

Bogdan Szukalski, Ewa Mirkiewicz, Jerzy Walkowiak
Zakład Biochemii Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie

PRZYDATNOŚĆ METOD FPIA, HPTLC I HPLC DO BADANIA W MOCZU BARBITURANÓW OBJĘTYCH KONTROLĄ MIĘDZYNARODOWĄ

WSTĘP

Pochodne kwasu barbiturowego stanowią dość jednorodną grupę leków stosowanych jako środki uspokajające, nasenne i przeciwdrgawkowe o bardzo wąskim wskaźniku terapeutycznym tj. małej różnicy między dawką leczniczą i toksyczną. Nie wpływają one wyraźnie na percepcję bólu, nie są więc skuteczne jako środki nasenne lub uspokajające w przypadkach, gdy występuje nawet niezbyt silny ból (2). Barbiturany wprowadzono po raz pierwszy do lecznictwa na początku XX wieku (barbital w 1903 r., fenobarbital w 1912 r.) i dotychczas zsyntetyzowano ich ponad 2500, jednak obecnie produkuje się i używa w lecznictwie tylko około pięćdziesięciu. Stosowane są często w postaci mieszanin (np. amobarbital, sekobarbital) lub w połączeniu z innymi lekami (kofeina, aspiryna, efedryna, teofilina i kodeina) (14).

Barbiturany są dość często nadużywane w celach poprawienia nastroju (mogą one wywierać działanie euforyczne podobne do morfiny), zniesienia uczucia lęku i nieprzyjemnych efektów przedawkowania środków psychostymulujących. Nadużywanie barbituranów może prowadzić do zależności psychicznej i fizycznej a ich odstawieniu może towarzyszyć groźny dla życia zespół abstynencyjny. Obserwuje się również zjawisko tolerancji, które wiąże się ze stymulującym działaniem barbituranów na własny metabolizm. Pacjenci, u których rozwija się tolerancja, zwiększają często dawki leku lub skracają odstępy między nimi.

Z uwagi na te własności 12 pochodnych kwasu barbiturowego objęto kontrolą międzynarodową (Konwencje Środków Psychotropowych, 1971). Są to: allobarbi-

tal, amobarbital, barbital, butalbital, butobarbital, cyklobarbital, metylofenobarbital, pentobarbital, fenobarbital, sekbutabarbital, sekobarbital i winylbital.

Wg statystyk INCB (5) w ciągu ostatniego dziesięciolecia największą rolę odgrywały: amobarbital, butalbital, pentobarbital i fenobarbital oraz cyklobarbital.

Nazwy potoczne barbituranów ilustrują w pewnym stopniu ich spodziewane działanie, np. „środki dołujące” (amobarbital), „pigułki goryla” (amobarbital + sekobarbital) lub są związane z kolorem tabletek albo nazwą firmy produkującej, np. „czerwone serca” (fenobarbital), „żółty żakiet” lub „żółcień meksykańska” (pentobarbital), Lilly (sekobarbital).

Barbiturany można podzielić na działające długo, średnio, krótko i bardzo krótko. Barbiturany długo działające (np. fenobarbital) są nadużywane rzadko, ponieważ bardzo wolno penetrują do mózgu i nie dają oczekiwanego efektu euforycznego. Krótko działające barbiturany (np. pentobarbital, sekobarbital) są nieźle rozpuszczalne w tłuszczach, dość szybko przechodzą więc przez barierę krew-mózg i w ciągu 30 minut wywołują sedację i znoszą uczucie lęku. Barbiturany działające bardzo krótko (np. tiopental) są wysoce lipofilne, wywołują efekt szybko i są stosowane jako anestetyki. Po podaniu dożylnym błyskawicznie penetrują do mózgu i wywołują sen po upływie 30 sek. Efekt ten jest jednak krótki, gdyż szybko ulegają redystrybucji z krwi do tkanek bogatych w lipidy.

Przewlekłe przyjmowanie barbituranów o krótkim czasie działania, np. sekobarbitalu w dawce 600-800 mg przez miesiąc, prowadzi do psychicznego i fizycznego uzależnienia. Im wyższa dawka, tym silniejsze uzależnienie i tym cięższe objawy zespołu abstynencyjnego. U osoby uzależnionej, która przestała przyjmować krótko działający barbituran, w ciągu 24 godzin pojawiają się słabe cechy zespołu abstynencyjnego, które zwykle nasilają się z upływem czasu i w 3-8 dobie mogą osiągnąć postać zagrażającą życiu.

