

УДК 340.67:616.633;547.94;582.635.38].-074  
© Гузенко Н.В., Петюнін Г.П., 2011

## ВИЗНАЧЕННЯ КЕТАМІНУ В БІОЛОГІЧНОМУ МАТЕРІАЛІ МЕТОДОМ ГАЗО-РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Гузенко Н.В., Петюнін Г.П.

Харківська медична академія післядипломної освіти

На сьогоднішній день коло психотропних та наркотичних речовин, які контролюються та використовуються з немедичною ціллю постійно розширюється. [1] Одним із аспектів такого немедичного застосування – це використання цих засобів з метою протиправного впливу на особистість людини. До таких препаратів відноситься і кетамін. [2]

Найважливішою особливістю фармакокінетики кетаміну є його спроможність швидко зазнавати метаболічних перетворень в організмі людини. [3, 4] Це потребує використання високочутливих та селективних методів аналізу для його визначення. Тому актуальним є питання в розробці методики визначення кетаміну в біологічному матеріалі методом газо-рідинної хроматографії, та на її основі вивчення ізолювання кетаміну з біологічного матеріалу.

Визначення середнього часу утримання кетаміну проводилося на модельних розчинах. Він склав 7,72 хвилин. Паралельно до них були досліджені контрольні проби чистої крові (бланкі), результати чого показали, що компоненти матриці не заважають визначенню кетаміну.

Для кількісного визначення кетаміну використовували метод абсолютного калібрування. При побудові градуовального графіка використовували

залежність співвідношення висоти піків (Н) кетаміну до його концентрації (С, мг/л). Градуовальні розчини хроматографували шість разів у відповідності до рекомендацій GTFch. [5]

Отримані дані були оброблені методом найменших квадратів. При цьому було встановлено, що залежність концентрації від площі піку у всьому діапазоні застосованих концентрацій лінійна і має вигляд  $y = b \cdot x$ :

$$H = 1399,5 \cdot C$$

Метрологічні характеристики отриманої градуовальної залежності висоти піку від кількості кетаміну наведені у таблиці 1 (n=48; P=0,95)

**Таблиця 1.** Метрологічні характеристики градуовальної залежності

r	b	S <sup>2</sup>	Δb
0,9997	1399,5	144,92	6,49

Для визначення метрологічних характеристик методики було приготовлено три модельні розчини кетаміну з концентраціями 0,55; 15,0; 45,0 мг/л. Хроматографування проводили у вичевказаних умовах. Для розрахунків вмісту кетаміну в даних розчинах використовували отримане рівняння (табл.2.).

**Таблиця 2.** Результати кількісного визначення кетаміну та метрологічні характеристики

Вміст кетаміну (мг/л)	Висота піку	Знайдено кетаміну		Метрологічні характеристики (n=3, P=0,95)
		мг/л	%	
0,55	743	0,53	96,37	X = 98,68 S(X) = 2,19 S <sup>X</sup> = 5,44 ε = ± 5,51% X ± S <sup>X</sup> = 98,68 ± 5,44
15,00	21142	15,11	100,73	
45,00	62305	44,52	98,93	

Вивчення ступені ізолювання кетаміну з тканин внутрішніх органів методом ГРХ проводилося на модельних сумішах, отриманих затравкою тканини печінки. Після чого проводили ізолювання методами Васильєвої А.А., Стаса-Отто, екстракцією хлороформом, етанолом, ацетоном та ефіром. Ці дослідження показали, що вихід кетаміну залежить від методу ізолювання та складає від 10 до 73%. Найбільший вихід відмічається при використанні в якості екстрагенту хлороформу та ефіру (табл.3).

Результати отримані при екстракції з крові показали, що вихід кетаміну складає від 2 до 64% (табл.4). Для депротейнізації використовували безводний натрію сульфат та різні розчинники: 1М трихлоруксусну кислоту, фосфоновольфрамову кислоту, ацетонітрил, 96% етанол, 10% соляну кислоту. Найбільші виходи спостерігалися при використанні, як осаджувача білків та екстрагенту, ацетонітрилу. Подальше екстракційне очищення сироватки крові від ліпофіль-

них речовин гексаном забезпечувало отримання проб, придатних для введення у хроматограф.

**Таблиця 3.** Результати ізолювання кетаміну з біологічного матеріалу

Метод ізолювання		Вихід, %
Стаса – Отто		10,8
Васильєвої		17,6
3 безводним Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Хлороформ	72,4
	Етанол	52,9
	Ацетон	49,3
	Ефір	70,2

**Експериментальна частина. Умови проведення ГРХ.** Дослідження проводилися на газорідинному хроматографі “Shimadzu–2014” з капілярною колонкою HP–5 (15 м × 0,320 мм × 0,25 мкм). Швидкість газу–носія (гелій) – 1 мл/хв. Режим термостату колонок – програмуваний – від 150 °С до 250 °С (25 °С/хв). Температура інжектору – 240 °С. Детектор – полум’яно-іонізаційний (температура – 260 °С). Проби (1 мкл) розчинів вводились автосамплером.

