

ИЗОЛИРОВАНИЕ, ОБНАРУЖЕНИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗОЛПИДЕМА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

Хомов Ю. А., Крылова Е. А., Егорова Е. И.

*ГБОУ ВПО Пермская государственная фармацевтическая академия, Пермь
Пермь, Россия (614000, г. Пермь, ул. Полевая, 2), hdu59@mail.ru*

В результате проведенных исследований, после теоретического прогнозирования и экспериментального подтверждения определены оптимальные условия экстрагирования золпидема из биологических жидкостей (кровь, моча) с учетом pH, pKa, природы органического растворителя. Разработаны способы детектирования и количественного определения золпидема в извлечениях из биологических жидкостей различными физико-химическими методами: тонкослойной хроматографией (ТСХ), высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ), ультрафиолетовой спектрометрией (УФ-) и газовой хроматографией – масс-спектрометрией (ГХ/МС). Приводятся условия исследования. Результаты охарактеризованы пределами обнаружения и определения золпидема при различных видах анализа. Золпидем укладывается в условия ТСХ скрининга лекарственных соединений, имеющих токсикологическое значение.

Методики сведены в логическую схему анализа биологических жидкостей при диагностике интоксикаций золпидемом.

Аналитическая информация, которая может быть получена с помощью данных методик, позволяет уточнить клинический диагноз и обеспечивает надежную идентификацию золпидема при клинико-диагностических (КДА) и химико-токсикологических (ХТА) анализах.

Ключевые слова: золпидем, биологические жидкости, экстракция, ТСХ, ВЭЖХ, УФ-, ГХ/МС-спектрометрия.

ISOLATION, QUANTITATIVE AND QUALITATIVE DETERMINATION OF ZOLPIDEM IN BIOLOGICAL FLUIDS

Khomov Y. A., Krylova E. A., Egorova E. I.

*Perm state pharmaceutical academy, Perm
Perm, Russia (614000, Perm, Polevaya street, 2), hdu59@mail.ru*

The optimal conditions of extraction of zolpidem from biological fluids (blood, urine) are determined after investigations, theoretical prognosis and experimental confirmations taking into account pH, pKa and nature of organic solvent. The procedures of the detection and quantitative determinations of zolpidem are developed in extracts from biological fluids with the help of different physical and chemical methods such as Thin Layer Chromatography (TLC), High Pressure Liquid Chromatography (HPLC), Ultraviolet Spectrometry (US) and Gas Chromatography – Mass Spectrometry (GC-MS). The conditions of the experiment are given. The results are characterized by limits of detection and quantification in case of different types of analysis. The zolpidem is met by conditions of TLC screening of the medicinal compounds which have a toxicological significance.

The procedures are summarized in logical scheme of analysis of biological fluids for diagnosis of the intoxications of zolpidem.

Analytical information which can be obtained with the help of these techniques permits one to make more precise a clinical diagnosis and to provide reliable identification of zolpidem for clinical and toxicological analysis.

Key words: zolpidem, biological fluids, extraction, TLC, HPLC, UV-, GC/MS spectrometric.

Проблема нарушений сна (инсомния) продолжает сохранять своё медицинское и социальное значение. Поэтому снотворные средства (гипнотики) и способы лечения инсомний являются предметом постоянного внимания специалистов и врачей.

Основным вопросом лечения инсомний в настоящее время является не столько недостаточная эффективность применяемых лекарственных средств, сколько недостаточная безопасность лечения этими препаратами [1]. Одним из главных представителей нового

класса является золпидем, который широко и эффективно используется в медицинской практике за рубежом, а в последние годы и в России [3, 5].

Однако в связи с нежелательными побочными явлениями со стороны центральной нервной системы (спутанность сознания, эйфория и др.) может быть использовано в немедицинских целях. Немедицинское применение препарата и значительное превышение рекомендованных доз золпидема способно вызывать лекарственный делирий. Несмотря на сравнительно невысокий наркогенный потенциал [4], может вызывать пристрастия и присутствует в сфере незаконного оборота психоактивных веществ. При одновременном применении с препаратами, действующими на ЦНС, алкоголем, наблюдается взаимное усиление действия, что является причиной интоксикаций различной степени тяжести и даже отравлений [2, 7].

Для своевременной и объективной диагностики интоксикаций золпидемом, учитывая нехарактерность клинической картины, особое значение приобретают результаты химического анализа биологических жидкостей (моча, кровь).

Целью исследования явилась разработка и оптимизация методик экстракции, идентификации и количественного определения золпидема для его клинико-диагностических и химико-токсикологических анализов.

