

УДК 615.214.24:543.857.6

РОЗРОБКА КОЛЬОРОВИХ РЕАКЦІЙ НА ЗОПІКЛОН

В.В.Болотов, Л.Ю.Клименко

Національний фармацевтичний університет,
61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53. E-mail: anchem@ukrfa.kharkov.ua*Ключові слова:* зопіклон; лужний гідроліз; кислотний гідроліз; пергідроліз;
тонкошарова хроматографія; кольорові реакції

Проведено лужний та кислотний гідроліз, а також пергідроліз зопіклону, запропоновано та підтверджено структуру деяких продуктів, що утворюються при цьому. Запропоновано комплекс кольорових реакцій на зопіклон, які дозволяють дуже специфічно відрізнити зопіклон від інших лікарських препаратів, встановлена їх чутливість.

DEVELOPMENT OF THE COLOURED REACTIONS TO ZOPICLONE

V.V.Bolotov, L.Yu.Klimenko

Alkaline and acid hydrolysis and perhydrolysis of zopiclone have been conducted, the structure of the forming products has been offered and confirmed. The complex of the coloured reactions to zopiclone has been offered. They allow to distinguish zopiclone from other medications very specifically, their sensitivity has been determined.

РАЗРАБОТКА ЦВЕТНЫХ РЕАКЦИЙ НА ЗОПИКЛОН

В.В.Болотов, Л.Ю.Клименко

Проведен щелочной и кислотный гидролиз, а также пергидролиз зопиклона, предложена и подтверждена структура некоторых продуктов, образующихся при этом. Предложен комплекс цветных реакций на зопиклон, позволяющих очень специфично отличить зопиклон от других лекарственных препаратов, установлена их чувствительность.

Зопіклон — (5RS)-6-(5-хлорпіридин-2-іл)-7-оксо-6,7-дигідро-5Н-піроло-[3,4-*b*]піразин-5-іл-4-метилпіперазин-1-карбоксилат (1) є снодійним препаратом групи циклопіролонів, що випускається за рецептом та широко застосовується для лікування безсоння [1-3] (схема 1).

Препарат за даними наукової літератури викликає інтерес у хіміко-токсикологічному відношенні [4-7]. Клінічна картина отруєнь зопіклоном та морфологічні зміни в організмі при цьому не є характерними та мають багато спільного з препаратами групи бензодіазепінів [8, 9]. Діагностика отруєнь цим препаратом, як і взагалі снодійними засобами, ускладнюється ще тим, що разом з ним застосовуються інші препарати (бензодіазепіни, фенотіазини, золпідем, варфарин, лепонекс, фенобарбітал та ін.) [3, 5, 8]. Саме тому в діагностиці цих отруєнь велике значення мають результати хіміко-токсикологічних досліджень.

Метою даної роботи є розробка кольорових реакцій для виявлення зопіклону, які б дозволили достатньо селективно виявити зопіклон у присутності інших лікарських препаратів, що можуть застосовуватись разом з ним.

Згідно з даними літератури [10] зопіклон метаболізує на 95% з утворенням N-оксиду зопіклону (2), N-дезметилзопіклону (3) та продуктів гідролізу складного ефіру (4, 5) (схема 2).

Цікаво, що зопіклон та його метаболіти 2, 3, 4 гідролізуються в лужному середовищі з утворенням 2-аміно-5-хлорпіридину (6), тому останній може бути використаний як маркер наявності зопіклону. За 2-аміно-5-хлорпіридином можна визначити загальну кількість зопіклону в об'єкті [11, 12].

Стосовно інших продуктів розкладу зопіклону та його метаболітів у лужному середовищі у відомостях літератури ми не знайшли. Нами було зроблено припущення, що в результаті лужного гідролізу зопіклону утворюються крім 2-аміно-5-хлорпіридину солі кислот (7 та 8) (схема 3).

