

УДК 615.214.24:543.857.6

## ВИСОКОЕФЕКТИВНА РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ В АНАЛІЗІ ЗОПІКЛОНУ

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; 2-аміно-5-хлорпіридин; високоефективна рідинна хроматографія*

**Запропоновані умови якісного аналізу зопіклону, продуктів його лужного та кислотного гідролізу методом ВЕРХ. Встановлено, що лужний гідроліз зопіклону відбувається кількісно. Розроблені методики кількісного визначення зопіклону та продукту його лужного гідролізу — 2-аміно-5-хлорпіридину методом ВЕРХ.**

### HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY IN THE ANALYSIS OF ZOPICLONE

V.V.Bolotov, L.Yu.Klimenko

**The conditions of the qualitative analysis of zopiclone, products of its alkaline and acid hydrolysis by HPLC method have been offered. It has been proven that the alkaline hydrolysis of zopiclone flows in number. The methods of the quantitative determination of zopiclone and the product of its alkaline hydrolysis — 2-amino-5-chloropyridine by HPLC method have been developed.**

### ВИСОКОЕФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ В АНАЛИЗЕ ЗОПИКЛОНА

В.В.Болотов, Л.Ю.Клименко

**Предложены условия качественного анализа зопиклона, продуктов его щелочного и кислотного гидролиза методом ВЭЖХ. Установлено, что щелочной гидролиз зопиклона протекает количественно. Разработаны методики количественного определения зопиклона и продукта его щелочного гидролиза — 2-амино-5-хлорпиридина методом ВЭЖХ.**

У практиці хіміко-токсикологічного аналізу досить поширеною є ситуація, що характеризується повною невизначеністю переліку речовин, на наявність яких треба проводити аналіз. Такою, наприклад, є ситуація отруєння невідомою речовиною або речовинами.

Одним з найбільш поширених методів хіміко-токсикологічного аналізу є високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), але її використання у традиційному вигляді вимагає застосування для кожної речовини “своєї” хроматографічної колонки, “своїх” мобільних фаз, а також “своєї” унікальної процедури аналізу [1]. У ситуації невизначеності це потребує великої кількості експериментів і відповідно, великої кількості матеріалів для аналізу.

Альтернативою традиційному ВЕРХ-аналізу є тиражуваний ВЕРХ-аналізатор для аналізу великої кількості речовин, створити який робилося багато спроб [2-4]. Цей підхід полягає в проведенні аналізу всіх сполук певного списку — від 20 до 500 найменувань — в одній хроматографічній системі, заздалегідь відкаліброваної по кожній речовині окремо. Ідентифікацію піків на хроматограмі досліджуваної речовини виконують шляхом порівняння її часу утримування та спектральних харак-

теристик в області УФ-спектра з параметрами, заздалегідь отриманими для стандартних речовин. Сукупність таких “довідкових” параметрів являє собою “базу даних”. Застосування ВЕРХ-аналізатора спрощує процедуру аналізу та зводить його тривалість до мінімуму. Прототип такого аналізатора розроблено на основі хроматографа “Міліхром А-02”, який має ряд переваг [5]:

— хроматограф “Міліхром А-02” виготовляється за технологією, яка гарантує зберігання його основних технічних характеристик від прибору до прибору;

— робота з колонками об’ємом лише 0,2 мл, що дозволяє, маючи 1 кг сорбенту однієї партії, зробити 5000 однакових колонок та протягом декількох років використовувати їх без корегування “базу даних”;

— забезпечення економії дорогих рухомих фаз;

— застосування елюентів, які мають високу прозорість у короткохвильовій області УФ-спектра та не містять УФ-поглинаючих домішок, що виявляються у вигляді додаткових піків на хроматограмі; наявність у рухомій фазі кислоти (рН 2,8) поліпшує хроматографування карбонових кислот, а високий вміст іонів літію поліпшує хроматографування амінів;

Таблиця 1

Основні хроматографічні параметри зопіклону та 2-аміно-5-хлорпіридину при визначенні методом ВЕРХ

Речовина	$t_R$	$V_R$	$R (S_{\lambda} / S_{210})$							
			$\frac{210 \text{ нм}}{210 \text{ нм}}$	$\frac{220 \text{ нм}}{210 \text{ нм}}$	$\frac{230 \text{ нм}}{210 \text{ нм}}$	$\frac{240 \text{ нм}}{210 \text{ нм}}$	$\frac{250 \text{ нм}}{210 \text{ нм}}$	$\frac{260 \text{ нм}}{210 \text{ нм}}$	$\frac{280 \text{ нм}}{210 \text{ нм}}$	$\frac{300 \text{ нм}}{210 \text{ нм}}$
Зопіклон	13,738	1373,8	1,0000	0,9837	0,6383	0,2167	0,2058	0,2801	0,6231	1,0756
2-Аміно-5-хлор-піридин	7,065	706,5	1,0000	0,2829	0,6686	1,0426	0,3489	0,0298	0,1068	0,3254

