
ИЗОЛИРОВАНИЕ ЗОЛПИДЕМА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ

Ю.А. Хомов, Е.И. Егорова, М. Дайех

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

Представлены результаты исследований по изолированию золпидема из биологических субстратов методами экстракции, хроматографии в тонком слое сорбента и УФ-спектрофотометрии.

Ключевые слова: золпидем, изолирование, экстракция.

Одним из важнейших этапов при проведении химикотоксикологических и судебно-химических исследований является подготовка объекта для анализа.

Биологические субстраты — ткани органов, представляющие собой сложные смеси, содержат большое количество органических соединений, концентрация которых соизмерима с концентрацией лекарственных веществ и их метаболитов. Вследствие этого выделение лекарственных веществ и их метаболитов из биопроб и их очистка для проведения дальнейшего анализа является трудной аналитической задачей. Успех исследования во многом зависит от эффективности пробоподготовки.

В продолжение исследований по разработке химико-токсикологического анализа золпидема [1] в данном сообщении приводятся результаты прогнозирования и экспериментального изучения экстрагируемости золпидема различными органическими растворителями в зависимости от рН среды, а также схема изолирования и определения его в биологических субстратах.

Материалы и методы. Для решения вопроса максимального изолирования соединения из объектов анализа важен процесс прогнозирования оптимальных условий его экстракции, который зависит от ряда факторов: показателя ионизации, коэффициента распределения и др. По литературным данным, рКа золпидема составляет 6,2, что подтверждает основные свойства соединения; $\log P$ 3,85 [2], что показывает наличие у соединения гидрофильных свойств.

Золпидем был включен в программу для ПК [3], которая позволила получить значения степени ионизации золпидема в процентах при рН 1—14. Установлено, что при рН 1—2 исследуемое соединение полностью ионизировано. Начиная с рН 3, появляется его молекулярная форма, которая достигает 100% при рН 10. Поэтому сделано предположение, что максимальная экстракция золпидема органическими растворителями из водных извлечений должна достигаться при рН 9—10. Степень ионизации золпидема при данных рН минимальна. Процент ионизации составляет 0,16% при рН 9 и 0,02% при рН 10. Однако, в связи с лабильностью соединения в щелочной среде (наличие амидной группировки), следует предполагать как наиболее оптимальное значение рН среды 8.

Далее нами было проведено экспериментальное подтверждение предположений экстрагируемости золпидема в зависимости от рН среды различными ор-

ганическими растворителями. Для чего использовали универсальные буферные растворы Бриттона и Робинсона и свежеперегнанные растворители: хлороформ, метиленхлорид, эфир.

Значения pH определяли универсальным иономером МВ-74. Количественное определение золпидема осуществляли УФ-спектрофотометрически в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты в кюветах с толщиной слоя 10 мм относительно чистого растворителя. Абсорбцию измеряли при 295 нм (аналитическая длина волны). Концентрацию рассчитывали по уравнению закона Бера при удельном показателе поглощения 480 для золпидема. Подчинение основному закону светопоглощения наблюдается в интервалах концентраций от 4 до 32 мкг/мл. Коэффициент корреляции составил 0,99999. Чувствительность определения 0,21 мкг/мл [4].

Установлено, что золпидем экстрагируется органическими растворителями, достигая максимума экстракции хлороформом 99,50%, метиленхлоридом 99,85%, эфиром 98,43% при pH 8.

Как показали экспериментальные данные, хлороформ может служить оптимальным экстрагентом для изолирования золпидема из биологических объектов при ненаправленных химико-токсикологических анализах. При направленных исследованиях в качестве оптимального экстрагента для золпидема могут быть использованы, кроме хлороформа, метиленхлорид или эфир. Полученные результаты послужили основой для разработки методик определения золпидема в биосубстратах.

При отсутствии в доступной литературе данных по изолированию золпидема нами использовались приемы, которые находят применение в практике химико-токсикологических анализов путем настаивания водой, подкисленной щавелевой кислотой с последующей экстракцией органическим растворителем [5].

Однако при изолировании из биологических субстратов необходимо учитывать также наличие фоновых соединений. Вопросы очистки золпидема от сопутствующих соэкстрактивных веществ проводили использованием приемов центрифугирования и хроматографического исследования в тонких фиксированных слоях сорбента. Хроматографию осуществляли восходящим способом на пластинках ВЭТСХ. В качестве подвижной фазы использовали систему диоксан — хлороформ — ацетон — 25% раствор аммиака 47,5 : 45 : 5 : 2,5. При анализе биосубстрата величина $R_f = 0,67$. Изолирование золпидема из биосубстрата (ткань печени) проводили водой, подкисленной щавелевой кислотой. Методика изолирования представлена в виде подробной схемы вместе с этапами качественного и количественного анализа.