Для того щоб підтвердити утворення сполуки 7 з альдегідною групою, нами виконані реакції на продукти лужного гідролізу: з реактивом Несслера, реакція утворення оксиму, а також ряд реакцій з ароматичними амінами і 2,4-динітрофенілгідрозином.

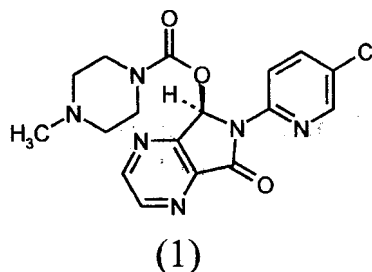
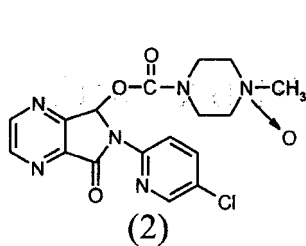
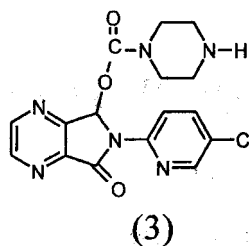


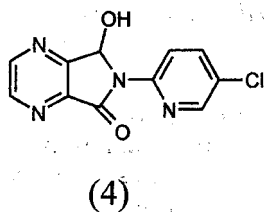
Схема 1



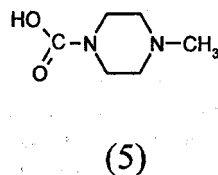
N-оксид зопіклону



N-дезметилзопіклон



(7RS)-6-(5-хлоропіридин-2-іл)-
-7-гідрокси-6,7-дигідро-
5H-піроло[3,4-b]піразин-5-он



4-метилпіперазин-1-
карбонова кислота

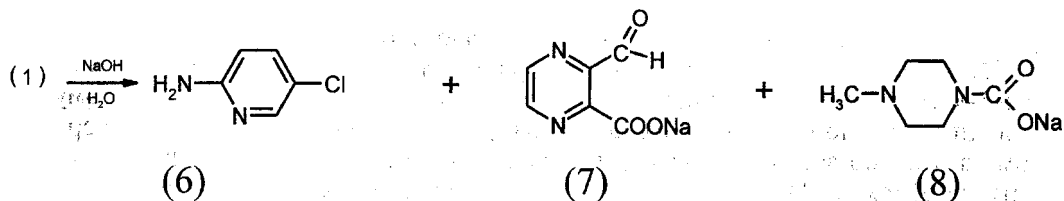
Схема 2

Наявність у молекулі зопіклону складноєфірного та амідного зв'язку дозволяє припустити можливість перебігу реакції пергідролізу препарату [13] за схемою 4.

Таким чином, одна молекула препарату може бути постачальником трьох пероксокарбоксильних груп (сполуки 9 та 10), утворення яких

можна підтвердити, використовуючи їх як окисники деяких ароматичних амінів (бензидин, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, о-фенілендіамін) та індолу [13, 14].

Результати кольорових реакцій наведені в табл. За допомогою проведених реакцій підтверджено утворення продуктів лужного гідролізу зопік-