Od początku lat 90. obserwuje się stopniowy wzrost nadużywania barbituranów przez młodocianych. W USA w 1995 r. aż 7,4% uczniów kończących szkołę zażywało barbiturany, podczas gdy w r. 1992 – tylko 5,5% (dane nie obejmują leków przepisywanych przez lekarzy) (3, 6). Wzrost ten jest częściowo spowodowany dalekim od prawdy przekonaniem o niewielkim ryzyku zatrucia barbituranami (12).

W Polsce ważny problem stanowią barbiturany używane przez narkomanów opiatowych jako zwiększający efekt dodatek do preparatów otrzymanych ze słomy makowej lub dobierane jako uzupełnienie otrzymywanego w celach leczniczych metadonu. Dlatego kontrola abstynencji pacjentów uczestniczących w programach metadonowych obejmuje również badanie moczu na obecność barbituranów, najczęściej przy użyciu metody immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym (FPIA), która pozwala nie tylko wykryć obecność pochodnych kwasu barbiturowego, ale również określić ich przybliżoną zawartość w moczu. Nie dostarcza ona jednak żadnych informacji na temat rodzaju obecnych w moczu barbituranów. Nie wiadomo również w jakim stopniu poszczególne barbiturany reagują z przeciwciałami testu wyskalowanego przez producenta na sekobarbital. Znaczne różnice w tym zakresie mogą utrudnić wykrycie jednych związków prowadząc do wyników fałszywie ujemnych lub

znacznie zawyżyć ilościowe wyniki innych przyczyniając się do otrzymania wyników fałszywie dodatnich (11).

MATERIAŁ I METODY

Allobarbitał (kwas 5,5-diallilobarbiturowy), amobarbitał (kwas 5-etylo-5-izopentylobarbiturowy), barbital (kwas 5,5-dietylobarbiturowy), butalbital (kwas 5-allilo-5-izobutylobarbiturowy), butobarbitał (kwas 5-etylo-5-butylobarbiturowy), fenobarbitał (kwas 5-etylo-5-fenylobarbiturowy), pentobarbitał (kwas 5-etylo-5- (1-metylobutylo)-barbiturowy), sekobarbitał (kwas 5-allilo-5 (1-metylobutylo) barbiturowy) (wszystkie firmy Sigma) przygotowano w postaci podstawowych roztworów w metanolu o stężeniu 5 mg/ml, a następnie dodawano do czystego moczu (pH 5-8), aby stężenia poszczególnych związków wyniosły w nim 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 1000, 1500, 2000, 3000, 5000 lub 6000 ng/ml.

Oznaczenie wykonywano metodą immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym (FPIA) (7, 10) przy użyciu zestawu TDx Barbiturates II U Assay System (10, 15). Reaktywność poszczególnych barbituranów wobec przeciwciał testu (w %) obliczano jako stosunek średniej z sześciu odczytów do stężenia związku w próbce pomnożony przez 100.

Materiałem użytym do identyfikacji barbituranów był mocz 9 pacjentów Oddziału Detoksykacyjnego IPN, wybranych spośród 60 uczestników programu metadonowego. W moczu tych pacjentów badania skriningowe wykazały obecność barbituranów, chociaż byli oni zobowiązani do przestrzegania abstynencji.

Do rozdziału mieszaniny barbituranów zastosowano metodę wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej (HPTLC) (7, 8) oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) (4, 9). Izolację barbituranów z moczu przed rozdziałem chromatograficznym prowadzono metodą ekstrakcji ciecz-ciało stałe (1, 8, 13) stosując kolumny z sorbentem krzemionkowym (Bond Elut Certify Extraction Columns-Varian) oraz urządzenie do ekstrakcji pod regulowaną próżnią (Analychem Vac Elut SPS 24™-Varian).

Kolumnę przygotowano do ekstrakcji przepuszczając pod niewielką próżnią kolejno 2 ml metanolu i 2 ml 0,1 M buforu fosforanowego o pH 6, następnie podawano badany materiał (najczęściej 5 ml moczu z dodatkiem 2 ml 0,1 M buforu fosforanowego o pH 6), płukano kolumnę mieszaniną buforu fosforanowego o pH 6 i metanolu w stosunku 80:20 oraz 1 ml 1M kwasu octowego, suszono ją przez 5 minut pod próżnią (380 mm Hg) i powtórnie płukano 1 ml heksanu.

