

## ГХ/МС ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗОЛПИДЕМА В КРОВИ

**Е.А. Крылова, Ю.А. Хомов**

Кафедра фармацевтической химии ФДПО и ФЗО  
Пермская государственная фармацевтическая академия  
ул. Полевая, 2, Пермь, Россия, 614081

**С.С. Катаев**

ГУЗОТ «Пермское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы»  
ул. Фонтанная, 12, Пермь, Россия, 614002

Разработана методика количественного определения золпидема в образцах цельной крови с применением современных аналитических методов — твердофазной экстракции и газовой хроматографии — масс-спектрометрии. Методика успешно применена в случае реального несмертельного отравления золпидемом.

**Ключевые слова:** золпидем, твердофазная экстракция, газовая хроматография — масс-спектрометрия.

Золпидема тартрат (синонимы: SL-80.0750-23N, Zolpidem Hemitartrate; торговые наименования: Ивадал, Сновител, Санвал, Ambien) является снотворным препаратом, который применяется во многих странах мира с восьмидесятих годов XX века для лечения инсомнии и который сравнительно недавно нашел клиническое применение и в России. В основе структуры золпидема находится бициклическая конденсированная система имидазопиридина. В зарубежной литературе описаны случаи передозировки золпидемом как с несмертельным [1], так и с летальным исходом [2]. Известны примеры использования препарата для злонамеренного приведения человека в бессознательное состояние для совершения насильственных действий [3]. Отмечена способность золпидема вызывать явления привыкания и формирования психической и физической зависимости при постоянном приеме. По данным литературы, для количественного определения золпидема в плазме, сыворотке и в цельной крови используются методы высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ- и флуоресцентным детектированием [4, 5], газовая хроматография с электронозахватным, азотно-фосфорным типами детекторов [6].

**Целью настоящей работы** явилась разработка методики количественного определения золпидема методом газовой хроматографии — масс-спектрометрии (ГХ/МС) в образцах цельной крови.

### **Экспериментальная часть**

**Оборудование.** Для извлечения аналитов использовали систему для твердофазной экстракции (ТФЭ) с вакуумной камерой (манифолд) на 12 позиций (Supelico). Исследования проводили на газовом хроматографе Agilent 6850, оснащенный капиллярной кварцевой колонкой HP-5MS длиной 30 м с внутренним диаметром

0,25 мм и толщиной пленки 0,25 мкм. Газовый хроматограф сопряжен с масс-селективным детектором Agilent 5973N (Agilent, США). Так же применяли термоблок ПЭ-4030, микровстряхиватель ПЭ-2 (ОАО «Экрос», Россия).

**Материалы и методы.** Применяли патроны для ТФЭ AccuBond II EVIDEX 200 мг/3 мл (Agilent); золпидема тартрат (порошок-субстанция, НД 42-13447-05); мелипрамин (ампулы, с содержанием имипрамина гидрохлорида 12,5 мг/мл, EGIS PHARMACEUTICALS). Все используемые растворители и реактивы имели чистоту х.ч.

