

ИССЛЕДОВАНИЕ ЗОЛПИДЕМА В ОБРАЗЦАХ РЕАЛЬНОЙ МОЧИ НА УРОВНЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ДОЗ

Ю.А. Хомов, Е.А. Крылова

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

С.С. Катаев

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

Представлены результаты исследований по определению золпидема в моче методами твердофазной экстракции и газовой хроматографии — масс-спектрометрии после приема однократных терапевтических доз.

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

Объекты исследования при проведении судебно-химических и химико-токсикологических исследований весьма многообразны, при этом каждый из них представляет собой сложнейшую многокомпонентную матрицу, что необходимо учитывать при проведении анализа. Моча как объект исследования удобна прежде всего из-за низкого содержания белковых компонентов, липидов, что упрощает пробоподготовку.

Целью настоящей работы явилось изучение возможности определения нативного золпидема в моче после приема однократной терапевтической дозы (10 мг). Золпидем оказывает выраженный седативный эффект и применяется для терапии инсомнии. В литературе описаны случаи злоупотреблений препаратом, применения его с криминальными целями [1], а также управления автотранспортом водителями, находящимися под воздействием данным препаратом [2]. Поэтому мониторинг приема однократных доз необходимо для предотвращения подобных случаев среди населения.

Определенной сложностью для реализации данной цели является тот факт, что золпидем экскретируется посредством почек с мочой в нативном виде в следовых количествах (0,2—1,3% от принятой дозы) [3] и обладает коротким периодом полувыведения (порядка 3,8 часов). Поэтому мы использовали метод газовой хроматографии — масс-спектрометрии (ГХ/МС) как высокочувствительный и современный метод исследования.

Ранее нами были представлены результаты по разработке методики количественного определения золпидема в моче методом ГХ/МС [4]. Данная методика предусматривает проведение пробоподготовки методом твердофазной экстракции (ТФЭ), который при описанных условиях показал себя как удобный и высокоэффективный для реализации поставленной цели.

Экспериментальная часть. *Оборудование, материалы и методы.* Система для ТФЭ с вакуумной камерой (манифолд) на 12 позиций (Supelico); газовый хроматограф Agilent 6850, оснащенный капиллярной кварцевой колонкой HP-5MS длиной 30 м с внутренним диаметром 0,25 мм и толщиной пленки 0,25 мкм; масс-селективный детектор Agilent 5973N (Agilent, США); термоблок ПЭ-4030, микровстряхиватель ПЭ-2 (ОАО «Экрос», Россия); полуавтоматические пипетки-дозаторы, позволяющие отбирать объемы жидкостей 4—40, 40—200, 200—1000 мкл и 1—5 мл; патроны для ТФЭ AccuBond II EVIDEX 200 мг/3 мл (Agilent); Ивадал® (таблетки Sanofi Aventis, Франция). Все используемые растворители и реактивы имели чистоту х.ч.

Получение образцов мочи. Образцы мочи получали от двух «добровольцев». Сбор мочи в первом случае осуществлялся спустя 10,5 часов после приема 10 мг препарата (образец 1). Во втором случае сбор мочи осуществлялся спустя 6, 12 и 24 часа после приема аналогичной дозы золпидема (образец 2). Полученные образцы мочи хранились при -20°C , перед исследованиями мочу согревали до комнатной температуры. К 2 мл мочи прибавляли 20 мкл раствора внутреннего стандарта (спиртовой раствор метилового эфира налидиксовой кислоты с концентрацией 0,1 мг/мл), 1 мл 0,1 М буфера ацетатного pH 4,6 и далее проводили ТФЭ.