Barbiturany eluowano z kolumny za pomocą 4 ml chlorku metylenu.

Eluat odparowywano do sucha w strumieniu azotu w temperaturze ok. 40°C i suchą pozostałość rozpuszczano w 100 µl octanu etylowego.

Rozdział mieszaniny barbituranów prowadzono na płytkach o wymiarach 10x10 cm pokrytych żelem krzemionkowym (Silica-gel G-60 F₂₅₄-Merck), stosując następujące układy rozwijające:

Układ A. Octan etylowy – metanol – 25% roztwór NH₃ (85:10:5)

Układ B. Chloroform – aceton (80:20)

Układ C. Alkohol izopropylowy – chloroform – 25% roztwór NH₃ (90:90:20)

Do lokalizacji poszczególnych barbituranów na chromatogramach użyto lampę UV (254 nm) po uprzedniej ekspozycji chromatogramów na pary amoniaku oraz spryskiwanie odczynnikami rtęciowo-difenylokarbazonowym, który otrzymywano przez zmieszanie równych objętości świeżo przygotowanych roztworów difenylokarbazonu (0,1 g difenylokarbazonu w 50 ml etanolu) i chlorku rtęciowego (1 g chlorku rtęciowego w 50 ml etanolu).

Rozdział mieszaniny barbituranów metodą HPLC prowadzono na wysokosprawnym chromatografie cieczowym firmy Shimadzu z detektorem spektrofotometrycznym. Stosowano detekcję przy długości fali 210 nm. Używano kolumny chromatograficzne długości 250 mm z wypełnieniem typu RP-18, o średnicy ziaren 5 µm. W celu wybrania odpowiedniej fazy ruchomej porównano własności rozdzielcze układu acetonitryl-alkohol-woda o następujących objętościowych stosunkach poszczególnych składników:

- 1) 5/4/11 (25%:20%:55%) Faza 1
- 2) 7/4/9 (35%:20%:45%) Faza 2
- 3) 1/1/3 (20%:20%:60%) Faza 3
- 4) 2/3/5 (20%:30%:50%) Faza 4
- 5) 2/1/7 (20%:10%:70%) Faza 5
- 6) 5/3/17 (20%:12%:68%) Faza 6

Ponieważ zbyt duży udział procentowy acetonitrylu w fazie ruchomej (Faza 2) uniemożliwia rozdział badanej mieszaniny a zwiększenie w niej procentowego udziału metanolu powoduje skrócenie czasów retencji badanych związków (Faza 5, Faza 3, Faza 4) jako optymalną uznano fazę ruchomą o składzie acetonitryl – metanol – woda (20:12:68) (Faza 6). Szybkość przepływu wynosiła 0,5 ml/min a temperatura kolumny 25°C.

Przygotowano mieszaninę wzorcową 8 barbituranów: allobarbitalu, fenobarbitalu, butalbitalu, pentobarbitalu, barbitalu, sekobarbitalu, butobarbitalu, amobarbitalu o stężeniu 1,5 µg/ml każdego związku. Na kolumnę wstrzykiwano jednorazowo 50 µl mieszaniny, tj. po 75 ng każdego barbituranu.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

