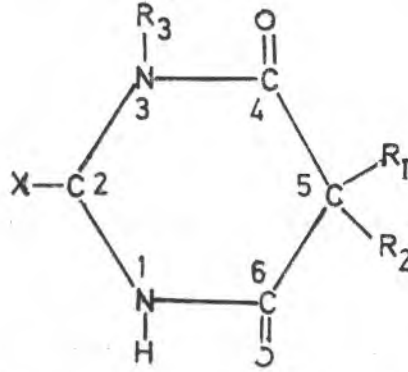


Barbitürük Asit Türevlerinin İdrardan İzolasyonları ve İnce Tabaka Kromatografisi İle Semikantitatif Tayinleri

Identification and Semiquantitative Determination of Some Barbiturates in Urine by Thin-Layer Chromatography

M. GÜLEY - N. VURAL - T. SÖYLEMEZOĞLU - A. E. KARAKAYA (*)

Barbitalin ilk defa 1903 yılında uyku ilâcı olarak kullanılması ile barbitürük asit türevlerinin sentezi hızla artmış ve 1962 de sayıları 2500 ü bulmuştur (10). Hipnotik, antikonvülzan, narkotik veya diğer ilâç gurupları ile kombine şeklinde geniş bir tatbik sahası olan barbitüratların dünyada kullanma miktarları gittikçe artmaktadır (7).



Molekül yapılarında siklik diüreid (malonilüre) halkasına sahip olan barbitürük asit türevleri ancak C₅ de hidrojenler yerine R₁ ve R₂ gibi alkil veya aril guruplarının girmesi ile biyolojik aktivite kazanırlar (8). R₁ ve R₂ den başka R₃ ve X radikallerine göre de anestetik, hipnotik, antikonvülzif özellikleri ve etki süreleri değişir.

Barbitüratlar organizmada kısmen metabolize olurlar. Kendi-

Redaksiyona verildiği tarih : 12 Ağustos 1973

(*) Toksikoloji Kürsüsü, Eczacılık Fakültesi, Ankara Üniversitesi.

lerinin ve metabolitlerinin idrarla atılma, miktar ve hızları her barbitürat türeği için farklıdır.

Örneğin Phenobarbitalin %10 - 35 inin değişmeden idrarla atıldığı ve organizmada bir hafta veya 10 gün kalabildiği tesbit edilmiştir (12). Biyolojik materyalden izole edilen birçok barbitürat metabolitlerinin strüktürleri infrared (IR) ve kütle spektrumu metotları ile aydınlatılabilmektedir (2).

Barbitüratlar, gerek adli tıp ile uğraşanları ve gerekse toksikologları ilgilendiren önemli bir ilaç gurubudur. Birçok memleketlerdeki kazaen meydana gelen zehirlenmelerde ve intihar olaylarında barbitüratlar birinci veya ikinci sırada yer almaktadırlar (13). Bu nedenle de zehirlenme ve ölüm olaylarında toksikologdan biyolojik materyalde barbitüratların aranması istenir.

Diğer taraftan barbitüratlar bugün alışkanlık yapan ilaçların başında gelmektedir. Barbitürat suistimali dünya çapında bir önem taşımaktadır ve primer veya sekonder alışkanlık yapan ilaçlar «addiction drugs» olarak tehlikelidirler (4). Alkol, opiatlar, sentetik narkotikler gibi diğer alışkanlık yapan ilaçlarla birlikte kullanılmaları olağandır (7).

İptilâ durumunda devamlı olarak yüksek doz kullanılması nedeni ile organizmada biriken barbitürat metabolitlerinin bilinmesi gerekmektedir.

Müptelâlar en çok Phanadorm, Medomin, Amytal, Pentobarbital ve Seconali tercih ederler ve bu şahıslar normal tedavi dozunun 20 misline tahammül edebilirler (7).

Hangi nedenle olursa olsun, zehirlenme olaylarında barbitüratların biyolojik materyalden izolasyonları, tanınmaları ve miktar tayinleri toksikolojinin önemli bir konusudur. Kısa zamanda hassas ve kesin sonuca varmak gerekir.

