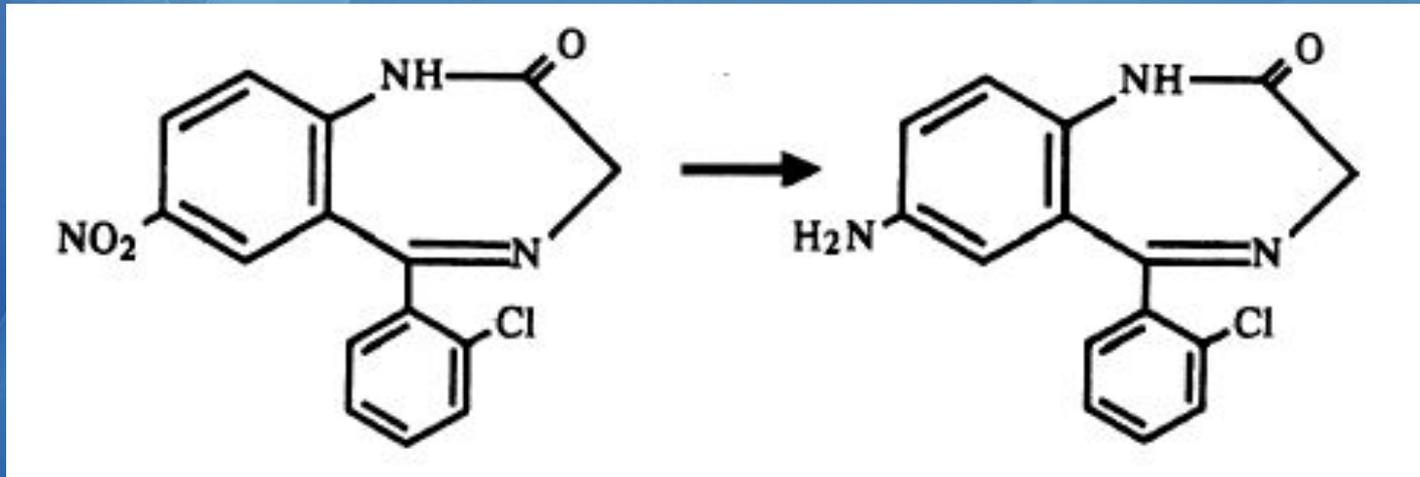
2. гидроксילирование



сибазон

метаболизм

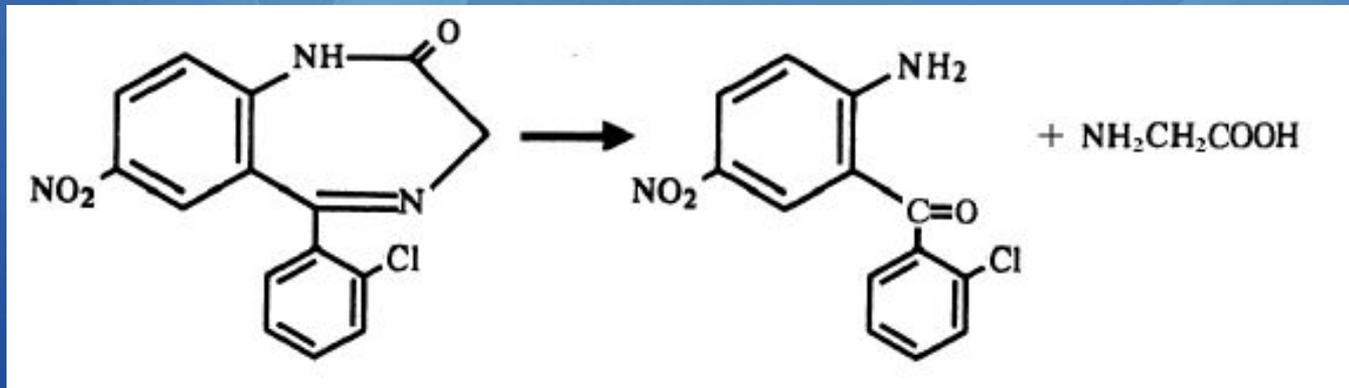
3. Восстановление нитрогруппы



нитразепам

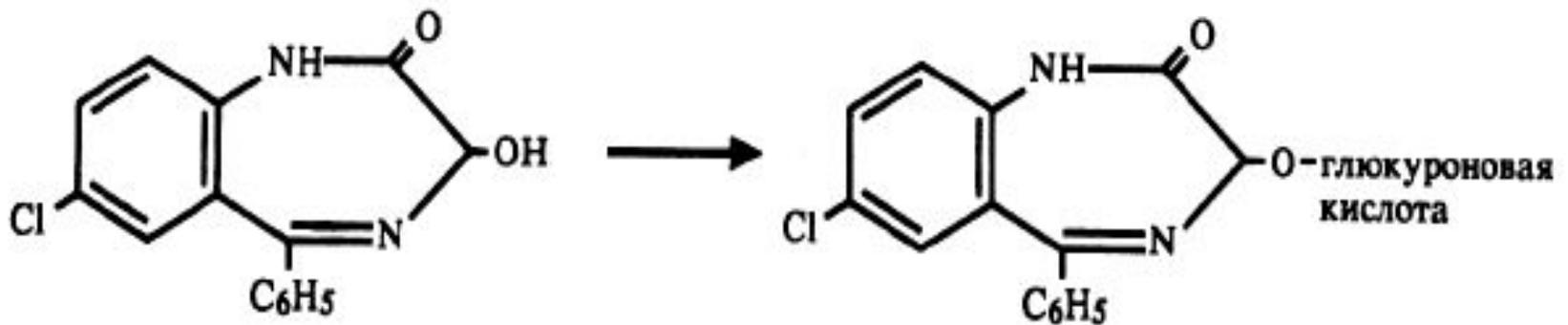
метаболизм

4. Гидролиз



метаболизм

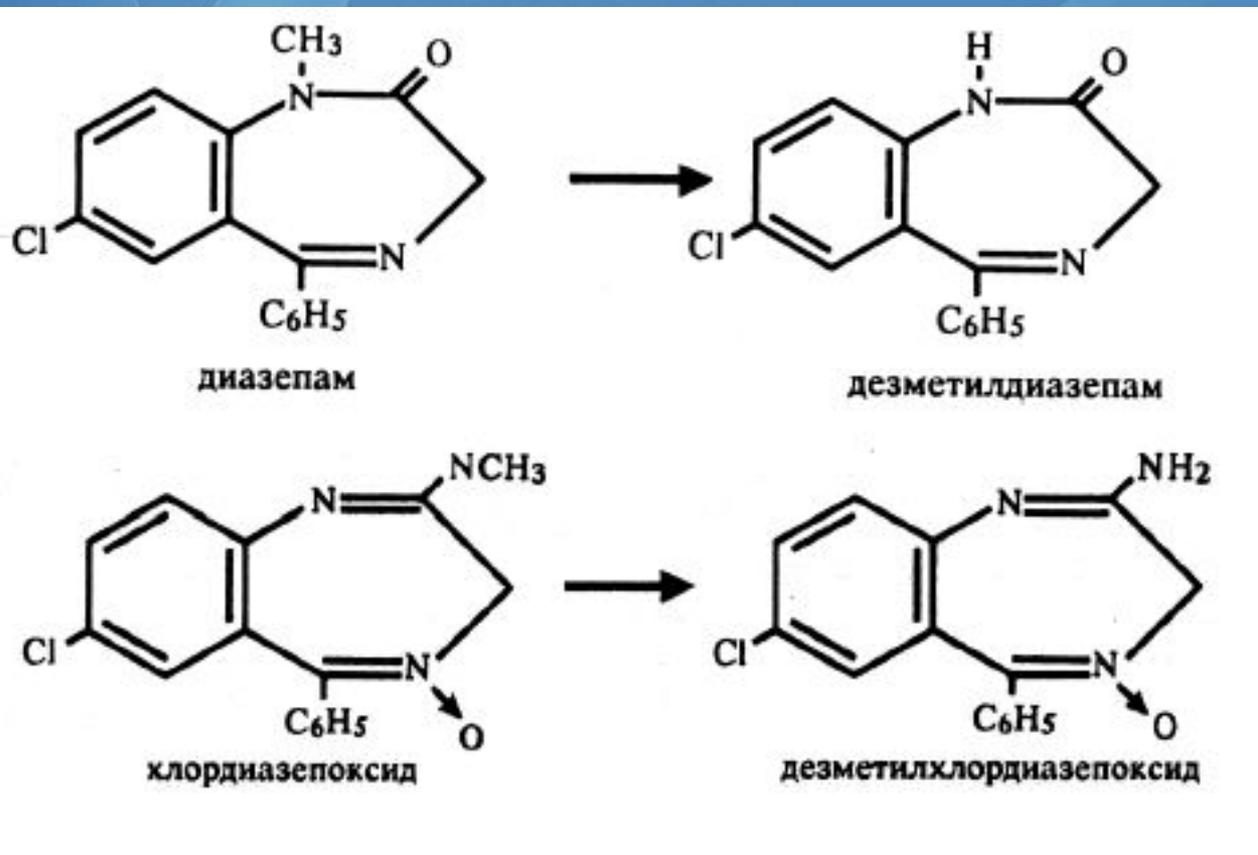
5. конъюгирование



оксазепам

метаболизм

1. N - деметилирование



- Метаболиты, образованные в результате процессов окисления и восстановления, фармакологически активны. Наибольшей активностью обладают метаболиты, полученные в процессе деалкилирования.
- Разрыв азепинового кольца при гидролизе 1,4- бенздиазепинов и образование глюкуронидов приводит к потере фармакологической активности.