Таблиця 2

Основні хроматографічні параметри лужного та кислотного гідролізітів при визначенні методом ВЕРХ

Речовина	$t_R$	$V_R$	$R (S_{\lambda} / S_{210})$							
			$\frac{210 \text{ нм}}{210 \text{ нм}}$	$\frac{220 \text{ нм}}{210 \text{ нм}}$	$\frac{230 \text{ нм}}{210 \text{ нм}}$	$\frac{240 \text{ нм}}{210 \text{ нм}}$	$\frac{250 \text{ нм}}{210 \text{ нм}}$	$\frac{260 \text{ нм}}{210 \text{ нм}}$	$\frac{280 \text{ нм}}{210 \text{ нм}}$	$\frac{300 \text{ нм}}{210 \text{ нм}}$
Лужний гідролізіт	7,067	706,7	1,0000	0,3097	0,6800	1,0445	0,3495	0,0206	0,1048	0,3292
Кислотний гідролізіт	12,863	128,63	1,0000	0,9531	0,7207	0,2742	0,2421	0,2985	0,6508	1,1553

— УФ-детектування проводиться одночасно при 8 довжинах хвиль: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 та 300 нм, тому кожній речовині на хроматограмі відповідає 8 піків з однаковим часом утримування, але з різними амплітудами, прямо пропорційних абсорбції речовини. Для кожної речовини розраховуються 7 характерних нормованих спектральних параметрів — відношення площ піків при довжинах хвиль  $\lambda_2 - \lambda_8$  до площі піку при довжині хвилі  $\lambda_1 = 210 \text{ нм}$  ( $R = S_{\lambda} / S_{210}$ ). Сукупність цих спектральних відношень  $R$  разом з величиною об'єму утримування ( $V_R$ ) використовується для ідентифікації піку речовини на хроматограмі.

Нами було поставлено за мету провести аналіз зопіклону та продукту його розпаду в лужному середовищі [6] — 2-аміно-5-хлорпіридину методом ВЕРХ у зазначених умовах.

Основні хроматографічні параметри зопіклону та 2-аміно-5-хлорпіридину при визначенні методом ВЕРХ за зазначеною методикою наведені в табл. 1, а типова хроматограма — на рис. 1.

При цьому було встановлено, що мінімальна концентрація зопіклону та 2-аміно-5-хлорпіридину в розчині, яку можна визначити за допомогою наведеної методики, становить 1 мкг/мл та 0,25 мкг/мл відповідно, що відповідає вмісту речовин у введеному об'ємі проби 2 нг та 0,5 нг відповідно.

Викликає інтерес вивчення методом ВЕРХ також продуктів лужного гідролізу зопіклону та продуктів розпаду зопіклону в умовах кислотного гідролізу, що застосовуються в аналізі препаратів групи бензодіазепінів [7].

У табл. 2 наведені основні хроматографічні параметри отриманих лужного та кислотного гідролізітів.

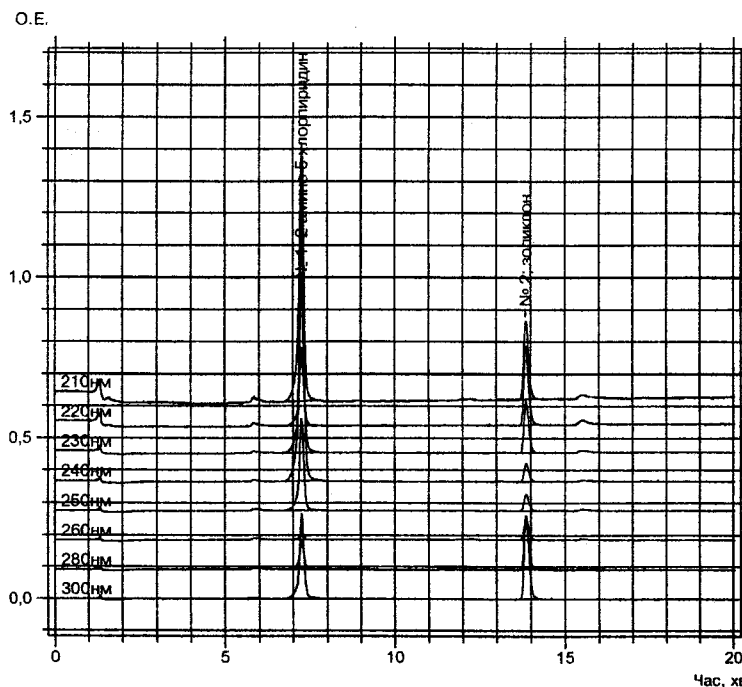


Рис. 1. Хроматограма розчинів 2-аміно-5-хлорпіридину (1) та зопіклону (2), отримана методом ВЕРХ.