Araştırmamızda, memleketimizde kullanılan barbitüratlı ilaçların (3) aktif maddeleri olan Barbital, Pentobarbital, Phenobarbital, Phanadorm ve Itobarbital ile çalışılmıştır. Kendi laboratuvarımız şartlarında yapılan bu araştırmayı 3 kısımda tophyabiliriz :

1. Yukarda adı geçen barbitüratların idrardan izole edilerek İ.T.K. de teşhisleri
2. Semikantitatif tayinleri
3. Phenobarbitali normal dozlarda alan, normal şahıslarda bu maddenin idrarla eliminasyon hızının araştırılması.

MATERYAL ve METOD

1. Saf aktif maddeler (Metanolde %0,1 lik)
Barbital (Diethyl barbitürük asit)
Phenobarbital (Etilfenil barbitürük asit)
Pentobarbital (Etilpentil barbitürük asit)
Phanadorm - (İpnos) (Siklohekzenil etil barbitürük asit)
İtobarbital (Allil isobutil barbitürük asit)
2. Püskürtme reaktifleri
 - a — %2 HgNO₃ (%1 HNO₃'te)
 - b — %0,1 Rhodamin - B (Etil alkolde)
Kullanılmadan önce (a) ve (b) eşit hacimde karıştırılır.
 - c — %0,04 Flouresceine (Etil alkolde)
3. Developman çözeltileri :
 - a — (Kloroform + absöü Etanol + %25 NH₃) : (50 + 40 + 10)
 - b — (Kloroform + Aseton + %25 NH₃) : (40 + 72 + 8)
4. DESEGA ince tabaka kromatografisi (İ.T.K) takımı
5. Mikropipetler (0,02 ml'lik)
6. Ultraviyole lambası (366 nm)
7. Adsorban tabaka
Silicagel-G (İ.T.K için)-250 m μ (Stahl'a göre aktive edilmiş)
8. Santrifüj ve 100 ml'lik tüpleri
9. Sitrat tamponu (pH 2,2)
10. Aktif kömür (Hayvansal)

TEKNİK:

Barbitüratların idrardan izolasyonları için Mule tarafından kullanılan ekstraksiyon metodu bazı küçük değişikliklerle tatbik edilmiştir (9).

Ayrıca kloroform fazına geçen yabancı maddelerin uzaklaştırılmaları için aktif kömür kullanılması uygun görülmüştür.

20 ml idrar, 10 ml tampon (pH 2,2) ve 15 ml kloroform ile cam kapaklı erlende 15 dak. çalkalanır. Santrifüj tüpüne aktarılarak 1500 r.p.m. de 30 dak. santrifüj edilir. Ayrılan kloroform fazından sonra, aynı işlem 15 ml kloroform ile tekrarlanır. Birleştirilen kloroform fazları 500 mg hayvansal aktif kömürle 5 dak. kadar çalkalanarak süzülür ve oda temperaturünde uçmaya terk edilir.

a) Kalitatif analiz için; metanolde çözülen bakiye Silicagel-G tabakasına tatbik edilmiş, developmandan sonra tanınmaları için şu renk reaktifleri kullanılmıştır :

I — $HgNO_3$; Barbitüratlarla beyaz lekeler meydana gelir.

II — (Rhodamin—B + $HgNO_3$); önce $HgNO_3$, sonra ($HgNO_3$ + Rhodamin—B) püskürtüldüğünde barbitüratlar konsantrasyon ve barbitürat cinsine göre pembe - viyole arasında değişen renk gösterirler (1).

III — Flourescein; $HgNO_3$ 'dan sonra bu renk reaktifi püskürtülürse, barbitüratlar sarı - açık yeşil renkli lekeler halinde belirirler.

b) Kantitatif tayin için; önce standart barbitürat çözeltileri hazırlanmış ve bunlardan 0,02 ml de 2, 5, 10, 20 40, 50 μ g (Mikrogram) olmak üzere Silicagel-G adsorban tabakasına tatbik edilmiştir. Elde edilen lekelerin alanı milimetrik kâğıtla bulunarak $\sqrt{S'e}$ (leke alanı mm^2) karşı $\log C$ (μ g konsantrasyon) alınarak bir grafik çizilmiş, konsantrasyon hesaplarında bu linear kurv'dan faydalanılmıştır (11).