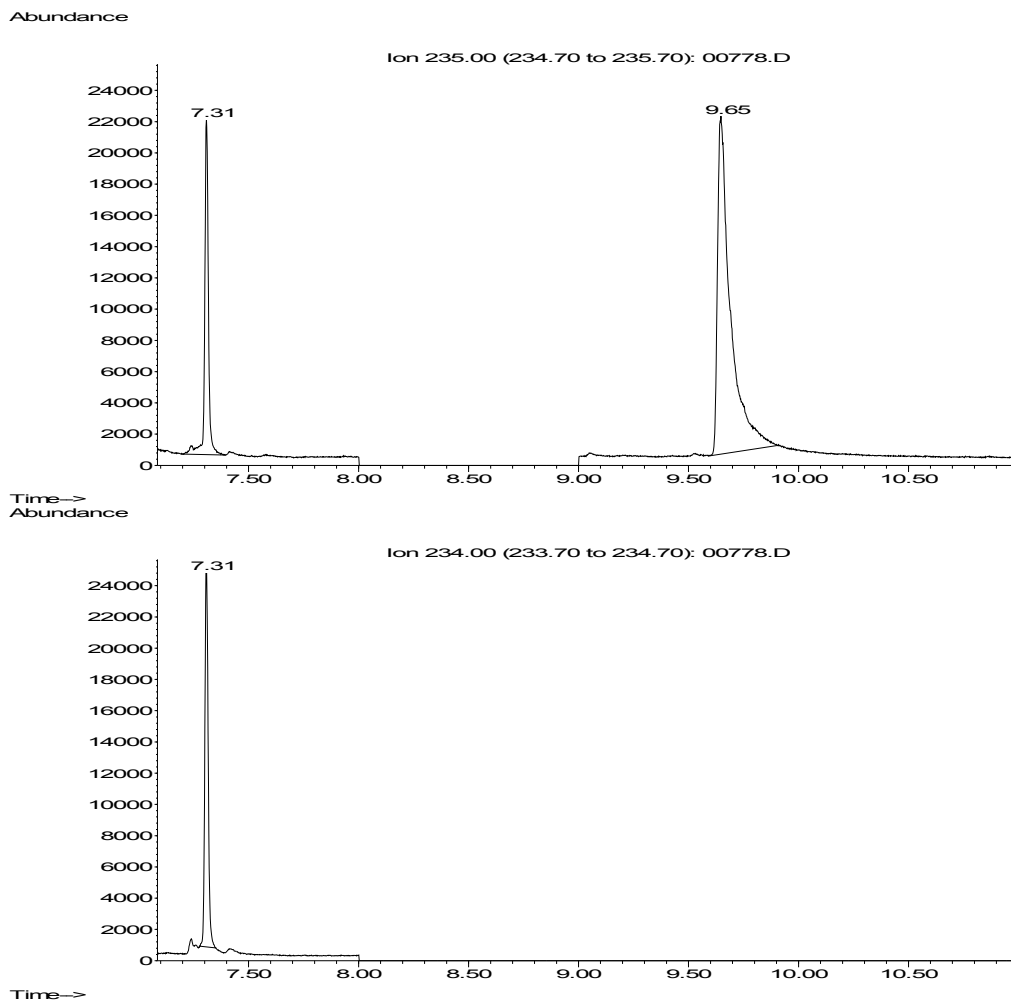
Пробоподготовка крови по методике скрининга на наркотические и лекарственные вещества: к 2 мл крови прибавляли 20 мкл этилморфина гидрохлорида в концентрации 0,02 мг/мл (внутренний стандарт), 1 мл насыщенного раствора аммония хлорида, 25% раствора аммиака до pH 9 по универсальному индикатору и экстрагировали дважды по 5 мл смеси хлороформ—бутанол-1 (6 : 1). Объединенные органические экстракты фильтровали через бумажный фильтр с безводным натрия сульфатом во флакон с 10 мкл уксусной кислоты ледяной. Полученный экстракт испаряли досуха. К сухому остатку прибавляли 40 мкл пиридина и 60 мкл уксусного ангидрида, герметично закрывали и нагревали 25 минут при 80 °С. После охлаждения флакон вскрывали, его содержимое испаряли досуха. Сухой остаток растворяли в 200 мкл безводного этилацетата и 1 мкл вводили в инжектор хроматографа.

Пробоподготовка крови для количественного определения золпидема: к образцам крови объемом 500 мкл прибавляли по 3 мл 1/15 М фосфатного буфера pH 6,0 и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут. Далее проводили ТФЭ по схеме: кондиционирование сорбента осуществляли последовательным промыванием 2 мл 95% этанола и 2 мл 1/15 М фосфатного буфера pH 6,0. Загрузку анализируемого образца крови осуществляли со скоростью 1,0 мл/мин., после чего промывали сорбент последовательным пропуском через него растворов объемами по 1 мл: 1/15 М фосфатного буфера pH 6,0; 0,1 М раствора уксусной кислоты и 10% этанола. Элюирование первоначально осуществляли смесью этилацетат—н-гексан (1 : 3) дважды порциями по 2 мл (элюат I) и далее промывали патрон 2 мл метанола. Последующее элюирование проводили в отдельный флакон со скоростью 1,0 мл/мин. смесью дихлорметан-пропанол-2-25% раствор аммиака (4 : 1 : 0,1) дважды порциями по 2 мл (элюат II). Элюат II испаряли досуха в токе азота при 60 °С.