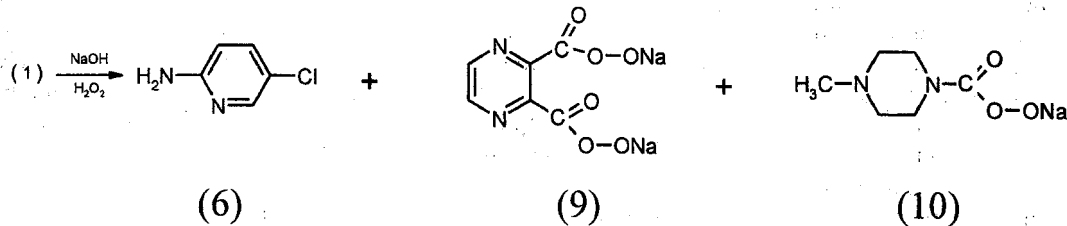


2-аміно-5-хлор-
піридин

піразин-3-аль-
-2- карбоксилат
натрію

4-метилпіперазин-1-
карбоксилат натрію

Схема 3



2-аміно-5-хлор-
піридин

піразин-2,3-
-дипероксо-
карбоксилат
натрію

4-метилпіперазин-1-
пероксокарбоксилат
натрію

Схема 4

Результати кольорових реакцій на хроматографічних пластинках

Розчин для обприскування*	Забарвлення / чутливість, мкг	Функціональна група та сполука, які беруть участь у реакції
1	жовтогаряче / 0,1	третинний атом азоту
2	коричневе / 0,1	органічні сполуки
3	коричневе / 0,1	- " - " -
4	жовтогаряче → сіре / 0,1	альдегідна група сполуки 7.
5	жовте / 5,0	- " - " -
6	яскраво-жовте → жовтогаряча флуоресценція при нагріванні / 0,1	- " - " -
7	зелене → фіолетове / 0,5	- " - " -
8	чорне / 0,1	- " - " -
9	синє / 0,1	- " - " -
10	жовто-коричневе / 0,5	пероксокарбоксильні групи сполук 9 та 10
11	блід-жовте / 1,0	- " - " -
12	червоно-коричневе / 0,1	- " - " -
13	червоно-коричневе / 0,1	- " - " -
14	жовте / 0,1	первинна ароматична аміногрупа сполуки 6

* Склад розчинів для обприскування та методика обробки пластинок:

1 - реактив Драгендорфа за Муньє [15];

2 - реактив Вагнера [15];

3 - реактив Бушарда [15];

4 - реактив Неслера [15];

5 - пластинки обробляють 10% розчином NaOH, висушують при кімнатній температурі та обробляють 0,4% розчином 2,4-динітрофенілгідазину в 2 М розчині хлористоводневої кислоти;

6 - пластинки обробляють 0,5% розчином бензидину в суміші етанолу та 20% розчину NaOH (1:1), висушують при кімнатній температурі та обробляють 80% розчином оцтової кислоти;

7 - пластинки обробляють 10% розчином NaOH, висушують при кімнатній температурі та обробляють 2% розчином о-фенілендіаміну в суміші льодяної оцтової кислоти та води (1:3);

8 - пластинки обробляють 10% розчином NaOH, висушують при кімнатній температурі, обробляють 5% розчином гідроксиламіну гідрохлориду в етанолі, висушують при кімнатній температурі та обробляють 2% розчином хлориду заліза (III);

9 - пластинки обробляють 10% розчином NaOH, висушують при кімнатній температурі, обробляють розчином 0,6 г о-толуїдину гідрохлориду в 9,4 мл льодяної оцтової кислоти, розташовують поміж двох предметних скелець, нагрівають при 100°C протягом 15 хв та обприскують водою;

10 - суміш 10% розчину NaOH, 10% розчину H₂O₂ та 0,1 М розчину 3,3',5,5'-тетра-метилбензидину в етанолі (1:1:1);

11 - суміш 10% розчину NaOH, 10% розчину H₂O₂ та 0,5% розчину бензидину в етанолі (1:1:1);

12 - суміш 10% розчину NaOH, 10% розчину H₂O₂ та 2% розчину о-фенілендіаміну в етанолі (1:1:1);

13 - суміш 10% розчину NaOH, 10% розчину H₂O₂ та 2% розчину індолу в етанолі (1:1:1);

14 - пластинки обробляють 10% розчином NaOH, висушують при кімнатній температурі, обробляють 20% розчином HCl, висушують при кімнатній температурі та обробляють 5% розчином п-диметиламінобензальдегіду [16] у хлороформі.

лону 6 та 7, зокрема реакціями 4-9 підтверджено наявність альдегідної групи у продукті гідролізу 7.

Реакцією 14 підтверджено утворення 2-аміно-5-хлорпіридину.