Ayrıca Pentobarbital ve Phenobarbital saf aktif maddelerinden belirli miktarda idrara ilâve edilerek, ekstraksiyona tâbi tutulmuştur. Yukarıdaki tatbik şartları uygulanarak; aynı konsantrasyondaki alanların karşılaştırılmasından, ekstraksiyonla elde edilen verim hesaplanmıştır.

c) Phenobarbitalin organizmadan atılış hızını takip etmek için; daha önceden ilaç almamış iki normal şahıstan idrar alınmış (boş nümune) ve saat 20.00 de ağızdan 100 mg Luminal verilmiştir. İlk 12 saatlik idrar toplandıktan sonra, 24. 48. saatlerde olmak üzere 12 gün idrar toplanmış ve böylece her şahıstan elde edilen 14 idrar numunesi ayrı ayrı ekstraksiyona tâbi tutularak İ.T.K ile Phenobarbital aranmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

1) Şekil (1) de saf aktif maddelerle elde edilen kromatogram görülmektedir. Kullandığımız bu beş tip barbitürat için gerek asit, gerek nötral karakterde (9) birçok developman çözeltileri denenmiş ve fakat (kloroform + aseton + amonyak) karışımında, polar çözücü olarak aseton yerine hacmen %40 oranında etil alkol kullanılması ile en iyi sonuç elde edilmiştir. Saf maddelerle çalışıldığında, renk reaktifi olarak yalnız $HgNO_3$ veya Rhodamin B (1) ve Flourescein ile (5) kombine edildiğinde : Rhodamin B, hem hassasiyet ($2 \mu g$ 'dan aşağı) ve hem de renk kalıcılığı bakımından daha üstün görülmüştür. Rhodamin B'nin kafeinle de reaksiyon verdiği tesbit edilmiş, fakat renk tonu daha açık pembe olup, duyarlık çok düşük bulunmuştur ($10 \mu g$ civarında).

(T a b l o : D)

Bazı developman çözeltileri ile elde edilen R_f değerleri

Barbitürat	R_{f1}	R_{f2}
Phenobarbital	0,45	0,26
Barbital	0,59	0,30
Phanadorm	0,66	0,32
Itobarbital	0,68	0,38
Pentobarbital	0,78	0,48

$R_{f1} = (CHCl_3 + EtOH + \%25 NH_3 : 50+40+10)$ ile elde edilen

$R_{f2} = (CHCl_3 + Aseton + \% 25 NH_3 : 40+72+8)$ ile elde edilen

2) Şekil (2) de 200 mg Luminal enjekte edilmiş bir hastadan ilk 24 saatte toplanan idrar ekstraktının kromatogramı görülmektedir. Şekilden izleneceği üzere Rhodamin B ve Flourescein ile pa-

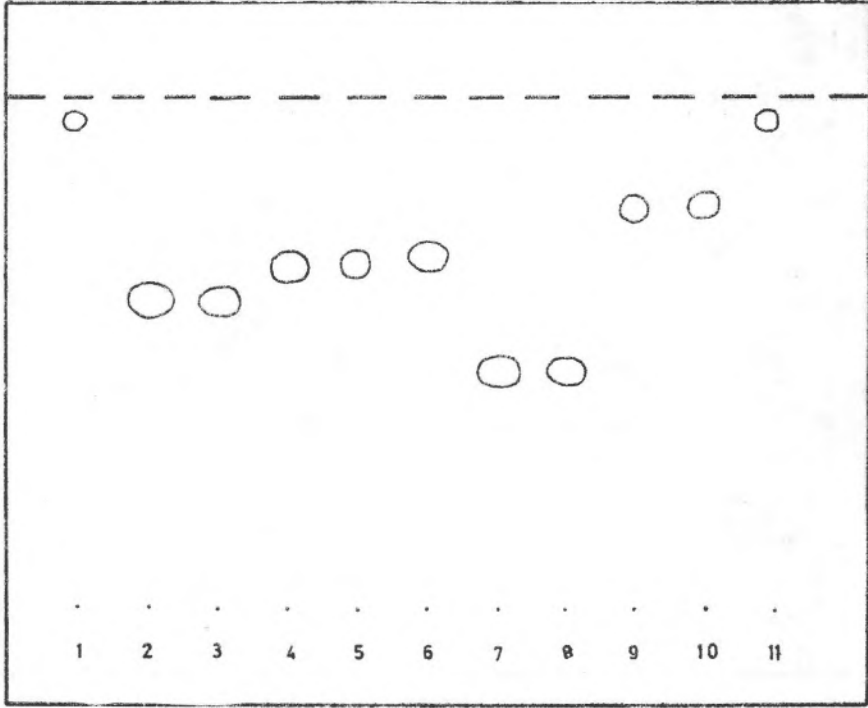
raley yapılan bu çalışmada, Rhodamin B ile Luminal'den başka bir leke daha elde edilmiştir. Reaktif püskürtmeden önce bu lekeler UV'de çok kuvvetli mavi floresan görüntüler vermektedir. Bunların normal idrar komponenti olması gerekir. (Çünkü boş idrar numunesi ile de aynı lekeler görülmektedir.) Flourescein veya yalnız $HgNO_3$ kullanıldığında gün ışığında bu lekelerde renklenme görülmemiştir. Bu bize Rhodamin B'nin diğer normal idrar metabolitleri ile de renk verebileceğini göstermektedir. Ekstraksiyon işleminde aktif kömür kullanılmadığında Rhodamin B ile renk veren birçok lekeler rastlanmıştır. Bu nedenle biz önce $HgNO_3$ ve arkadan (Rhodamin B + $HgNO_3$) püskürtmeyi uygun bulduk.