Процедура ТФЭ. Сорбент патрона кондиционировали 2 мл 95% этанола и 2 мл 0,1 М буфера ацетатного (pH 4,6). Загрузку анализируемого образца мочи осуществляли со скоростью 1,0 мл/мин. Промывали сорбент 1 мл 0,1 М буфера ацетатного (pH 4,6); 1 мл 0,1 М кислоты уксусной и 1 мл 10% этанола. Очистку осуществляли смесью этилацетат-н-гексан (1 : 3) дважды порциями по 2 мл (элюат I); последующее элюирование проводили смесью дихлорметан—пропанол-2—25% аммиак (4 : 1 : 0,1) дважды порциями по 2 мл (элюат II). Элюат II испаряли до суха в токе азота при 60°C .

Исследование проводилось методом ГХ/МС, регистрация масс-спектров в режиме селективного ионного мониторинга (SIM) по ионам с величинами m/z , характерных для золпидема — 235, 307, 219 и метилового эфира налидиксовой кислоты — 188, 215, 246. Предварительно строили калибровочный график методом внутреннего стандарта, калибровочные точки — 0,1; 0,5; 2,0; 5,0; 10,0 мг/л (по две пробы для каждой концентрации). Предел обнаружения (LOD) — 10 нг/мл. Предел количественного определения (LOQ) — 25 нг/мл.

Результаты исследования и их обсуждение. Полученные данные отражены в табл. 1 и 2. На рисунках 1 и 2 представлены примеры полученных хроматограмм.

Таблица 1

Исследование мочи (образец 1) после принятия терапевтической дозы золпидема

Проба	Концентрация золпидема, мг/л
1	0,29
2	0,25
3	0,24
\bar{X}	$0,26 \pm 0,03$
S, %	10,18

Таблица 2

Исследование мочи (образец 2) после принятия терапевтической дозы золпидема

Время, час	Концентрация золпидема, мг/л	\bar{X}	S, %
6	0,05	0,045 ± 0,007	15,71
	0,04		
12	0,04	0,04 ± 0	0
	0,04		
24	0,04	0,035 ± 0,007	20,20
	0,03		

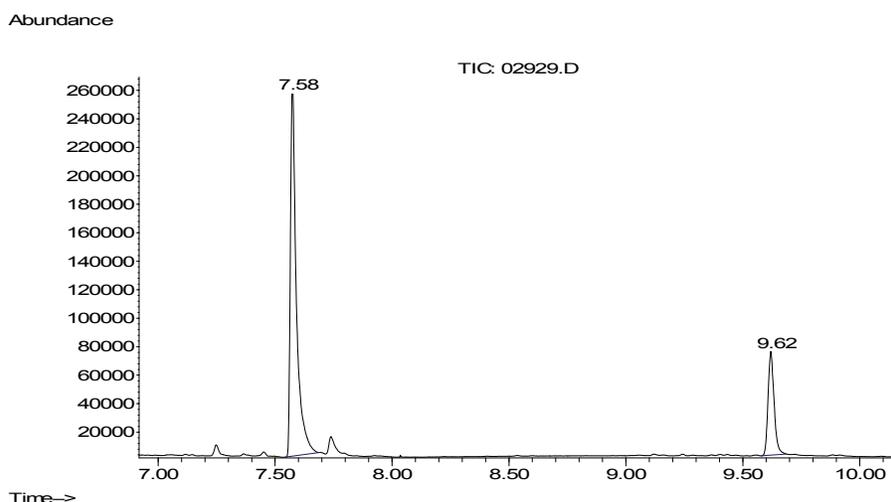


Рис. 1. Хроматограмма. Исследование элюата после ТФЭ из 2,0 мл мочи спустя 6 ч после приема 10 мг золпидема