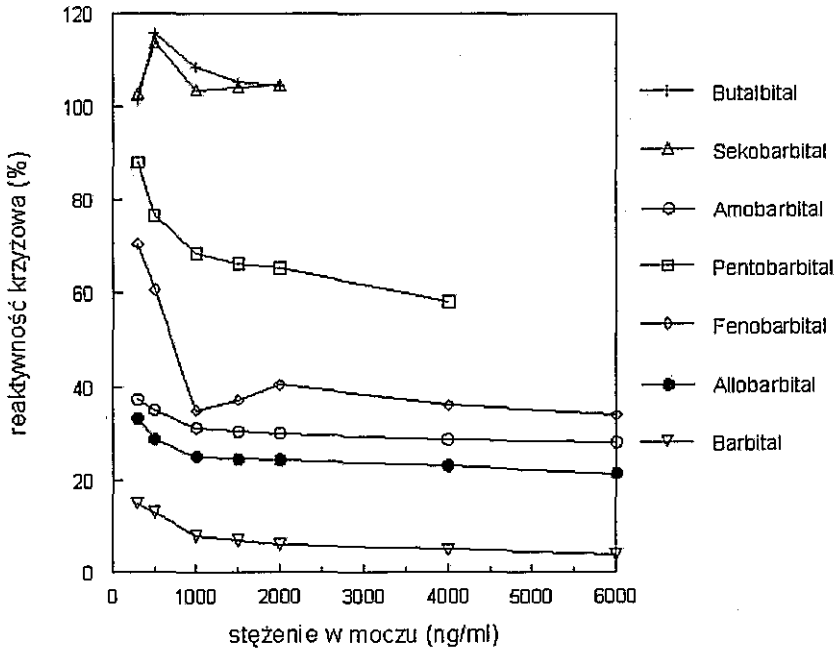
W tabeli 1 zestawiono reaktywność wobec przeciwciał testu ośmiu pochodnych kwasu barbiturowego przy ich różnych stężeniach w próbce moczu. W formie graficznej zależności te przedstawiają ryciny 1 i 2.

Tylko dla sekobarbitalu i butalbitalu metoda Abbotta mierzy ich rzeczywiste stężenia w moczu i uzyskane wyniki ilościowe są miarodajne. Reaktywność dla obu tych związków jest bardzo bliska 100% i nie zmienia się w granicach stężeń od 300-2000 ng/ml.

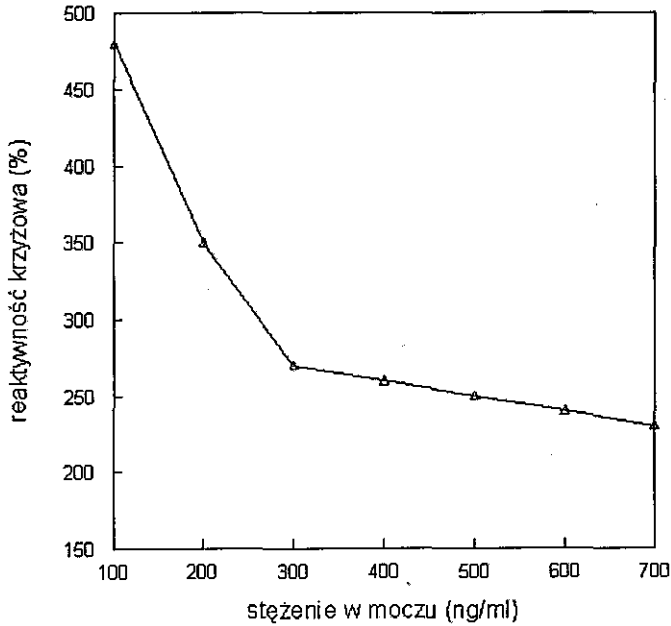
Dla pozostałych barbituranów, z wyjątkiem butobarbitalu, reaktywność wobec przeciwciał jest niższa od 100% i ulega obniżeniu ze wzrostem stężenia związku. O ile jednak dla pentobarbitalu i fenobarbitalu różnica ta nie jest zbyt duża (dla stężenia 300 ng/ml wynosi, odpowiednio, 80,0% i 70,4%), to dla amobarbitalu i allobarbitalu jest ona znaczna (dla 300 ng/ml wynosi, odpowiednio, tylko 37,3% i 33,2%). Przy