Bilhassa diğer barbitüratlar veya metabolitlerini ayırmada, buna gerek görülmüştür.

3) Şekil (3) te çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanmış Pentobarbital ve Phenobarbital ile elde edilen kromatogram, şekil (4)'de ise, leke alanı ile konsantrasyon bağıntısına göre bulunan grafik görülmektedir.

İlave edilmiş belirli miktardaki saf aktif maddelerle, idrardan ekstraksiyondan sonra elde edilen $\sqrt{\text{alan}}$ karşılaştırmalarına göre verim Phenobarbital ile % 86,8, Pentobarbital ile % 92,1 bulunmuştur. Mule (9) radyoaktif karbonla işaretlenmiş Pentobarbital ile bu verimi % 86 bulmuştur. Aktif kömür ilâvesine rağmen verimin iyi olduğu görülmektedir.

4) Şekil (5) te oral yolla alınan Luminalin, idrarla atılma müddeti görülmektedir. Kromatogramda ilk 4 günlük sonuç verilmiştir. İdrar toplamaya 12 gün devam edilmiştir. Uzun etkili Phenobarbitalin bir haftadan daha uzun süre organizmada kaldığı çeşitli araştırmacılar tarafından tesbit edilmiştir (12, 6). Burada her iki şahısta elde ettiğimiz sonuçlar literatürle uyuşmaktadır ve bunun İ. T. K ile teşhis edilebileceğini göstermektedir. Kullandığımız metodun 2 μ g Phenobarbitale hassas olması, litrede 0,1 mg Phenobarbitalin idrarda teşhis olanağını sağlamaktadır.



(Ş e k i l : 1)

Çeşitli saf barbitürat ve preparatlarının İ.T.K. ile kromatogramları

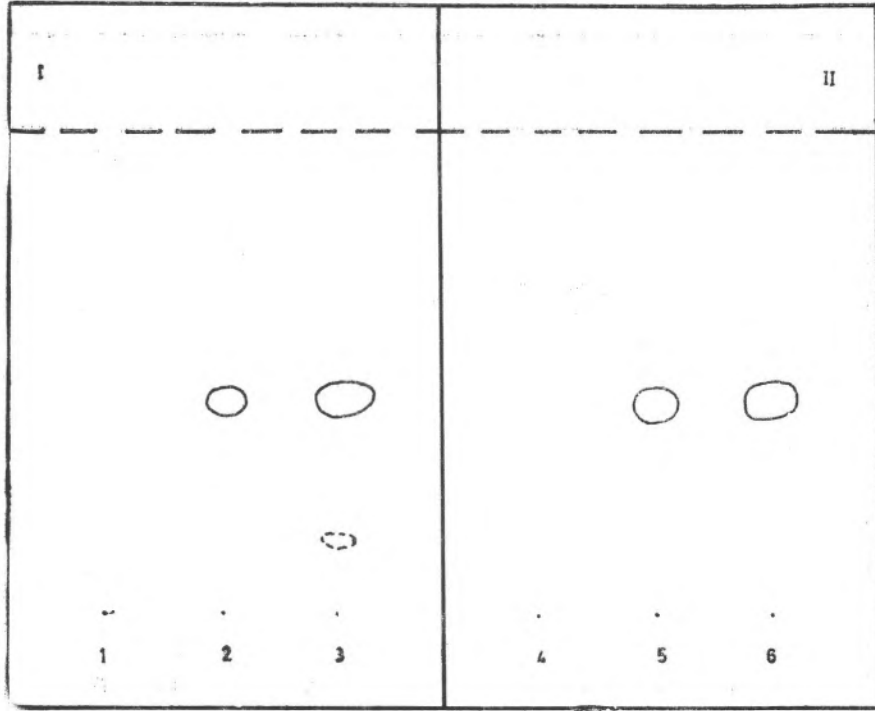
- 1 ve 11 — Sudan 111
2 — Barbital - 10 µg
3 — Medinal
4 — Phanadorm - 10 µg
5 — İpnos
6 — İtobarbital - 10 µg
7 — Fenobarbital - 10 µg
8 — Luminal
9 — Pentobarbital 10 µg
10 — Nembutal