Таблиця 4. Результати ізолювання кетаміну з крові

Метод ізолювання	Введено, мг	Знайдено, мг	Вихід, %	
1М розчин ТХУ	3,5	0,084	2,4	
Фосфорно-вольфрамова кислота	3,5	0,935	26,9	
Етанол	3,5	1,078	30,8	
Ацетонітрил СН <sub>3</sub> CN	3,5	2,231	63,7	
10% розчин HCL	3,5	0,118	3,68	
Екстракція сухого гомогенату крові з безводним Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Хлороформ	3,5	0,427	12,2
	Етанол	3,5	1,122	32,06

**Приготування розчинів кетаміну для проведення градування з концентраціями 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0 мг/л.** 5 мг (точна наважка) кетаміну розчиняли в мірній колбі місткістю 100 мл, доводили до мітки етанолом та перемішували (стандартний розчин №1, концентрація 50 мг/л). Послідовним розведенням стандартного розчину №1 получали серію градувальних розчинів з заданими концентраціями.

**Вивчення ізолювання кетаміну з біологічного матеріалу методом ГРХ. 1) Підготовка трупної печінки до експерименту.** До 100 г подрібненої тканини трупної печінки додавали 0,02 г кетаміну, ретельно перемішували і поміщали на добу в холодильник.

**2) Підготовка крові до експерименту.** Для визначення кетаміну в трупній крові була приготована модельна суміш. Для цього до 50 мл трупної крові додавали 35 мг кетаміну, ретельно перемішували та поміщали на добу в холодильник.

**а) До 5 мл модельної суміші крові з кетаміном для осадження білків додавали 5 мл розчинника (1М трихлоруксусну кислоту або фосфорно-вольфрамову кислоту або ацетонітрил або 10% соляну кислоту), розчин ретельно перемішували і залишали на 10 хвилин і центрифугували (протягом 5 хв при 5000 об/хв). Для очищення отриманого екстра-**

кту від ліпідів до надосадової рідини додавали гексан (у співвідношенні 1:5 за об'ємом), струшували протягом 5 хвилин і після поділу шарів - верхній шар (гексан) відкидали, а нижній поміщали в мірну колбу об'ємом 10 мл і доводили до мітки.

**б) До 10 мл модельної суміші трупної крові та кетаміну додавали 30 г безводного натрію сульфату, отриману масу розтирали в ступці до утворення однорідної сипкої маси. Отриману масу поміщали в скляну колонку, і екстрагували розчинником (етанолом або хлороформом) (загальний об'єм необхідного розчинника 100 мл), ущільнювали струшуванням і додавали розчинник до утворення шару товщиною 1-2 см над біоматеріалом. Далі над колонкою для забезпечення дзеркальної поверхні поміщали діляльну воронку із залишками розчинника, який пропускали через колонку зі швидкістю 60 – 80 крапель на хвилину. Хлороформний екстракт поміщали в мірну колбу об'ємом 100 мл. Потім отриманий екстракт упарювали при кімнатній температурі до обсягу 20 мл, перенесли в мірну колбу місткістю 25,0 мл і доводили розчинником до мітки.**

**Висновки:** Розроблена методика визначення кетаміну була використана для вивчення ізолювання кетаміна із біологічного матеріалу та біологічних рідин методом газорідинної хроматографії.

#### ЛІТЕРАТУРА:

1. Постанова Кабінету міністрів України від 05.01.2011р. №4 "Про внесення змін до Постанов Кабінету міністрів України від 06.05.2000р. №770 і від 10.10.2007р. №123.
  2. Доклад Международного комитета по контролю над наркотиками за 2009 год. ООН. Нью-Йорк, 2010г. С.249-259, 260-268.
  3. **Веселовская Н.В., Коваленко А.Е.** Наркотики: свойства, действие, фармакокинетика, метаболизм. – М: Триада-Х. – 2000. – 320 с.
  4. **Adnan T. Bhutta.** Seminars in Perinatology. Ketamine: A Controversial Drug for Neonates.// Journal Pain. – 2007. – Vol. 31 (Issue 5). – P. 303-308.
  5. **Hallbach J, von Meyer L, Maurer HH (2002)** Empfehlungen des Arbeitskreises Klinische Toxikologie der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) für die toxikologische Analytik im Rahmen der Hirntod-Feststellung. Toxichem.Krimtech. 69:124-127.
- Гузенко Н.В., Петюнін Г.П.** Визначення кетаміну в біологічному матеріалі методом газо-рідинної хроматографії // Український медичний альманах. – 2011. – Том 14, № 4. – С. 40-41.  
Розроблено спосіб аналітичної діагностики кетаміну методом газо-рідинної хроматографії в біологічному матеріалі, придатного для наркологічної експертизи, клінічної та судово-медичної токсикології  
**Ключові слова:** кетамін, газо-рідинна хроматографія (ГРХ), ізолювання
- Гузенко Н.В., Петюнін Г.П.** Определение кетамина в биологическом материале методом газожидкостной хроматографии // Украинский медицинский альманах. – 2011. – Том 14, № 4. – С. 40-41.  
Разработан способ аналитической диагностики кетамина методом газожидкостной хроматографии в биологическом материале, пригодного для наркологической экспертизы, клинической и судебно-медицинской токсикологии  
**Ключевые слова:** кетамин, газожидкостная хроматография (ГЖХ), изолирование
- Guzenko N.V., Petyunin G.P.** Determination of ketamine by gas-liquid chromatography in biological materials // Украинский медицинский альманах. – 2011. – Том 14, № 4. – С. 40-41.  
The way is developed of determination of ketamine in biological material by method of a gaz-liquid chromatography, suitable for narcological examination, clinical and forensic toxicology  
**Key words:** ketamine, gas-liquid chromatography (GLC), isolation

Надійшла 11.06.2011 р.

Рецензент: проф. І.О.Комарцеца