TABELA I
Reaktywność barbituranów wobec przeciwciał testu FPIA

Stężenie w moczu (ng/ml)	Sekobarbital		Butalbital		Amobarbital		Pentobarbital		Fenobarbital		Allobarbital		Barbital		Butobarbital	
	Stężenie odczytane (ng/ml)	Reaktywność (%)	Stężenie odczytane (ng/ml)	Reaktywność (%)	Stężenie odczytane (ng/ml)	Reaktywność (%)	Stężenie odczytane (ng/ml)	Reaktywność (%)	Stężenie odczytane (ng/ml)	Reaktywność (%)	Stężenie odczytane (ng/ml)	Reaktywność (%)	Stężenie odczytane (ng/ml)	Reaktywność (%)	Stężenie odczytane (ng/ml)	Reaktywność (%)
100	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	480	480
200	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	700	350
300	309	103,0	305	101,7	112	37,3	264	88,0	211	70,4	100	33,2	45	15,0	810	270
400	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1040	260
500	571	114,2	580	116,0	175	35,0	393	76,5	302	60,5	143	28,7	65	13,0	1050	250
600	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1440	240
700	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1610	230
1000	1036	103,6	1086	108,6	312	31,2	684	68,4	350	35,0	250	25,0	80	8,0	---	---
1500	1563	104,2	1578	105,2	456	30,4	993	66,2	558	37,2	366	24,4	105	7,0	---	---
2000	2092	104,6	2090	104,5	600	30,0	1308	65,3	804	40,4	484	24,2	120	6,0	---	---
4000	---	---	---	---	1144	28,6	2320	58,0	1440	36,0	920	23,0	200	5,0	---	---
6000	---	---	---	---	1680	28,0	---	---	2028	33,8	1272	21,2	240	4,0	---	---



Ryc. 1 Reaktywność barbituranów wobec przeciwciał testu FPIA przy różnych stężeniach w moczu.



Ryc. 2 Zmiany reaktywności butobarbitalu ze wzrostem stężenia w moczu.

oznaczaniu ilości amobarbitalu i allobarbitalu metodą FPIA otrzymywane wartości są więc nieadekwatne do ich rzeczywistego stężenia w moczu.

Reaktywność barbitalu wobec przeciwciał testu jest bardzo niska i maleje szybko ze wzrostem stężenia (dla 300 ng/ml – 15% a dla 6000 ng/ml zaledwie 4%). Związek ten jest praktycznie niewykrywalny metodą FPIA nawet przy wysokim stężeniu (wynik fałszywie ujemny).

Bardzo wysoką reaktywnością wyróżnia się natomiast butobarbital. Dla 300 ng/ml wynosi ona 460%, maleje ze wzrostem stężenia, osiągając dla 700 ng/ml wartość 260%. Tak więc już przy stężeniu butobarbitalu niewiele przekraczającym 100 ng/ml wynik badania metodą FPIA będzie dodatni (przekroczy wartość cut-off dla barbituranów), chociaż wg powszechnie uznawanego kryterium – jest on fałszywie dodatni. Również wyniki ilościowe będą bardzo zawyżone.

Z otrzymanych wyników można również wyciągnąć pewne wnioski na temat zależności między budową chemiczną barbituranów a ich zdolnością do wiązania się z przeciwciałami testu. Sekobarbital i allobarbital, których reaktywność jest podobna, wykazują również analogie strukturalne polegające na tym, że w obu związkach przy węglu 5 występuje nienasycony rodnik allilowy oraz nasycony rodnik izobutyłowy. Porównanie reaktywności innych barbituranów pozwala zestawić występujące w nich rodniki przy węglu 5 w następujący szereg o rosnącym wpływie na zdolność wiązania z przeciwciałami testu Abbotta: etylowy, izopentyłowy, metylobutyłowy, fenyłowy i butyłowy.

W tabeli 2 zestawiono wartości R_f ośmiu barbituranów objętych kontrolą międzynarodową w trzech układach rozwijających.

Żaden z tych układów nie daje dobrego rozdziału wszystkich barbituranów. Układ A pozwala uzyskać na chromatogramie oddzielne plamy fenobarbitalu i amobarbitalu oraz 3 plamy zawierające po 2 związki: barbital i allobarbital, butalbital i butobar-

TABELA 2
Wartości R_f barbituranów w trzech układach rozwijających (metoda HPTLC)

	Układy rozwijające		
	A	B	C
Barbital	37,1	50,0	48,6
Pentobarbital	48,6	58,6	67,1
Allobarbital	37,1	54,3	50,0
Amobarbital	45,7	57,1	64,3
Secobarbital	48,6	60,0	70,0
Butalbital	44,3	58,6	64,3
Butobarbital	45,7	54,3	64,3
Fenobarbital	27,1	45,7	35,7

Układ A		Układ B		Układ C	
*Octan etylu	85	* Chloroform	80	* Alkohol izopropylowy	90
* Metanol	10	* Aceton	20	* Chloroform	20
* 25% Amoniak	5			* 25% Amoniak	5