Absorban tabaka : Silicagel-G

Developman çözeltisi : (CHCl₃ + EtOH + %25 NH₃) : (50 + 40 + 10)

Renk reaktifi : a) %2 HgNO₃

b) (%0,1 Rhodamin B + %2 HgNO₃)



(Ş e k i l 1 : 2)

200 mg Luminal enjekte edilmiş bir hasta idrarında Luminal tesbitini gösteren kromatogram.

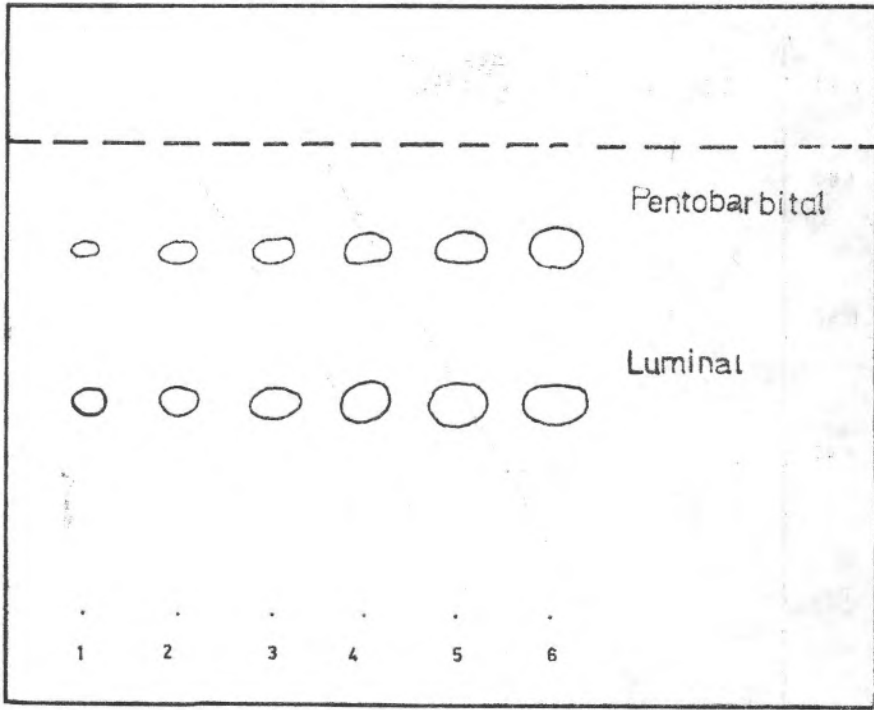
- 1 — Boş idrar
- 2 — Luminal 10 μ g
- 3 — Hasta idrarı ekstraktı
- 4 — Boş idrar
- 5 — Luminal 10 μ g
- 6 — Hasta idrarı ekstraktı

Adsorban tabaka : Silicagel-G

Developman çözeltisi : ($\text{CHCl}_3 + \text{EtOH} + \%25 \text{NH}_3$: 50+40+10)

Reaktif (1) : a) $\%2 \text{HgNO}_3$ b) $\%0,1 \text{Rhodamin B} + \%2 \text{HgNO}_3$

Reaktif (11) : a) $\%2 \text{HgNO}_3$ b) $\%0,04 \text{Flourescein}$



(Ş e k i l : 3)