Реакціями 10-13 підтверджено перебіг пергідролізу зопіклону та утворення при цьому перкислот.

Можна припустити, що лужний гідроліз та пергідроліз метаболітів зопіклону 2, 3 та 4 також перебігають за подібними схемами.

Також викликало інтерес вивчення продуктів, що утворює зопіклон в умовах кислотного гідролізу, що використовуються в аналізі бензодіазе-

пінів [17]. Можливу структуру продуктів, які утворюються при цьому, подано на схемі 5.

Для підтвердження структури продуктів, що утворилися, хлороформні витяги із лужного та кислотного гідролізатів піддавали дослідженню методом тонкошарової хроматографії у присутності "свідків". Як "свідки" використовували спиртові розчини зопіклону та 2-аміно-5-хлорпіридину. Хроматограми елюювали в системі розчинників хлороформ-ацетон (8:2) та проявляли в УФ-світлі до та після обробки парами концентрованої хлористоводневої кислоти: зопіклон в УФ-світлі має салатну флуоресценцію до та після обробки

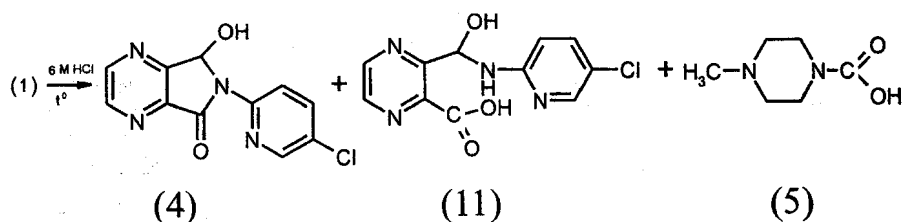


Схема 5

парами концентрованої хлористоводневої кислоти, а 2-аміно-5-хлорпіридин має фіолетову флуоресценцію в УФ-світлі тільки після обробки пластин парама концентрованої хлористоводневої кислоти. Послідовна обробка пластин парама концентрованої хлористоводневої кислоти та 5% розчином п-диметиламінобензальдегіду у хлороформі призводить до появи жовтого забарвлення плями 2-аміно-5-хлорпіридину. Значення R_f для зопіклону становило 0,09, для 2-аміно-5-хлорпіридину — 0,31.

При хроматографуванні хлороформної витяжки 1 (див. експ. част.) із лужного гідролізату на хроматограмі виявлялась одна пляма на рівні з 2-аміно-5-хлорпіридином, що також має фіолетову флуоресценцію в УФ-світлі після обробки пластин парама концентрованої хлористоводневої кислоти та забарвлюється в жовтий колір після наступної обробки 5% розчином п-диметиламінобензальдегіду у хлороформі.

При хроматографуванні хлороформної витяжки 2 (див. експ. част.) із кислотного гідролізату на хроматограмі виявлялись дві плями ($R_f = 0,25$; $0,38$), що мають салатну флуоресценцію в УФ-світлі. При хроматографуванні хлороформної витяжки 3 (див. експ. част.) із кислотного гідролізату на хроматограмі виявлялась одна пляма ($R_f = 0,25$), що має салатну флуоресценцію в УФ-світлі.

Відсутність у випадку хроматографування витяжки 3 ще однієї плями порівняно з витяжкою 2 може свідчити про те, що при кислотному гідролізі утворюється крім продукту 4, ще і сполука 11, яка має вільну карбоксильну групу. За рахунок цієї карбоксильної групи при нейтралізації кислотного гідролізату розчином натрію гідроксиду утворюється сіль, яка не переходить у хлороформну витяжку 3. Тому можна припустити, що плямі з $R_f = 0,25$ відповідає продукт 4, а плямі з $R_f = 0,31$ — продукт 11.