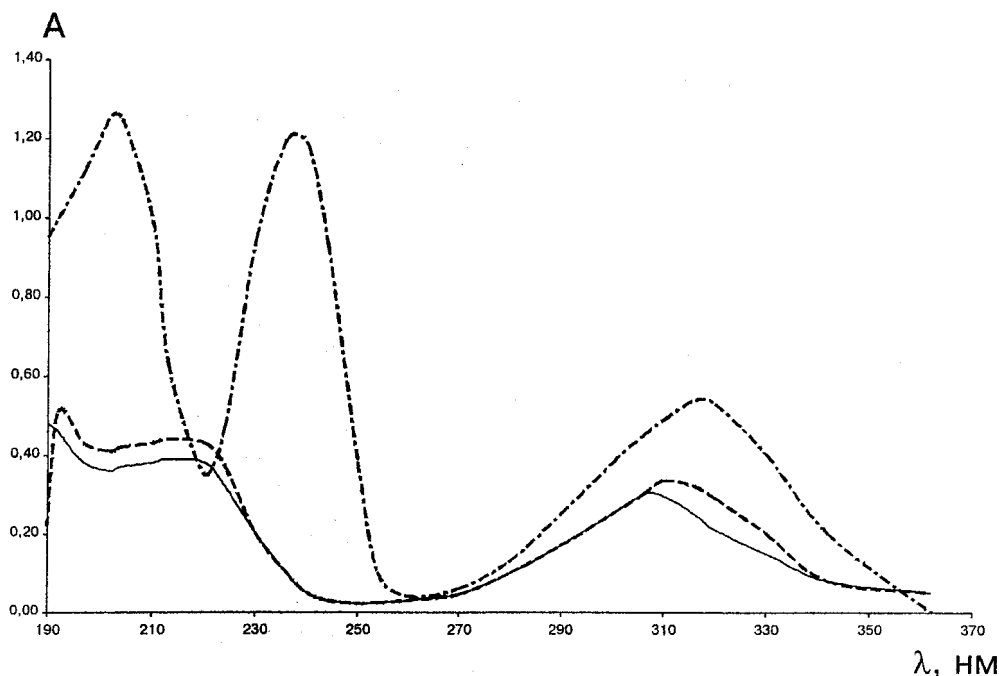


Рис. 2. УФ-спектри розчинів зопіклону (—), продукту його кислотного гідролізу (— · — · —) та 2-аміно-5-хлорпіридину (— · — · —).

ролізатів при визначенні методом ВЕРХ за зазначених умов.

Порівняльна оцінка даних табл. 1 та 2 свідчить, що в умовах лужного гідролізу утворюється 2-аміно-5-хлорпіридин, що підтверджується за величинами часу утримування та спектральних характеристик. За умов кислотного гідролізу утворюється речовина, яка має час утримування 12,9 хв, але її спектральні характеристики нагадують останні для зопіклону. Нами було додатково знято УФ-спектр цієї речовини (рис. 2), який також нагадує УФ-спектр зопіклону, але має максимум при довжині хвилі 310 нм на відміну від зопіклону ( $\lambda_{\max} = 304$  нм).

Раніше нами було зроблено припущення, що процес кислотного гідролізу зопіклону відбувається за естерним зв'язком з утворенням 6-(5-хлорпіридин-2-іл)-5-гідрокси-7-оксо-6, 7-дигідро-5Н-піроло[3,4-б]піразину [8]. Дані, отримані методом ВЕРХ, свідчать на користь цього припущення, оскільки фрагмент молекули, що відщеплюється за цих умов, не повинен здійснювати будь-який значимий вплив на поглинання в УФ-області.

Нами розроблені методики кількісного визначення зопіклону та 2-аміно-5-хлорпіридину методом ВЕРХ. З цією метою було виготовлено серію розчинів зазначених речовин та проведено їх хроматографування за вказаних умов.