На первом этапе предварительного скрининга установлено, что из реакций с осадительными реактивами наиболее чувствительной является взаимодействие с реактивом Драгендорфа (0,57 мкг вещества в пробе). При изучении реакций окрашивания наиболее чувствительной является реакция с реактивом Марки (10 мкг в пробе). Обе реакции использованы для обнаружения зон локализации золпидема при ТСХ.

Далее исследована возможность идентификации золпидема методом ТСХ на пластинах Мерск в индивидуальных растворителях и различных комбинированных системах растворителей, применяемых при ХТА лекарственных веществ в условиях аналитического скрининга. Для детектирования зон локализации золпидема на хроматограммах использовали:

- визуальное наблюдение пластинки в фильтрованном УФ-свете при $\lambda=254$ (темно-фиолетовые пятна, предел обнаружения 0,30 мкг) и при 365 нм (свечение, проявляющееся в виде сиреневой флуоресценции, предел обнаружения 0,18 мкг);
- обработку реактивом общегруппового назначения Драгендорфа в модификации по Молдаверу (коричневато-оранжевые пятна, предел обнаружения 0,35 мкг);
- обработку более специфическими реагентами: реактив Марки капельно (красно-оранжевое окрашивание, предел обнаружения 7,0 мкг).

Установлено, что в исследованных 11 индивидуальных растворителях (метанол, этанол, ацетон, хлороформ и др.) золпидем не обладает достаточной хроматографической подвижностью, оставаясь в основном вблизи стартовой линии.

При исследовании же в комбинированных системах растворителей хроматографическая подвижность золпидема проявляется в интервале R_f от 0,38 до 0,77, при значении 0,64 в общей универсальной скрининговой системе: толуол – ацетон – этанол – 25 % раствор аммиака, 45:45:7,5:2,5; и скрининговой для азотсодержащих соединений основного характера системе: диоксан – хлороформ – ацетон – 25 % раствор аммиака, 47,5:45:5:2,5 (R_f 0,67), которые были избраны нами в качестве базовых для ХТА золпидема.

Была исследована возможность доказательства и определения золпидема методами УФ-, ГХ/МС-спектроскопии и ВЭЖХ.

Исследование золпидема методом хромато-масс-спектроскопии проведено на хроматографе Agilent 6850, газохроматографическая колонка HP-5MS. Для обнаружения использован масс-селективный детектор (МСД) фирмы Hewlett-Packard. Газ-носитель – гелий. Скорость расхода газа-носителя 1,5 мл/мин. Ввод пробы ручной, без деления потока газа-носителя. Объем пробы 1 мкл в этаноле. МСД работает в режиме электронного удара при 70 эВ.

Время удерживания золпидема 9,65 мин. Проведена регистрация масс-спектров в режиме полного сканирования от 40 до 450 ае. Характеристические ионы при выделении фрагментограммы с временем удерживания 9,65 мин. — 235, 307, 219, 92 m/z (данные приведены в порядке уменьшения интенсивности). При сравнении с масс-спектрами библиотек совпадение времени удерживания и масс-спектра составляло 98%.

Количественное ГХ/МС определение проводили в тех же условиях, применяя метод внутреннего стандарта (метилловый эфир налидиксовой кислоты). Предел обнаружения – 10 нг/мл, предел определения – 25 нг/мл.

УФ-спектрофотометрия проведена на приборе Specord 40 M.

Для определения золпидема как соединения, содержащего хромофорные группы, использован метод УФ-спектрофотометрии. УФ-спектры поглощения стандартного раствора золпидема с концентрацией 18 мкг/мл снимались в 1 см кюветах в интервале длин волн 220-400 нм относительно чистого растворителя. Анализ электронных спектров в различных растворителях показал, что золпидем имеет УФ-спектры в полярных растворителях (вода, метанол, 0,1М раствор хлористоводородной кислоты), характеризующиеся одной полосой поглощения с двумя максимумами и одним минимумом.

При наличии ярко выраженного максимума абсорбции золпидема в 0,1М растворе хлористоводородной кислоты при 295 нм разработана спектрофотометрическая методика его

определения. Подчинение основному закону светопоглощения от 4 до 32 мкг/мл золпидема. Коэффициент корреляции 0,9996. Удельный показатель 480. Чувствительность определения 0,21 мкг/мл.