Схема изолирования и исследования биосубстрата на золпидем

Объект исследования — печень 25 г

Настаивание с водой 1 : 2, 2 часа

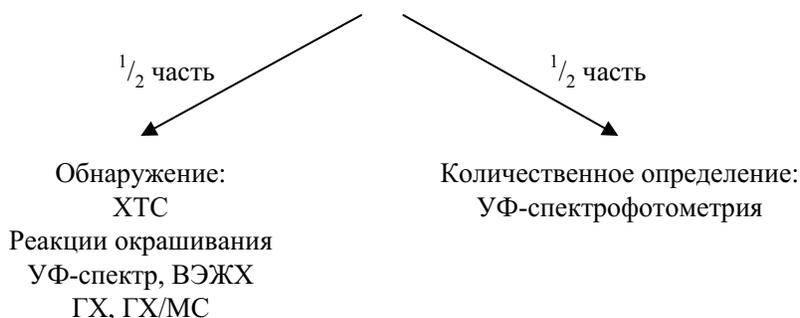
pH 2 ($H_2C_2O_4$)

Центрифугирование 2,5 тыс. об/мин., 20 минут

Водное извлечение (центрифугат)

25% раствор NH_4OH , pH 8

Хлороформ — 3 раза по 10, 10, 5 мл по 10 минут на электровстряхивателе
 Хлороформный экстракт
 Безводный Na₂SO₄ (фильтрация через стеклянный фильтр)



Методика УФ-спектрофотометрического количественного определения золпидема была применена для исследования биосубстрата. Для чего $\frac{1}{5}$ — $\frac{1}{2}$ часть хлороформного извлечения концентрировали, количественно наносили на стартовую линию хроматографической пластинки в виде полоски длиной 1,5—1,8 см параллельно меткику — стандартный раствор золпидема 1 мг/мл, нанесенный в виде точки. Хроматографировали в указанных выше условиях. Золпидем детектировали в виде фиолетовых пятен при экспонировании в УФ-свете при 254 нм. Зону золпидема, выделенного из биообъекта, для количественного определения снимали и элюировали 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты (5 мл). Измеряли оптическую плотность полученного элюата при 295 нм.

Было поставлено несколько серий опытов по определению золпидема в условиях модельного эксперимента (искусственные смеси 25 г измельченной печени при заправке 0,5 и 1 мг золпидема). Каждая серия сопровождалась постановкой контрольного опыта (25 г измельченной печени, к которой не добавляли исследуемое вещество).

Исследованию при направленном анализе подвергались хлороформные экстракты, полученные из щелочного раствора в аликвотах $\frac{1}{5}$ часть от извлечения при заправке 0,5 и 1 мг на 25 г печени.

Результаты количественного определения золпидема, изолированного из биосубстрата, представлены в табл. 1.

Таблица 1

Результаты количественного определения золпидема в печени

Добавлено, мг	Найдено, %	Метрологические характеристики
0,5	76,82	$\bar{X} = 71,62$
	70,57	$S = 4,36$
	67,19	$S \bar{X} = 1,95$
	68,01	$\epsilon\alpha = 5,42$
	75,52	$E = 7,57$
1	78,32	$\bar{X} = 76,96$
	76,24	$S = 4,75$
	69,18	$S \bar{X} = 2,12$
	81,46	$\epsilon\alpha = 5,89$
	79,59	$E = 7,65$

Как видно из данных табл. 1, предложенная методика дает воспроизводимые результаты и позволяет выделить из ткани печени в среднем 71,62% и 76,96% вещества при затратке 0,5 и 1 мг при относительной погрешности определения 5,42% и 5,89% соответственно.

Установлено, что сочетание хроматографии в тонком слое сорбента с центрифугированием и фильтрованием через мелкопористый стеклянный фильтр с безводным Na₂SO₄ обеспечивают условия для получения достоверных результатов УФ-спектрофотометрического определения золпидема в биосубстратах.

Таким образом, проведено теоретическое прогнозирование и экспериментальное изучение степени экстрагируемости золпидема из водных растворов в зависимости от pH среды и природы органического растворителя. Определена модель и разработана схема изолирования биосубстрата при направленном анализе для определения золпидема на основе экстракции хлороформом и УФ-спектрофотометрии. Методика может быть рекомендована для использования в химико-токсикологическом анализе на золпидем.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Хомов Ю.А., Егорова Е.И., Кокшарова Н.В. и др. Химико-токсикологический анализ золпидема // Вестник РУДН. Серия «Медицина». — 2009. — № 4. — С. 469—473.
- [2] Baselt R. Disposition of toxic drugs and chemicals in man. 5-th ed. — California: Chemical Toxicology Institute Foster City, 2000. — P. 896.
- [3] Хомов Ю.А. Исследования в области химико-токсикологического анализа азотсодержащих соединений основного характера: Автореф. дисс. ... докт. фарм. наук. — Пермь, 1996. — 50 с.
- [4] Хомов Ю.А., Егорова Е.И., Бабушкина Е.Б. и др. Аналитическое изучение золпидема спектральными методами // Человек и лекарство: Тез. докл. XV Рос. нац. конгр. Москва, апрель 2008. — М., 2008. — С. 567—568.
- [5] Саломатин Е.М., Николаева Э.Г. Судебно-химический анализ трупного материала на наличие лекарственных и наркотических соединений // Судебно-медицинская экспертиза. — 1999. — № 3. — С. 21—22.

ISOLATION OF ZOLPIDEM FROM BIOLOGICAL SUBSTRATS

Y.A. Khomov, E.I. Egorova, M. Dayeh

Department of Pharmaceutical Chemistry FDPO PSFA
Pharmaceutical academy
Beloevskaya str., 1-68, Perm, Russia, 614067

Article presents the results of studies on separation of Zolpidem from biological substrates by methods of extraction chromatography (in a think layer) and UV-spectrophotometry.

Key words: zolpidem, separation, extraction.