Для підтвердження структури продуктів кислотного гідролізу 4 та 11 подальше дослідження проводили методом двомірної хроматографії. На першу лінію старту хроматографічної пластинки наносили 10 мкл хлороформної витяжки 2 із кислотного гідролізату; хроматограму розвивали в системі розчинників хлороформ-ацетон (8:2) та проявляли в УФ-світлі (виявлялись дві плями — $R_f = 0,25$; та $R_f = 0,38$, що мають салатну флуоресценцію в УФ-світлі). Через центри утворених плям проводили другу лінію старту та наносили поряд 10 мкл спиртового розчину 2-аміно-5-хлорпіридину з концентрацією 1 мг/мл. Другу лінію

старту обробляли 10% розчином натрію гідроксиду; пластинку висушували та елюювали в системі розчинників хлороформ-ацетон (8:2) та проявляли в УФ-світлі до та після обробки парама концентрованої хлористоводневої кислоти, а також наступною обробкою пластин 5% розчином п-диметиламінобензальдегіду у хлороформі.

Спостерігали фіолетову флуоресценцію в УФ-світлі після обробки парама концентрованої хлористоводневої кислоти та жовте забарвлення плям ($R_f = 0,31$) після наступної обробки пластин 5% розчином п-диметиламінобензальдегіду у хлороформі для 2-аміно-5-хлорпіридину та продуктів лужного гідролізу речовин 4 та 11.

Таким чином, можна стверджувати, що при лужному гідролізі продуктів кислотного гідролізу зопіклону 4 та 11 утворюється 2-аміно-5-хлорпіридин, тобто він є структурним елементом зазначених продуктів.

Продукти кислотного гідролізу зопіклону 4 та 11 дають позитивний результат при проведенні кольорових реакцій 1-14 (див. табл.) на пластинках після розвитку хроматограм у системі хлороформ-ацетон (8:2), що також свідчить на користь припущення щодо структури продуктів 4 та 11.

Експериментальна частина

У роботі нами були використані такі реактиви: зопіклон фармакопейної чистоти, 2-аміно-5-хлорпіридин, о-фенілендіамін, бензидин, індол, 3,3', 5,5'-тетраметилбензидин, гідроксиламіну гідрохлорид, 2,4-динітрофенілгідазин, о-толуїдин, 30% розчин перекису водню, п-диметиламінобензальдегід, хлорид заліза (III) кваліфікації "х. ч." або "ч. д. а."

Реакції проводили на хроматографічних пластинках Sorbfil розміром 2x2 см (силікагель СТХ-1BE, тип підложки — ПЕТФ, зв'язуюча речовина — силіказоль, фракція — 8÷12 мкм, товщина шару — 100 мкм). Розчини речовин наносили на пластинку в точку. Після висушування плям при кімнатній температурі пластинки обприскували відповідними реактивами. Склад розчинів для обприскування та методики обробки пластин наведені в табл.

Методика лужного гідролізу препарату. До 1 мл спиртового розчину зопіклону з концентрацією 10 мг/мл додавали 5 мл 10% розчину гідроксиду натрію. Через 5 хв проводили екстракцію суміші хлороформом трічі порціями по 5 мл. Хлороформні витяжки об'єднували та упарювали до 5 мл (витяжка 1).

Методика кислотного гідролізу препарату. До 2 мл спиртового розчину зопіклону з концентрацією 10 мг/мл додавали 10 мл 6 М розчину кислоти хлористоводневої та кип'ятили на водяній бані протягом 1 год зі зворотним холодильником. Після охолодження суміші її ділили на дві частини. Першу частину екстрагували хлороформом тричі порціями по 5 мл. Хлороформні витяжки об'єднували та упарювали до 5 мл (витяжка 2). Другу частину доводили до рН = 5-6 10% розчином натрію гідроксиду та тричі екстрагували хлороформом порціями по 5 мл. Хлороформні витяжки об'єднували та упарювали до 5 мл (витяжка 3).