За отриманими даними будували градувальні графіки, використовуючи як робочу довжину хвилі 300 нм для зопіклону та для 2-аміно-5-хлорпіридину. Цим графікам відповідають рівняння прямих (1) та (2) відповідно виду  $y = bx + a$ , які мають вигляд [9]:

$$S = 0,000616 \cdot C + 0,000225, \quad (1)$$

$$S = 0,0006269 \cdot C + 0,0001033, \quad (2)$$

де: S — площа піку,

C — концентрація речовини, мкг/мл.

Метрологічні характеристики отриманих градувальних залежностей [9] наведені в табл. 3.

Після перевірки значущості коефіцієнтів  $a$  в рівняннях (1) та (2) було зроблено висновок про неможливість переходу до рівнянь виду  $y = b \cdot x$  [9].

Отримані залежності лінійні для зопіклону та для 2-аміно-5-хлорпіридину в діапазоні концентрацій від 1 мкг/мл до 200 мкг/мл, що відповідає вмісту речовин у введеному об'ємі проби від 2 нг до 400 нг відповідно.

Отримані градувальні графіки та рівняння прямих (1) та (2) були використані для розрахунку концентрації зопіклону та 2-аміно-5-хлорпіридину в модельних розчинах.

Отримані дані наведені в табл. 4 та 5.

Таблиця 3

Метрологічні характеристики градувальних залежностей (1) та (2) площі піку від вмісту речовини ( $y = bx + a$ ), отриманих методом ВЕРХ

Пряма	$r^2$	b	a	$S^2$	$\Delta b$	$\Delta a$
1	1,0000	0,000616	0,000225	0,000000108	0,00000641	0,000657
2	1,0000	0,0006269	0,0001033	0,0000000445	0,00000412	0,0004226

Таблиця 4

Результати кількісного визначення зопіклону методом ВЕРХ у модельних розчинах ( $\lambda = 300$  нм; об'єм проби 2 мкл)

Концентрація розчину зопіклону, мкг/мл	Площа піку	Знайдено зопіклону		Метрологічні характеристики
		мкг/мл	%	
10,0	0,006231	9,75	97,50	$\bar{X}=99,41$ $S=1,498$ $S_x=0,749$ $\Delta\bar{X}=2,38$ $\epsilon=\pm 2,40\%$ $\bar{X}\pm\Delta\bar{X}=99,41\pm 2,38$
50,0	0,03124	50,35	100,70	
100,0	0,06213	100,50	100,50	
200,0	0,1221	197,85	98,93	

Відносна невизначеність середнього результату становить  $\pm 2,40\%$  та  $\pm 1,81\%$  відповідно.

Проведене кількісне визначення зопіклону за продуктом його лужного гідролізу — 2-аміно-5-хлорпіридином. Проводили лужний гідроліз зопіклону (див. експ. част.) та виконували хроматографування отриманих розчинів в зазначених умовах. Концентрацію зопіклону в розчині розраховували за допомогою рівняння прямої (2) та коефіцієнта перерахунку 2-аміно-5-хлорпіридину на зопіклон, що дорівнює 3,024.

Результати наведені в табл. 6.

Отримані дані свідчать про те, що лужний гідроліз зопіклону відбувається кількісно. Це дозволяє використовувати градувальний графік для кількісного визначення 2-аміно-5-хлорпіридину та зопіклону за продуктом його лужного гідролізу.

Оскільки зопіклон та його метаболіти в лужному середовищі гідролізуються з утворенням 2-аміно-5-хлорпіридину [6], цю методику можна використовувати для визначення “загального зопіклону” в біологічних об'єктах.

#### Експериментальна частина

В роботі ми використали такі реактиви: зопіклон фармакопейної чистоти та 2-аміно-5-хлорпіридин кваліфікації “х. ч.”.

Для проведення досліджень використовували розчини зопіклону та 2-аміно-5-хлорпіридину в

Таблиця 5

Результати кількісного визначення 2-аміно-5-хлорпіридину методом ВЕРХ у модельних розчинах ( $\lambda = 300$  нм; об'єм проби - 2 мкл)

Концентрація розчину 2-аміно-5-хлорпіридину, мкг/мл	Площа піку	Знайдено 2-аміно-5-хлорпіридину		Метрологічні характеристики
		мкг/мл	%	
10,0	0,006237	9,78	97,8	$\bar{X}=99,39$ $S=1,130$ $S_x=0,565$ $\Delta\bar{X}=1,80$ $\epsilon=\pm 1,81\%$ $\bar{X}\pm\Delta\bar{X}=99,39\pm 1,80$
50,0	0,03158	50,21	100,42	
100,0	0,06272	99,88	99,88	
200,0	0,1248	198,91	99,46	

Таблиця 6

Результати кількісного визначення зопіклону методом ВЕРХ у модельних розчинах за 2-аміно-5-хлорпіридином ( $\lambda = 300$  нм; об'єм проби 2 мкл)