Условия хроматографического разделения: хроматограф Agilent 6850, МСД Agilent 5973N, колонка капиллярная HP-5MS, внутренний диаметр 0,25 мм, длина 30 м, газ-носитель гелий, скорость — 1,5 мл/мин. Режим работы split/splitless (деление потока 15 : 1 с задержкой включения 1 мин. после ввода пробы).

Режим работы ГХ/МС для проб крови в условиях скрининга: температура инжектора и интерфейса 250 и 280 °С, температура колонки — градиент 70 (2 мин.) — 280 °С, скорость программирования 20° в минуту. Ввод пробы ручной, без деления потока газа-носителя. Регистрация масс-спектров в режиме полного сканирования масс 45—450 а.е.

Режим работы ГХ/МС для проб крови при количественном анализе: температура испарителя хроматографа и интерфейса детектора — 300 и 280 °С. Температура колонки: начальная 70 °С в течение 1 мин. и прогрев до 230 °С со скоростью программирования 40 град/мин.; затем прогрев до 300 °С со скоростью программирования 20 град/мин.; выдержка при конечной температуре 2,5 мин. Регистрация масс-спектров проводилась в режиме селективного ионного мониторинга (SIM) по ионам с величинами  $m/z$  для золпидема — 235, 307, 219; для имипрамина — 234, 235, 280. Для количественного определения были использованы величины площадей пиков ионных фрагментов со 100% интенсивностью в спектре (234 — для имипрамина и 235 — для золпидема) (рис. 1).



**Рис. 1.** Фрагмент экстракционной хроматограммы по ионам, характерным для масс-спектров золпидема — 9,65 мин. и имипрамина — 7,31 мин.

Расчет концентрации осуществляли с применением программы сбора и обработки данных ChemStation G1701DA. Калибровочный график строили методом внутреннего стандарта (рис. 2). Готовили серии калибровочных растворов по крови

с концентрациями золпидема 0,1 мг/л; 0,25 мг/л; 1,0 мг/л; 2,5 мг/л. В качестве внутреннего стандарта в образцы крови добавляли раствор имипрамина гидрохлорида в количестве 500 нг в пробу. На рис. 1 представлен ионный профиль золпидема ( $m/z$  235) и внутреннего стандарта (имипрамин,  $m/z$  234) при исследовании экстракта из крови, содержащего 1 мкг/мл каждого компонента. Следует отметить, что пики имеют хорошее разрешение и отсутствует интерференция со стороны компонентов матрицы.

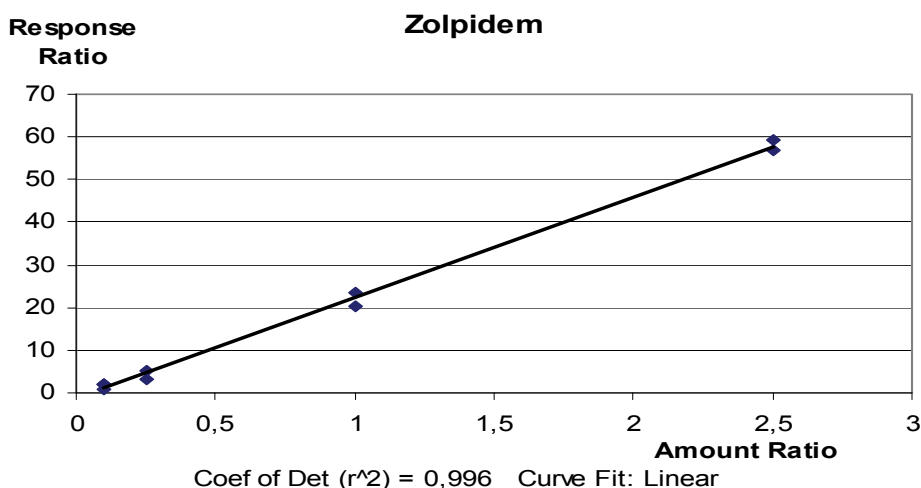


Рис. 2. Калибровочный график

График линеен в диапазоне концентраций 0,1—2,5 мг/л. Коэффициент корреляции равен  $r^2$  — 0,996. Расчет концентрации золпидема проводили по формуле

$$C_x = \frac{Q \cdot 1000}{a \cdot 1000 \cdot 1000},$$

где  $C_x$  — концентрация золпидема в крови, мг/л;  $Q$  — количество золпидема, найденное по графику, нг;  $a$  — объем крови, взятый на исследование, мл.