Метод ВЭЖХ применен для идентификации и количественного определения золпидема на основе приборного комплекса «Милихром А-02» с УФ-детектором, стальной хроматографической колонкой диаметром 2 мм, длиной 75 мм, заполненной обращенно-фазным сорбентом марки Силасорб 100-5С18, размер частиц 5 мкм. В качестве подвижной фазы избрана смесь ацетонитрил – вода 65:35 при рН 3 (добавлением фосфатного буфера). Скорость подачи элюента 75 мкл/мин. Объем вводимой пробы на анализ 5 мкл. УФ-спектр золпидема в подвижной фазе характеризуется одной полосой поглощения с тремя максимумами и двумя минимумами. Максимум при 240 нм избран в качестве аналитической длины волны. Идентификация золпидема строилась на определении абсолютного времени удерживания – $2,82 \pm 0,02$ спектральных соотношений при 240/300 нм – 0,538. Расчетная чувствительность обнаружения золпидема – 31 нг/мл. Для количественного определения использовали метод абсолютной калибровки. Линейная зависимость площади хроматографического пика от концентрации золпидема в интервале 6,5-130 мкг/мл. Коэффициент корреляции при ВЭЖХ составил 0,9998.

Для решения вопроса максимального экстрагирования соединения из объектов анализа учитывали показатель ионизации (рКа золпидема 6,2) [6].

Золпидем был включен в программу для ПК, которая позволила получить значения степени ионизации золпидема в процентах при рН 1–14. Установлено, что при рН 1–2 соединение полностью ионизировано. Начиная с рН 3, появляется его молекулярная форма, которая достигает 100 % при рН 10. Поэтому возможно, что при ХТА и КДА максимальная экстракция золпидема органическими растворителями из водных извлечений должна достигаться при рН 9–10. Степень ионизации золпидема при данных рН минимальна. Однако в связи с лабильностью исследуемого соединения в щелочной среде (наличие амидной группировки) следует предполагать как наиболее оптимальное значение рН среды 8.

Далее было проведено экспериментальное подтверждение предположений экстрагируемости золпидема различными органическими растворителями в зависимости от рН среды: хлороформ, метиленхлорид и эфир. Растворители, имеющие величину диэлектрической проницаемости большую, чем у хлороформа, не исследовались в связи с их значительной смешиваемостью с водой.

Золпидем экстрагируется органическими растворителями, достигая максимума экстракции хлороформом 99,50 %, метиленхлоридом 99,85 %, эфиром 98,43 % при рН 8.

Полученные результаты послужили основой для разработки методик определения золпидема в биожидкостях. Из крови и мочи изолирование сводилось к прямой дробной экстракции метиленхлоридом (или хлороформом) при pH 8.

При исследовании биологических жидкостей УФ-спектрофотометрическое определение проводилось в аликвоте 1/2 часть извлечения при заправке 0,25 мг на 15 мл мочи или 5 мл плазмы.

При исследовании биожидкостей методом ВЭЖХ определение проводили при заправке 0,1 мг на 2 мл мочи или плазмы.

Разработанные методики анализа биологических жидкостей сведены в логическую схему.



Рисунок 1. Схема ХТА золпидема в биологических жидкостях

Данные количественного определения золпидема в моче и плазме приведены в таблице 1.

Таблица 1. Результаты количественного определения золпидема в моче и плазме

| Добавлено золпидема, в мг | Найдено золпидема, в % | Метрологи- ческие характерис- тики | Добавлено золпидема, в мг | Найдено золпидема, в % | Метрологи- ческие характерис- тики |
|---------------------------------|------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------|------------------------------|---------------------------------------------|
| При УФ-спектрофотометрии | | | | | |
| На 15 мл мочи | | | На 5 мл плазмы | | |
| 0,25 | 89,92 | $\bar{x} = 94,11$ | 0,25 | 76,80 | $\bar{x} = 78,73$ |
| 0,25 | 95,08 | $S = 2,97$ | 0,25 | 82,40 | $S = 2,60$ |
| 0,25 | 96,85 | $S_{\bar{x}} = 1,33$ | 0,25 | 80,08 | $S_{\bar{x}} = 1,16$ |
| 0,25 | 92,19 | $\varepsilon_{\alpha} = 3,70$ | 0,25 | 78,45 | $\varepsilon_{\alpha} = \pm 3,22$ |
| 0,25 | 96,50 | $E = \pm 3,93\%$ | 0,25 | 75,92 | $E = \pm 4,09\%$ |
| При ВЭЖХ-определении | | | | | |
| На 2 мл мочи | | | На 2 мл плазмы | | |
| 0,1 | 94,06 | $\bar{x} = 96,40$ | 0,1 | 74,87 | $\bar{x} = 76,39$ |
| 0,1 | 96,73 | $S = 2,97$ | 0,1 | 77,48 | $S = 1,82$ |
| 0,1 | 99,00 | $S_{\bar{x}} = 1,33$ | 0,1 | 77,70 | $S_{\bar{x}} = 0,81$ |
| 0,1 | 99,49 | $\varepsilon_{\alpha} = 3,70$ | 0,1 | 73,99 | $\varepsilon_{\alpha} = 2,25$ |
| 0,1 | 92,73 | $E = \pm 3,84$ | 0,1 | 77,9 | $E = \pm 2,95$ |