Phenobarbital ve Pentobarbitalin muhtelif konsantrasyonlardaki kromatogramı

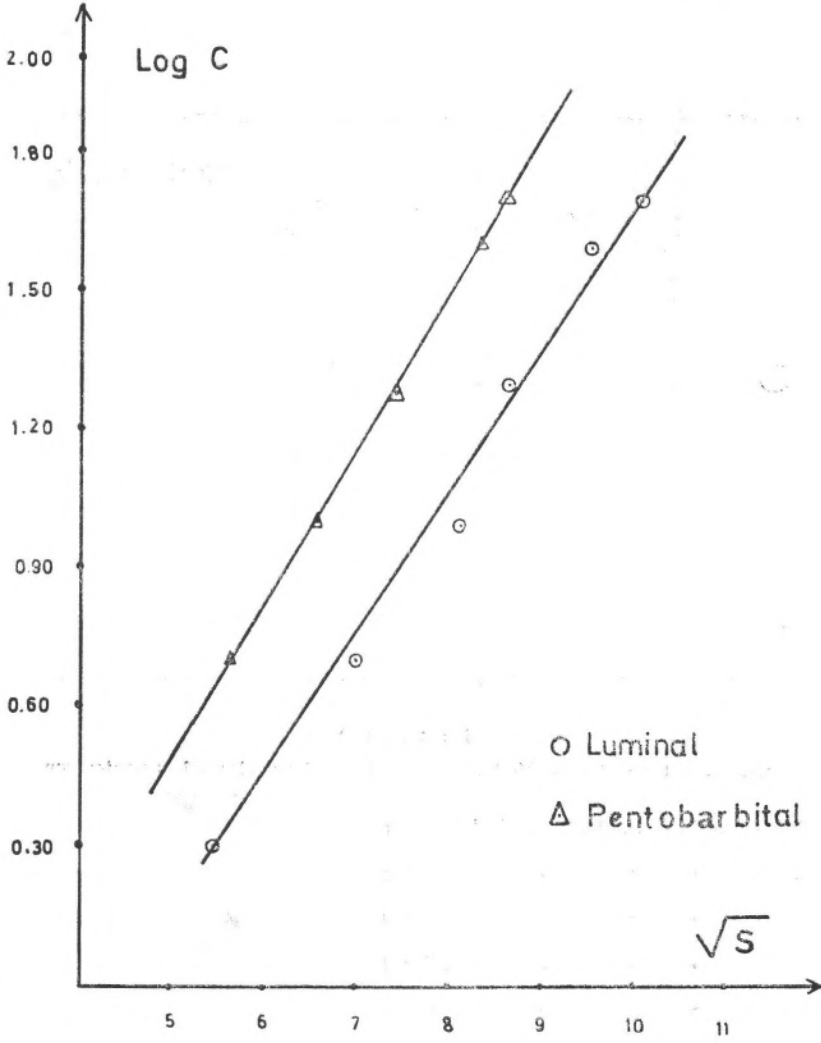
- | | | | | | | |
|---|---|--------------------------|---|-----------|---|------------|
| 1 | — | Luminal ve Pentobarbital | - | 2 μ g | | |
| 2 | — | » | » | » | - | 5 μ g |
| 3 | — | » | » | » | - | 10 μ g |
| 4 | — | » | » | » | - | 20 μ g |
| 5 | — | » | » | » | - | 40 μ g |
| 6 | — | » | » | » | - | 50 μ g |

Adsorban tabaka: Silicagel - G

Levelopman çözeltisi: $\text{CHCl}_3 + \text{EtOH} + \%25 \text{NH}_3 : 50+40+10$

Reaktif: a) $\% 2 \text{HgNO}_3$ ve b) $\%2 \text{HgNO}_3 + \%0,1 \text{Rhodamin B}$