В нашей практике имел место случай, впервые зафиксированный в Пермском крае, острого комбинированного перорального отравления снотворным препаратом золпидемом и этиловым алкоголем.

Пострадавшая С., 47 лет, в феврале 2010 г. экстренно была доставлена в реанимационное отделение одной из больниц Пермского края с симптомами интоксикации и указанием на возможное отравление таблетками «Санвал». Для проведения химико-токсикологического исследования был произведен отбор образца крови. Пробоподготовка крови осуществлялась по методике скрининга на наркотические и лекарственные вещества, применяемой в судебно-химическом отделении Пермского краевого бюро СМЭ (см. выше). При исследовании образца крови на хроматограмме был идентифицирован пик вещества, по времени удерживания и масс-спектру соответствующий золпидему. Для его количественного определения была применена выше описанная методика, в результате было выявлено, что концентрация золпидема в цельной крови составила 0,22 мг/л. Кроме того, в крови пострадавшей С. был обнаружен этиловый алкоголь в концентрации 2,55 г/л.

Согласно литературным данным [7], терапевтическая концентрация золпидема в крови составляет 0,08—0,15 мг/л; токсическая — 0,5 мг/л; летальная — 2—4 мг/л).

Таким образом, разработана методика, позволяющая проводить количественное определение золпидема в цельной крови в широком диапазоне концентраций с применением современных аналитических методов — ТФЭ и ГХ/МС. Методика нашла свое практическое применение при проведении химико-токсикологического анализа.

### ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Wyss P.A., Radovanovic D., Meier-Abt P.J.* Acute overdose of Zolpidem // *Schweiz. Med. Wochenschr.* — 1996. — V. 126. — № 18. — P. 750—756.
- [2] *Lichtenwalner M., Tully R.* A fatality involving zolpidem // *J. Anal. Toxicol.* — 1997. — V. 21. — № 7. — P. 567—569.
- [3] *Levine B., Wu S.C., Smialek J.E.* Zolpidem distribution in postmortem cases // *J. Forensic Sci.* — 1999. — V. 44. — № 2. — P. 369—371.
- [4] *de Castro A., Quintela O., Concheiro M.* Determinacion de zolpidem plasma por cromatografia Liquida de alta resolucion y deteccion de fluorescencia // *Rev. Toxicol.* — 2003. — V. 20. — P. 146.
- [5] *Olubodun J.O., Ochs H.R., von Moltke L.L. et al.* Pharmacokinetic properties of Zolpidem in elderly and young adult: possible modulation by testosterone in men // *J. Clin. Pharmacol.* — 2003. — V. 56. — P. 297—304.
- [6] *Gaillard Y., Gay-Montchamp J.P., Ollagnier M.* Simultaneous screening and quantitation of alpidem, zolpidem, buspirone and benzodiazepines by dual-channel gas chromatography using electron-capture and nitrogen-phosphorus detection after solid-phase extraction // *J. Chromatogr.* — 1993. — V. 622. — P. 197—208.
- [7] Терапевтические, токсические, летальные концентрации лекарственных и других химических веществ; по данным Международной Ассоциации судебных токсикологов / Под ред. D.R.A. Uges, University Hospital Groningen, The Netherlands. — 1996. — Т. 26. — № 1. — 16 с.

## DETERMINATION OF ZOLPIDEM IN BLOOD BY GC/MS

**E.A. Krylova, Y.A. Khomov**

Department of Pharmaceutical Chemistry FDPO PSPA  
Pharmaceutical academy  
*Polevaya str., 2, Perm, Russia, 614081*

**S.S. Kataev**

Department of forensic chemistry  
Perm Kray Bureau of Forensic Medicine  
*Fontannaya str., 12, Perm, Russia, 614002*

The solid-phase extraction (SPE) and gas chromatography — mass-spectrometry (GC/MS) methods have developed for the quantitative determination of zolpidem in whole blood specimens. The procedure has successfully applied in case of non-mortal poisoning.

**Key words:** zolpidem, solid-phase extraction, gas chromatography — mass-spectrometry.