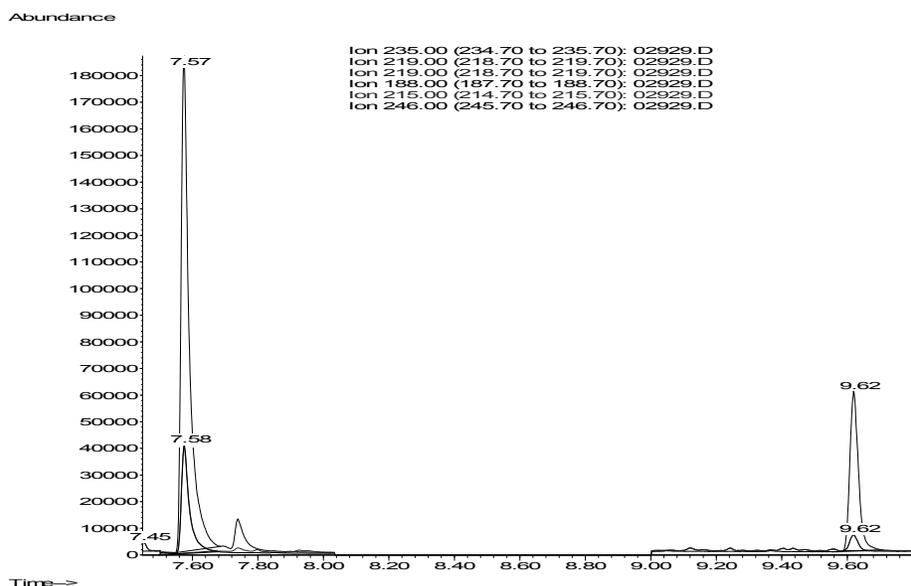


Рис. 2. Фрагмент хроматограммы по ионам, характерным для масс-спектров золпидема и метилового эфира налидиксовой кислоты

Согласно полученным данным видно (табл. 1 и 2), что среднее значение концентрации золпидема в образце 1 мочи после приема однократной терапевтической дозы, в 6,5 раз выше, чем в образце мочи 2, собранной спустя 12 часов

после приема препарата. Это иллюстрирует, по-видимому особенности метаболизма лиц, принимавших препарат, так как испытуемые принадлежали разным возрастным группам. По данным зарубежных авторов [5], установлен факт фармакокинетических различий золпидема у пожилых людей и лиц молодого возраста, в частности ими было установлено, что клиренс золпидема при пероральном его приеме выше у молодых субъектов, а разница в количествах выводимого нативного вещества напрямую связана с активностью печеночных микросомальных ферментов системы цитохрома P450.

Кроме того, нами установлено, что экскреция золпидема в виде нативного вещества посредством почек продолжается в течение как минимум суток с момента приема препарата и характеризуется плавной динамикой его выведения. Но, в целом, определяемые концентрации золпидема после перорального приема 10 мг находятся выше предела количественного определения (LOQ), что демонстрирует высокую чувствительность описанного метода и позволит детектировать и количественно определить золпидем в моче на терминальной стадии его элиминации при приеме однократной терапевтической дозы.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Levine B., Wu S.C., Smialek J.E.* Zolpidem distribution in postmortem cases // *J. Forensic Sci.* — 1999. — Vol. 44. — № 2. — P. 369—371.
- [2] *Logan B.K., Couper P.D., Couper F.J.* Zolpidem and driving impairment // *J. Forensic Science.* — 2001. — Vol. 46. — № 1. — P. 105—110.
- [3] *Hempel G., Blaschke G.* Direct determination of zolpidem and its main metabolites in urine using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection // *Journal of Chromatography B.* — 1996. — Vol. 675. — P. 131—137.
- [4] *Шилова Е.А., Егорова Е.И.* Количественное определение золпидема в моче методом газовой хроматографии — масс-спектрометрии // *Вестник ПГФА.* — 2009. — № 5. — С. 165—167.
- [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. — Vol. 56. — P. 297—304.

INVESTIGATION OF ZOLPIDEM IN REAL URINE SAMPLES AT THERAPEUTIC DOSES LEVEL

Y.A. Khomov, E.A. Krylova

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 results of determination of zolpidem in urine by solid-phase extraction (SPE) and gas chromatography — mass spectrometry (GC/MS) after single therapeutic doses are presented.

Key words: zolpidem, solid-phase extraction, gas chromatography — mass spectrometry, single therapeutic dose.