
ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЗОЛПИДЕМА

Ю.А. Хомов, Е.И. Егорова,
Н.В. Кокшарова, Е.А. Шилова

Кафедра фармацевтической химии
ФДПО ПГФА
ул. Ленина, 48, Пермь, Россия, 614990
тел. +79114636467, эл. почта: somvoz@live.ru

Предложены методики определения золпидема на основе хроматографии в тонких слоях сорбента, ИК-, УФ-, ГХ/МС-спектроскопии, ВЭЖХ/УФ, применимые в химико-токсикологическом анализе.

Ключевые слова: золпидем, химико-токсикологический анализ.

Золпидем — по химической структуре — N,N,6-Триметил-2-(4-метилфенил)имидазо[1,2-*a*]пиридин-3-ацетамид (синонимы: Ивадал, Ambien, Stilnox) — это представитель нового третьего поколения снотворных препаратов, широко и эффективно используемый в медицинской практике для лечения нарушений сна и инсомнии в странах Европы и США, который в последние годы нашел применение и в России [1, 4]. Оказывает выраженное снотворное и седативное действие, в незначительной степени проявляются анксиолитический, миорелаксирующий, противосудорожный эффекты. В качестве неблагоприятного побочного действия со стороны ЦНС отмечены спутанность сознания, антероградная амнезия, нарушение координации движения, галлюцинации, диплопия, парадоксальные или психопатологические реакции [3], проявляющиеся особенно сильно при превышении рекомендованных доз и длительном применении. По данным зарубежных авторов и Центра ВОЗ по мониторингу лекарственных препаратов зарегистрированы случаи привыкания, формирования психической и физической зависимости и злоупотреблений золпидемом [2, 7]. При одновременном применении с лекарственными препаратами, влияющими на ЦНС, и алкоголем наблюдается взаимное усиление действия, что является причиной интоксикаций различной степени тяжести [3, 5, 6]. Однако информация о его химико-токсикологическом анализе недостаточна.

Целью данного аналитического исследования являлась разработка методик обнаружения и определения золпидема с использованием физико-химических методов анализа.

Исследована возможность доказательства золпидема методом хроматографии в тонком слое сорбента на стандартных пластинах в нормальнофазном и обращеннофазном вариантах. Детектирование зон локализации золпидема на хроматограмме проводили в УФ-свете при 254 нм и обработкой реактивом Драгендорфа по Молдаверу. Установлено, что золпидем укладывается в условия ХТС-скрининга лекарственных соединений и может быть анализирован методом ВЭТСХ в обоих вариантах. Избраны системы растворителей, обеспечивающие отделение золпидема от балластных веществ и метаболитов при исследовании биологических жидкостей.

Изучены спектральные характеристики золпидема с применением методов ИК-, УФ-, ГХ/МС-спектроскопии. ИК-спектр в виде суспензии золпидема основания в вазелиновом масле в кювете с окнами из калия бромида имел максимумы абсорбции при следующих частотах: 780, 840, 1080, 1140, 1285, 1400, 1510, 1640 см^{-1} и может быть предложен для идентификации золпидема. При изучении спектральных характеристик (Specord-40-M) в УФ-области установлено, что спектры поглощения золпидема характеризуются одной полосой поглощения с одним максимумом в зоне 250 нм (для спирта этилового и хлороформа) и двумя максимумами в зоне 235 и 237 нм; 295 и 298 нм (для 0,1 М раствора кислоты хлористоводородной и спирта метилового). Наличие ярко выраженного максимума абсорбции при 295 нм в 0,1М растворе кислоты хлористоводородной использовано для разработки методики его количественного определения. Для чего готовили серию разведений и абсорбцию стандартных растворов золпидема измеряли при 295 нм на спектрофотометре в 1 см кюветах относительно чистого растворителя. Коэффициент корреляции составил 0,99999. Уравнение имеет вид $D = 0,0477 \cdot c + 0,00199$. Подчинение основному закону светопоглощения от 4 до 32 мкг/мл. Чувствительность определения 0,21 мкг/мл.

Использован метод ВЭЖХ на микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром А-02», с УФ-детектором. Аналитическая колонка 3×75 мм, сорбент Силасорб 100-5С18, размер частиц 5 мкм. В качестве подвижной фазы избрана смесь ацетонитрил — вода 65 : 35, рН 3 (путем добавления кислоты фосфорной). Температура исследования 35 °С. Объем пробы на анализ 5 мкл. Скорость потока элюента 0,75 мл/мин. Спектр поглощения золпидема в УФ-области, снятый в диапазоне от 190 до 360 нм в выбранной подвижной фазе, характеризуется одной полосой поглощения с тремя максимумами (207, 240, 300 нм) и двумя минимумами (225, 260 нм). Максимум при 240 нм избран в качестве рабочей (опорной) длины волны, при которой хроматографический пик золпидема имел строго симметричную форму. Идентификация золпидема строилась на определении абсолютного времени удерживания, спектральных соотношений, которые рассчитывали в режиме двухволновой детекции при 240/300 нм с опорной длиной волны 240 нм, а также по спектру поглощения в интервале длин волн 190—360 нм, записанному в режиме прибора «спектр». Количественное определение проводили методом абсолютной калибровки с использованием аналитической длины волны (предварительно строили калибровочную кривую по результатам хроматографирования серии стандартных растворов золпидема в элюенте в ранее избранных условиях). Расчет концентрации осуществляли через программу сбора и обработки данных «Мультихром» по площади пика. Линейная зависимость между концентрацией раствора золпидема и площадью хроматографического пика наблюдается в интервале концентраций от 6,5 до 130 мкг/мл. Значение градуировочного коэффициента было рассчитано методом наименьших квадратов и составило 0,3399. Коэффициент корреляции равен 0,9998. Предел обнаружения золпидема расчетным способом составил 30 нг/мл.