Tatbik miktarı: 0,02 ml

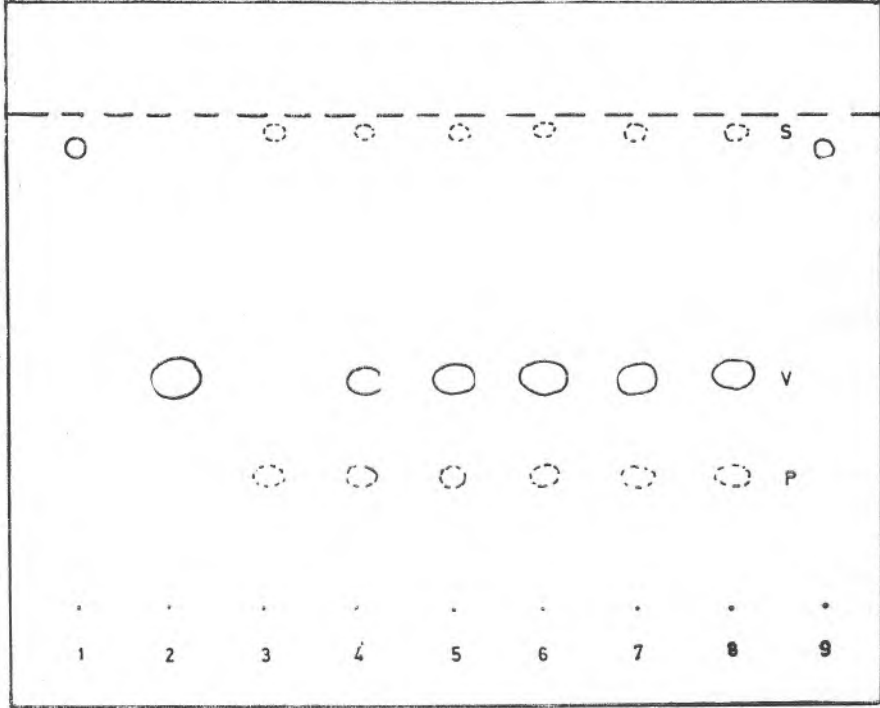


(Ş e k i l : 4)

İ.T.K. ile Pentobarbital ve Phenobarbitalin semikantitatif tayinleri (saf aktif maddelerle)

\sqrt{S} : Kromatogramdaki leke alanının karekökü (milimetre kare)

log C : Konsantrasyon logaritması (mikrogram)



(Ş e k i l : 5

100 mg luminal alan bir şahısta idrarla elimine edilen
luminalin muhtelif periyotlarda İ.T.K. ile elde edilen kromatogramı

1 ve 9 — Sudan III

2 — Luminal (saf aktif madde 20 µg)

3 — Boş idrar ekstraktı

4 — Luminal alınmasından sonra ilk 12 saat toplanan idrar ekstraktı

5 — Luminal alınmasından sonra ilk 24 saatde alınan idrar ekstraktı

6 — Luminal alınmasından sonra ilk 48 saatde alınan idrar ekstraktı

7 — Luminal alınmasından sonra ilk 72 saatde alınan idrar ekstraktı

8 — Luminal alınmasından sonra ilk 96 saatde alınan idrar ekstraktı

Noktalı lekeler Rhodamin B püskürtülmesinden sonra UV ve gün ışığında
görölmektedir.

V = Viole; P = Pembe; S = Sarı

Adsorban tabaka : Silicagel - G

Develepman çözeltisi (CHCl₃ + EtOH + %25 NH₃) : (50+40+10)

Renk. reaktifi : a) %2 HgNO₃ b) %0,1 Rhodamin B + %2 HgNO₃

Ö Z E T

Bu çalışmada : 1) Memleketimizde kullanılan barbitüratlı ilâçların aktif maddeleri olan Barbital, Phenobarbital, Pentobarbital, Phanadorm ve Itobarbitalin çeşitli developman çözeltileri ve renk reaktifleri kullanılarak İ.T.K ile teşhisleri incelenmiştir. ($\text{CHCl}_3 + \text{EtOH} + \%25 \text{NH}_3 = 50+40+10$) developman çözeltisi ile en iyi ayrılma elde edilmiş, idrardan izole edilmiş barbitüratların tanınmasında hassasiyet bakımından HgNO_3 in Rhodamin B ile kombinasyonu, spesifik olması bakımından da Flourescein ile HgNO_3 kombinasyonu daha iyi sonuç vermiştir. İzolasyon metoduunda, Mule tarafından tatbik edilen ekstraksiyon tekniği tercih edilmiş ve fakat aktif kömür kullanılmasına gerek görülmüştür.

2) Kromatogramların leke alanları ile konsantrasyonları arasındaki bağıntıya dayanan metodla, Phenobarbital ve Pentobarbitalin semikantitatif tayinleri hem idrardan izole edildikten sonra hem de saf aktif madde üzerinde yapılmıştır. Böylece ekstraksiyon metodunun verimi hesaplanmıştır. (Phenobarbital için %86,8 Pentobarbital için % 92,1).

3) Normal şahıslarda oral yolla verilen Luminalin idrarla eliminasyon hızı tayin edilmiştir. Tek doz olarak 100 mg Luminal alan iki şahısta aynı sonuç elde edilmiş olup, 12. günde de idrarla Luminal itrahının devam ettiği görülmüştür.