- Наряду с основными соединениями продукты метаболизма обнаруживаются во всех тканях организма.

Выводятся, в основном, почками в виде основных соединений и метаболитов.

Время полувыведения ($T_{1/2}$) при введении соединений через рот

хлордиазепоксид - 8-28 часов

диазепам - 20-42 часа

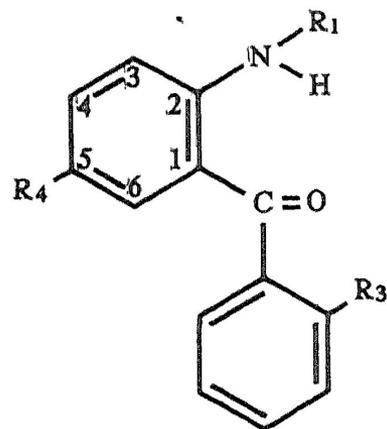
оксазепам - 10-14 часов

нитразепам - 7-10 часов

Интервал $T_{1/2}$ зависит от принятой дозы

$LD > 500$ мг

Гидролиз



Бензодиазепины	Продукт гидролиза — бензофенон	
	Наименование	Сокращение
Оксазепам	2-амино-5-хлорбензофенон	АХБ
Хлордiazепоксид	"	"
Диазепам	2-метиламино-5-хлорбензофенон	МБХ
Нитразепам	2-амино-5-нитробензофенон	АНБ
Феназепам	(2-амино,5-бром), 2'-хлорбензофенон	АБХБ

Спасибо за внимание!!!))