TABELA 3
Wyniki analizy moczu narkomanów metodą FPIA i HPTLC

Pacjent	Barbiturany (ng/ml)	Barbital	Butalbital	Pentobarbital	Allobarbital	Sekobarbital	Amobarbital	Butabarbital	Fenobarbital	Benzodiazepiny (ng/ml)	Opiaty (ng/ml)
S.Z.	480	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
B.J.	>2000	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
J.L.	1000	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
W.J.	>2000	-	-	-	-	-	-	-	+	>1000	-
P.M.	386	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
P.W.	1339	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
P.G.	1036	-	-	-	-	-	-	-	+	>2000	>1000
M.J.	1448	-	-	+	-	-	-	-	+	558	>1000
Ch.P.	913	-	-	-	-	-	-	-	+	>2000	620

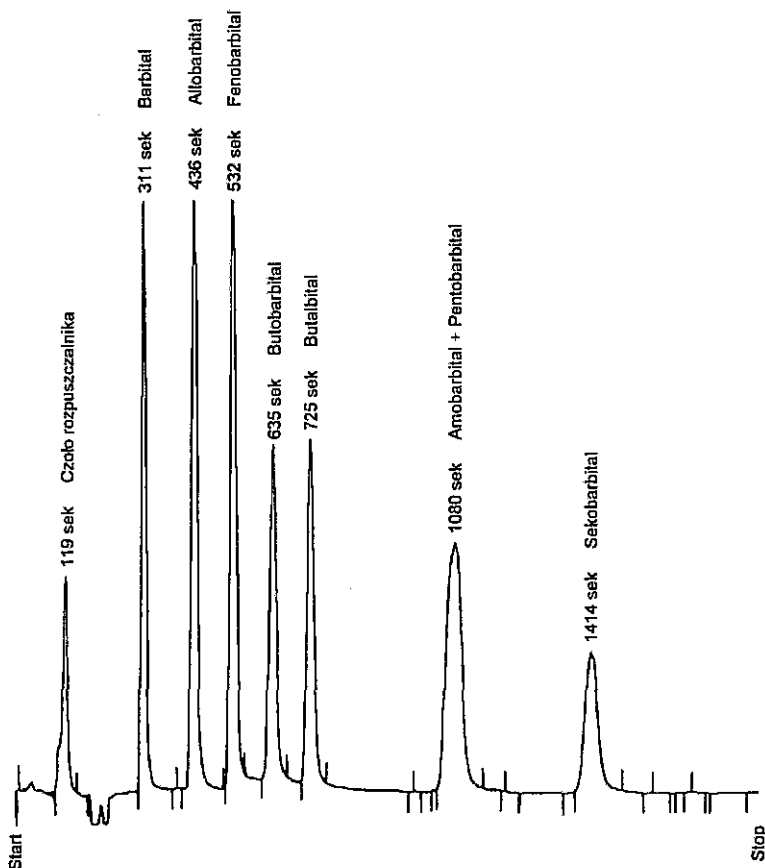
+ wyraźna plama widoczna w świetle UV (254 nm) oraz po wybarwieniu odczynnikiem rtęciowo-difenylokarbazynowym

bital oraz sekobarbital i pentobarbital. Dwie pierwsze pary związków można rozdzielić stosując układ B, a trzecią parę – przy użyciu układu C.

Tabela 3 przedstawia wyniki analizy moczu 9 narkomanów metodą FPIA i HPTLC. Stężenia „puli” barbituranów oznaczanych metodą FPIA wahały się od 386 do >2000 ng/ml. Wynik 386 ng/ml był na granicy wartości cut-off dla barbituranów, natomiast w 6 przypadkach stężenie barbituranów przekraczało 1000 ng/ml.

W sześciu badanych próbkach moczu wykryto tylko fenobarbital, w jednej fenobarbital i pentobarbital, a w dwóch allobarbital. W moczu, w którym stężenie barbituranów mierzone metodą FPIA wynosiło 386 ng/ml, intensywność plamy fenobarbitalu na chromatogramie była bardzo słaba.