ГХ/МС исследование проведено на хроматографе Agilent 6850, МСД Agilent 5973N, колонка капиллярная HP-5MS, внутренний диаметр 0,25 мм, длина 24 м.

Газ-носитель — гелий, скорость 0,69 мл/мин. Температура инжектора и интерфейса 250 и 280 °С. Температура колонки градиент 70° (2 мин.) — 280 °С, скорость программирования 20° в мин. Ввод пробы ручной, без деления потока газ-носителя. Объем введенной пробы 1 мкл в спирте этиловом. Получена хроматограмма и проведена регистрация масс-спектров в режиме полного сканирования. Регистрация масс-спектров в режиме селективного ионного мониторинга для золпидема — 235, 307, 219 m/z. Количественное определение проводили, применяя метод внутреннего стандарта, в качестве такового использовали метиловый эфир налидиксовой кислоты, полученный нами путем алкилирования налидиксовой кислоты алкилгалогенидом — йодметаном.

Для построения градуировочного графика готовили серии калибровочных растворов золпидема в моче. Все пробы подвергались ТФЭ на патронах AccuBond II EVIDEX по протоколу.

Протокол твердофазной экстракции

Этап	ТФЭ
Подготовка образца	1 мл 0,1 М ацетатного буфера pH 4,6
Кондиционирование	2 мл этанола; 2 мл 0,1 М ацетатного буфера pH 4,6
Загрузка образца	со скоростью 1 мл/мин
Промывка	1 мл 0,1М ацетатного буфера; 1 мл 0,1М уксусной кислоты; 1 мл 10% раствора этанола в воде
Элюирование	2 × 2 элюента гексан — этилацетат (3 : 1); 2 × 2 мл дихлорметан — изо-пропанол — 25% аммиак (4 : 1 : 0,1)

Анализ проведен методом ГХ/МС, режим регистрации — селективный ионный мониторинг по ионам m/z 235, 307, 219 (золпидем) и 188, 215, 246 (внутренний стандарт). Калибровочная кривая была получена, исходя из соотношений площадей пиков наиболее интенсивных ионных фрагментов, с величинами m/z 235 (золпидем) и 188 (внутренний стандарт). Полученная кривая линейна в интервале концентраций 0,1—10 мг/л. Предел обнаружения — 10 нг/мл. Предел количественного определения — 25 нг/мл.

Названные методы применены нами для разработки методик исследования биологических жидкостей (плазма, моча) на золпидем для целей химико-токсикологического анализа после экстракционного выделения его из объекта хлористым метилом при pH 8—9 или методом твердофазной экстракции.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Борисова Е.О.* Золпидем — современный эффективный препарат для лечения бессонницы // Фарматека. — 2001. — № 3. — С. 40—42.
- [2] Золпидем и зопиклон: развитие зависимости // Безопасность лекарств. — 2000. — № 1. — С. 17.
- [3] Регистр лекарственных средств России. Энциклопедия лекарств. — М., 2007. — 15-е изд. — С. 339—342.
- [4] *Шмыров В.И., Ключкова Л.Б.* Открытое многоцентровое исследование золпидема (ивадала) при лечении инсомнии // Фарматека. — 2001. — № 5. — С. 32—43.

- [5] *Keller T., Schneider A., Tutsch-Bauer E.* GC/MS determination of zolpidem in postmortem specimens in a voluntary intoxication // *Forensic Sci. Int.* — 1999. — Vol. 106. — № 2. — P. 103—108.
- [6] *Kintz P., Villian M., Dumestre-Toulet V. et al.* Drug-facilitated sexual assault and analytical toxicology: the role of LC-MS/MS A case involving zolpidem // *J. Clin. Forensic Med.* — 2005. — Vol. 12. — № 1. — P. 36—41.
- [7] *Wyss P.A., Radovanovic D., Meier-Abt P.J.* Acute overdose of Zolpidem // *Schweiz. Med. Wochenschr.* — 1996. — Vol. 126. — № 18. — P. 750—756.

CHEMICAL AND TOXICOLOGICAL ANALYSIS OF ZOLPIDEM

**Y.A. Khomov, E.I. Egorova,
N.V. Koksharova, E.A. Shilova**

Department of Pharmaceutical Chemistry
FDPO PSFA

*Lenina str., 48, Perm, Russia, 614990
tel. +79114636467, email: somvoz@live.ru*

Methods for measuring zolpidem are suggested: thin-layer chromatography, high-pressure liquid chromatography, ultraviolet spectrophotometry, gas chromatography with mass selective detector can be used for identification zolpidem in chemical toxicological analysis.

Key words: zolpidem, chemical and toxicological analysis.