Как видно из таблицы 1 при статистической обработке данных, полученных в ходе количественного определения золпидема в модельных пробах мочи и плазмы методами УФ-спектрометрии и ВЭЖХ, отражается вполне удовлетворительная сходимость результатов.

Проведен анализ золпидема в образцах реальной мочи пациентов после приема однократных терапевтических доз методом ГХ/МС. К исследуемым пробам по 2 мл добавляли по 20 мкл раствора внутреннего стандарта (спиртовой раствор метилового эфира налидиксовой кислоты) и образцы подвергали ТФЭ на патронах AccuBond II EVIDEX. Элюировали смесью дихлорметан – пропанол – 25% раствор аммиака, 4:1:0,1. Элюат испаряли досуха в токе азота при 60 °С. Остатки реконструировали 200 мкл этилацетата и анализировали ГХ/МС, вводя по 1 мкл в инжектор хроматографа. Получена хроматограмма с временем удерживания 9,65 мин. Проведена регистрация масс-спектров в режиме селективного ионного мониторинга по ионам m/z 235, 307, 219 (золпидем) и 188, 215, 246 (внутренний стандарт). Результаты ГХ/МС количественного определения золпидема, выделенного из реальной мочи, получены с использованием компьютерной программы ChemStationG1701DA. Количественная оценка соответствия найденного соединения истинному соответствует требованиям метода.

Определяемые концентрации золпидема в моче после перорального приема 10 мг находятся выше предела количественного определения, что демонстрирует высокую чувствительность использованной ГХ/МС методики и позволяет обнаруживать и количественно определять золпидем в реальной моче на стадии его элиминации при приеме однократной терапевтической дозы.

Выводы

1. Описана процедура пробоподготовки биологических жидкостей (моча, плазма) для анализа в них золпидема, заключающаяся в жидкостно-жидкостной экстракции (УФ-спектрометрия и ВЭЖХ) и твердофазной экстракции (ГХ/МС).

2. Базируясь на использовании методов ТСХ, ВЭЖХ, УФ и ГХ/МС спектрометрии определены основные характеристики идентификации золпидема, в результате чего становится возможным проведение достоверного и надежного анализа этого соединения в биологических жидкостях для целей химико-токсикологического и клинико-диагностического исследований.

3. Показана применимость методики ГХ/МС анализа для определения золпидема в образцах реальной мочи после приема разовых терапевтических доз.

Список литературы

1. Борисова, Е. О. Золпидем – современный эффективный препарат для лечения бессонницы / Е. О. Борисова // Фарматека. – 2001. – №3. – С. 40-42.
2. Золпидем и зопиклон: развитие зависимости // Безопасность лекарств. – 2000. – №1. – 17 с.
3. Регистр лекарственных средств России. Энциклопедия лекарств. – 2010. – 18-е изд. – М., 2010. – С. 331-334.
4. Сиволап, Ю. П. Фармакотерапия в наркологии (краткое справочное руководство) / Ю. П. Сиволап, В. А. Савченков. – М.: Медицина, 2000. – С. 106-108.
5. Шмыров, В. И. Открытое многоцентровое исследование золпидема (ивадала) при лечении инсомнии / В. И. Шмыров, Л. Б. Ключкова // Фарматека. – 2001. – №5. – С. 32-43.
6. Baselt, R. Disposition of toxic drugs and chemicals in man, 5-th ed. California: Chemical Toxicology Institute Foster City. – 2000. – P. 896.
7. Levine, B. Zolpidem distribution in postmortem cases / B. Levine, S. C. Wu, J. E. Smialek // J. Forensic Sci. – 1999. – Vol. 44. – №2. – P. 369-371.

Рецензенты:

Михалев А. И., д. фарм. н., профессор, зав. кафедрой биологической химии, ГБОУ ВПО ПГФА Минздравсоцразвития, г. Пермь.

Ярыгина Т. И., д. фарм. н., профессор, профессор кафедры фармацевтической химии очного факультета, ГБОУ ВПО ПГФА Минздравсоцразвития, г. Пермь.