Kullandığımız metodla litrede 0,1 mg Luminal teşhis edilebilmektedir.

Sonuçlar şekil 1, 2, 3, 4, ve 5 te gösterilmiştir.

S U M M A R Y

Identification and Semiquantitative Determination of Some Barbiturates in Urine by Thin-Layer Chromatography.

In this study : 1) The detection of barbituric acid derivatives such as Barbital, Phenobarbital, Cyclohexenyl ethyl barbituric acid and Allyl isobutyl barbituric acid, the active components of drugs containing barbiturates in Turkey, have been examined by thin layer chromatography. Using (Chloroform+absolute Etha-

nol + Ammonia %25 : 50 + 40 + 10) (V/V/V) as a developing solvent, we obtained the best separation. For the detection of barbiturates in the urine extracts, spraying ($HgNO_3$ + Rhodamin B) after $HgNO_3$ has been found more sensitive, but in terms of specificity, combination of fluorescein with mercurous nitrate gave better result. Mule's extraction technique has been preferred, provided addition of animal charcoal to the chloroform phase.

2) With the method based on the relationship between the logarithm of concentration and square root of the spot area, we estimated Phenobarbital and Pentobarbital after their isolation from urine. The recovery has been found comparing the results with the areas of pure substances (The recovery for Phenobarbital 86,8 % and for Pentobarbital 92,1 %)

3) The elimination rate of Phenobarbital by urine has been followed in two normal persons who have been given 100 mg of this barbiturate orally as a single dose. On the twelfth day Phenobarbital still has been detected in the urine by thin layer chromatography.

In this method the sensitivity is 0,1 mg Phenobarbital per liter urine. The results have been shown in Figures 1, 2, 3, 4 and 5.

L İ T E R A T Ü R

- 1 — Amâl, H., Tulus, S., Sanlı, İ. : A New Reagent for Detection of Barbiturates by Thin-layer Chromatography İstanbul Ecz. Fak. Mec. 4, 23 (1968).
- 2 — Arnold, W., Grützmaier, H. F. : Die Identifizierung von Barbiturat-Metaboliten mittels Massen - spektrometrie und Infrarot-Spektrum Arch. Toxikol. 25, S : 200-215 (1969).
- 3 — Baktır, E. : İlâç rehberi Nurettin Uycan Basımevi, İstanbul (1972).
- 4 — Finkle, S. Bryan. : Forensic Toxicology of Drug abuse : A status report Anal. Chem. V : 44, N : 9, 18 A (1972).
- 5 — Hishida, S., Ueda, M., Tonabe, T. and Mizoi, Y. : Experimental Studies on the Detection of Hypnotics Using Thin-layer Chromatography Drug dependence, V : 1, N : 7, abstract No : 1012, S : 431 (1973).
- 6 — Kaye, S. : Handbook of Emergency Toxicology, 2 nd edition S : 103 Charles C. Thomas, Publisher. Illinois (1961).

- 7 — **Lundquist, F.** : Methods of Forensic Science, V : 1 S : 375 John Wiley and Sons Inc. Newyork (1962).
- 8 — **Meyers, H. F., Jawetz, E., Goldfiel, A.** : Review of Medical Pharmacology, 2 nd edition. L. M. P, Los Altos, California (1970).
- 9 — **Mule, S. J.** : Identification of Narcotics, Barbiturates, Amphetamines, Tranquilizers and Psychotomimetics in Human Urine. J. Chromatog. 39, N : 3, S : 302 (1969).
- 10 — **Preuss, Fr. R. und Müller, D.** : Untersuchungen zur Biotransformation von 5 - (1-Methyl-n-butyl)-5-Vinyl barbitürsäure (Vinylbital) Arzneimittel Fors. 18, 412 (1969).
- 11 — **Stahl, E.** : Thin-Layer Chromatography A Laboratory Handbook, S : 137 Springer - Verlag - Berlin 2 nd Edition (1969).
- 12 — **Stewart, C. P. and Stolman, A.** : Toxicology, Mechanisms and Analytical Methods V : 1 ve V : 2 Academic Press, Newyork (1961).
- 13 — **Thienes, Clinton H. and Haley, Thomas J.** : Clinical Toxicology, 4 th edition. Lea and Febiger, Philadelphia (1964).