Методика хроматографічного дослідження лужного та кислотного гідролізатів. По 10 мкл отриманих хлороформних витяжок 1, 2 та 3 відповідно та розчинів "свідків" з концентрацією 1 мг/мл наносили на лінію старту хроматографічної пластинки.

Хроматографування проводили на пластинках Sorbfil (див. вище) розміром 10x10 см у камері об'ємом 500 см³, в яку вносили 50 мл систем розчинників. Камеру насичували протягом 30 хв.

Висновки

1. Проведено лужний гідроліз та пергідроліз зопіклону, запропоновані можливі схеми цих хімічних процесів, підтверджено утворення при цьому 2-аміно-5-хлорпіридину, а також наявність сполук з альдегідною, карбоксильною та пероксокарбоксильною групами.

2. Проведено кислотний гідроліз зопіклону, запропоновано та підтверджено структуру продуктів, що утворюються при цьому.

3. Запропоновано кольорові реакції на зопіклон, встановлено їх чутливість. Комплекс запропонованих реакцій дозволяє дуже специфічно відрізнити зопіклон від інших лікарських препаратів.

Література

1. Koski A., Ojanpera I., Akbari A. // *Hum. Exp. Toxicol.* — 2003. — №41 (5). — P. 17-20.
2. Wagner J., Wagner M.L., Hening W.A. // *Ann. Pharmacother.* — 1998. — Vol. 32 ISS, Jun. — P. 680-691, P. 726-727.
3. Yamazaki M., Terada M., Mitsukuni Y., Yoshimura M. // *Nippon Hoigaku Zasshi.* — 1998. — Aug., №52 (4). — P. 245-252.
4. Galloway J.H., Marsh I.D., Newton C.M., Forrest A.R. // *Sci. Justice.* — 1999. — №39 (4). — P. 253-256.
5. Mannaert E., Tytgat J., Daenens P. // *J. Anal. Toxicol.* — 1997. — №43 (5). — P. 471-474.
6. Pounder D., Davies J. // *J. Anal. Toxicol.* — 1996. — №20 (4). — P. 273 - 274.
7. Reith D.M., Fountain J., McDowell R., Tilyard M. // *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* — 2003. — №41 (7). — P. 975-980.
8. Hajak G., Rodenbeck A. // *PharmacoEcon.* — 1996. — Vol. 10 ISS, suppl. 1. — P. 29-38.
9. Ruiz R.M.D., Garcia S.F.M., Moreno G.R. // *Farm. Clin.* — 1995. — Vol. 12 ISS, Jun. — P. 337-338, P. 340-346.
10. Gaillot J., Le Roux Y., Houghton G.W. // *Sleep.* — 1987. — Vol. 10. — P. 7-21.
11. Grobler L.A., Schweltnus M.P., Trichard C., Calder S. // *Clin. J. Sport Med.* — 2000. — Apr., №10 (2). — P. 123-128.
12. Meatherall R.C. // *J. Forensic Sci.* — 1997. — №42 (2). — P. 340-343.
13. Франке З., Франц П., Варнке В. *Химия отравляющих веществ.* / Пер. с нем. под ред. акад. И.Л.Кнулянца и д-ра хим. наук Р.Н.Стерлинга. — М.: Химия, 1973. — Т. 2. — 404 с.
14. Мюллер Г., Отто М., Вернер Г., *Каталитические методы в анализе следов элементов* / Пер с нем. — М.: Мир, 1983. — 200 с.
15. *Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals body fluids and postmortem material.* — London: The Pharm. Press, 1986. — 1200 p.
16. Коренман И.М. *Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений.* Изд. 2-е, перераб. и доп. — М.: Химия, 1975. — 360 с.
17. Еремин С.К., Изотов Б.Н., Веселовская Н.В. *Анализ наркотических средств. Руководство по химико-токсикологическому анализу наркотических и других одурманивающих средств.* — М.: Мысль, 1993. — 272 с.

Надійшла до редакції 22.12.2004 р.