Ryc. 3. przedstawia chromatogram mieszaniny ośmiu barbituranów otrzymany metodą HPLC i czasy retencji poszczególnych związków. Metoda ta daje znacznie lepszy rozdział barbituranów niż HPTLC. Z wyjątkiem amobarbitalu i pentobarbita-



Ryc. 3 Chromatogram mieszaniny barbituranów otrzymany metodą HPLC i czasy retencji poszczególnych związków (kolumna: długość 250 mm Spherisorb ODS-1 o średnicy ziarna 5 μ m; faza ruchoma: acetonitryl – metanol – woda (20: 12: 68); szybkość przepływu: 0,5 ml/min; temperatura kolumny: 25°C; detektor spektrofotometryczny (210 nm)).

lu, które w tych warunkach nie rozdzielają się, wszystkie związki występują w postaci dobrze odseparowanych pików. HPLC jest również znacznie bardziej czuła niż HPTLC, gdyż pozwala wykryć 75 ng barbituranu.

Jednak zastosowana przez nas metoda ekstrakcji próbek moczu narkomanów, poprzedzająca właściwy proces chromatograficzny, okazała się mało skuteczna, być może z powodu obecności w moczu wysokich stężeń benzodiazepin i opiatów (Tabela 3). W rezultacie na chromatogramie występowały dodatkowe piki, które pogarszały rozdział barbituranów i sprawiały, że obrazy chromatograficzne były mało czytelne i trudne do interpretacji.

Zastosowanie HPTLC do analizy złożonej mieszaniny barbituranów w moczu narkomanów wymaga więc udoskonalenia i optymalizacji systemu oczyszczania ekstraktu moczu przed podaniem go na kolumnę chromatograficzną.

WNIOSKI

1. Metoda immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym (FPIA) daje dobre wyniki przy badaniu sekobarbitalu, butalbitalu, a także pentobarbitalu i fenobarbitalu, gdyż ich reaktywność wobec przeciwciał testu jest wysoka w dość szerokim zakresie stężeń.

2. Dla amobarbitalu i allobarbitalu reaktywność stanowi ok. 1/3 wartości wzorcowego sekobarbitalu i maleje ze wzrostem stężenia związków. Oznacza to, że związki te mogą być wykryte metodą FPIA jednak wyniki ilościowe są zaniżone.

3. Barbitalu nie można praktycznie wykryć w moczu metodą FPIA, gdyż reaguje on z przeciwciałami testu barbituranowego w stopniu niewystarczającym do uzyskania wyniku dodatniego.

4. Butobarbital wykazuje bardzo wysoką reaktywność wobec przeciwciał testu i przy stężeniu dużo niższym od wartości cut-off dla barbituranów daje wynik dodatni.

5. Metoda HPTLC może służyć do identyfikacji ważniejszych barbituranów, ale wymaga zastosowania dwóch lub trzech układów rozwijających. Ponadto czułość metody jest niska.

6. Wysokosprawna chromatografia cieczowa daje dobry rozdział mieszaniny barbituranów i jest bardziej czuła od HPTLC, wymaga jednak bardzo starannego i czasochłonnego oczyszczenia ekstraktu moczu przed podaniem na kolumnę chromatograficzną.

STRESZCZENIE

Celem pracy było zbadanie przydatności trzech metod analitycznych opartych na różnych zasadach fizyko-chemicznych (FPIA, HPTLC i HPLC) do wykrywania i identyfikacji ośmiu barbituranów, które z racji swego działania psychotropowego zostały objęte kontrolą międzynarodową. Przydatność FPIA oceniano oznaczając reaktywność poszczególnych barbituranów wobec przeciwciał testu oraz zależność reaktywności od stężenia. FPIA daje dobre wyniki przy badaniu sekobarbitalu, butalbitalu, a także pentobarbitalu i fenobarbitalu, gdyż reaktywność tych związków z przeciwciałami jest wysoka w dość szerokim zakresie stężeń.

Dla amobarbitalu i allobarbitalu reaktywność stanowi ok. 1/3 wartości wzorcowego sekobarbitalu i maleje ze wzrostem stężenia związków.

Barbital reaguje z przeciwciałami testu barbituranowego w stopniu niewystarczającym do uzyskania wyniku dodatniego, a butobarbital daje dodatni wynik testu przy stężeniu dużo niższym od wartości cut-off dla barbituranów.

Do identyfikacji barbituranów w moczu 9 narkomanów zastosowano metodę wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej (HPTLC). W moczu 6 pacjentów wykryto tylko fenobarbital, w moczu jednego – fenobarbital i pentobarbital a w moczu dwóch – allobarbital. Metoda ta może służyć do identyfikacji ważniejszych barbituranów, ale wymaga zastosowania przynajmniej dwóch układów rozwijających.

Bogdan Szukalski, Ewa Mirkiewicz, Jerzy Walkowiak
**Usefulness of FPIA, HPTLC, and HPLC methods in urinalysis for
internationally controlled barbiturates**

Summary

The aim of the study was to assess usefulness of three analytic methods based on different physicochemical principles (FPIA, HPTLC, and HPLC) for detection and identification of eight barbiturates that due to their psychotropic action have been submitted to international control. FPIA utility was assessed by determining particular barbiturates reactivity to test antibodies, as well as the relationship between reactivity and concentration. FPIA turned out to give good results in detection of Secobarbital, Bitalbital, as well as Pentobarbital and Phenobarbital, since reactivity of these compounds with antibodies is high for a quite wide range of concentrations.

As regards Amobarbital and Allobarbital, reactivity constitutes about 1/3 of the standard Secobarbital value, and decreases with the compounds concentration increase.

Barbital reacts with the barbiturate test antibodies in a degree insufficient to obtain a positive result, while Barbital yields a positive test result for concentrations much lower than the cut-off value for barbiturates.

The High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC) method was used to detect barbiturates in urine of 9 drug users. In 6 cases Phenobarbital only was detected, in one case – Phenobarbital and Pentobarbital, while in the remaining two cases – allobarbital. The method may serve to identify major barbiturates, but it requires at least two developing systems.

Key words: urinalysis / barbiturates / laboratory methods

PIŚMIENNICTWO

1. Breiter J., Hegler R., Lang H., *Evaluation of column extraction: A new procedure for the analysis of drugs in body fluids*, Forensic Sci., 1976, 7, 131-135.

2. Brown R.T., Coupey S.M., *Illicit drugs of abuse, Adolescent Medicine: State of the Art Reviews*, 1993, 4, 321-340.
3. Chavez E.L., Swaim R.C., *An epidemiological comparison of Mexican-American and white non-Hispanic 8th – and 12th – grade students' substance use*, Am. J. Public. Health, 1992, 82, 445-447.
4. Gill R., Moffat A.C., Smith R.M., Hurdley T.G., *A collaborative study to investigate the retention reproducibility of barbiturates in HPLC with a view to establishing retention databases for drug identification*. J. Chromatogr. Sci., 1996, 24, 153-159.
5. INCB/1995/W.16, *59th Session*, 30 October – 16 November 1995
6. Johnston L.D., *Monitoring the Future Study*, University of Michigan, Ann. Arbor, MI, News release, 1995.
7. Jork H., *Quantitative HPTLC in the field of pharmaceutical applications. Proceedings of the Fourth Intern. Symposium on Instrumental High Performance Thin Layer Chromatography*, Eds. H. Traitler, A. Studer, R.E. Keiser, Selvino/Bergamo, Italy 1987, s. 193.
8. Lillsunde P., Korte T., *Drug screening in urine using solid phase extraction and combined thin-layer chromatography and gas chromatography/mass spectrometry identification*. J. Anal. Toxicol., 1991, 15, 71-81.
9. Mangin P., Lugnier A.A., Chaumont A.J., *A polyvalent method using HPLC for screening and quantification of 12 common barbiturates in various biological materials*, J. Anal. Toxicol., 1987, 11, 27-30.
10. Matsumoto H., Szukalski B., Podleśny J., Gaździk J., Wereżyńska T., Maszkiewicz J., *Zastosowanie metody immunofluorescencyjnej w świetle spolaryzowanym (FPIA) w diagnostyce laboratoryjnej uzależnień*. Ter. Monitor., 1989, 2, 23-27.
11. *Recommended Methods for Testing Barbiturate Derivative under International Control*, ST/NAR 18, United Nations, 1989.
12. Reinisch J.M., Sanders S.A., Mortensen E.L., Rubin D.B., *In utero exposure to phenobarbital and intelligence deficits in adult men*, JAMA, 1995, 274, 1518-1525.
13. Scheurer J., Moore C.M., *Solid Phase Extraction of Drugs from Biological Tissues – A review*, J. Anal. Toxicol., 1992, 16, 264-269.
14. Smith M.C., Riskin B.J., *The clinical use of barbiturates in neurological disorders*, Drugs, 1991, 42, 365-378.
15. *TDx Barbiturates II w Activation Procedure*, Abbott Laboratories Diagnostic Division, 1994.