Концентрація розчину зопіклону, мкг/мл	Площа піку	Знайдено зопіклону		Метрологічні характеристики
		мкг/мл	%	
20,0	0,0008453	19,56	97,80	$\bar{X}=99,98$ $S=1,292$ $S_x=0,646$ $\Delta\bar{X}=2,05$ $\epsilon=\pm 2,08\%$ $\bar{X}\pm\Delta\bar{X}=99,98\pm 2,05$
50,0	0,002141	49,08	98,16	
100,0	0,004227	99,33	99,33	
200,0	0,008461	201,31	100,66	

суміші 0,01 М розчину кислоти хлористоводневої та води (1:1) різних концентрацій. Об'єм проби складав 2 мкл. Попередньо проводили хроматографування розчинника — суміші 0,01 М розчину кислоти хлористоводневої та води (1:1).

Роботу з хроматографом “Міліхром А-02” (ЗАТ “ЕкоНова”, Новосибірськ) виконували на базі НВФ “Аналітика” (м. Харків). Обробку хроматограм проводили за допомогою програми “Аналітика — Chrom”, розробленої цією ж установою.

В роботі використовували колонку  $\varnothing 2 \times 75$  мм, упаковану оберненою фазою ProntoSIL — 120 — 5 — C18 AQ (“Bischoff Analysentechnik und Gerate GmbH”, Німеччина), що має ефективність не менше 5000 теоретичних тарілок.

Градентне елюювання виконували змішуванням двох елюентів: елюент А — [4М LiClO<sub>4</sub> — 0,1М HClO<sub>4</sub>] — H<sub>2</sub>O (5:95); елюент Б — ацетонітрил “для ВЕРХ”.

ВЕРХ-аналіз виконували в таких умовах: швидкість потоку — 100 мкл / хв.; елюювання — лінійний градієнт від 5% до 100% ацетонітрилу за 40 хв, потім 100% ацетонітрил протягом 3 хв; температура колонки — 40°C.

Правильність методики аналізу періодично контролювали шляхом хроматографування спеціального контрольного багатокомпонентного розчину [5].

**Методика побудови градувальних графіків для зопіклону та 2-аміно-5-хлорпіридину.** 0,1000 г Речовини вносили в мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняли в 10,00 мл 0,1 М розчину кислоти хлористоводневої та доводили об'єм розчину водою очищеною до позначки (стандартний розчин 1, концентрація — 1000 мкг/мл). У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили 50,00 мл стандартного розчину 1 і доводили об'єм розчину водою очищеною до позначки (стандартний розчин 2, концентрація 500 мкг/мл). У дві мірні колби місткістю 50,0 мл вносили 20,00 та 10,00 мл стандартного розчину 2 відповідно і доводили об'єми розчинів до позначки розчинником (розчини 3 та 4 відповідно, концентрація — 200 та 100 мкг/мл). У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили 10,00 мл розчину 2 і доводили об'єм розчину до позначки розчинником (розчин 5, концентрація — 50 мкг/мл). У

мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили 10,00 та 20,00 мл розчину 4 відповідно і доводили об'єми розчинів до позначки розчинником (розчини 6 та 7 відповідно, концентрація 10 та 20 мкг/мл). У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили 10,00 мл розчину 6 та доводили об'єм розчину до позначки розчинником (розчин 8; концентрація 1 мкг/мл).

Розчини зопіклону та 2-аміно-5-хлорпіридину 3, 4, 5, 6 та 8 хроматографували за вищезазначених умов; об'єм проби становив 2 мкл. Хроматографування кожного розчину проводили тричі.

**Методика лужного гідролізу зопіклону.** В мірну колбу місткістю 50,0 мл вносили 10,00 мл розчину зопіклону 3, додавали 2 мл 10% розчину гідроксиду натрію при кімнатній температурі та через 2 хв. доводили об'єм розчину до позначки розчинником (лужний гідролізат).

**Методика кислотного гідролізу зопіклону.** До 10 мл розчину зопіклону 3 додавали 50 мл 6 М розчину кислоти хлористоводневої та кип'ятили на водяній бані протягом 1 год. зі зворотним холодильником. Після охолодження суміші її екстрагували хлороформом тричі порціями по 20 мл. Хлороформні витяжки об'єднували та упарювали досуха. Сухий залишок розчиняли в 10 мл розчинника (кислотний гідролізат).

**Методика визначення зопіклону за 2-аміно-5-хлорпіридином.** В ряд мірних колб місткістю 50,0 мл вносили по 10,00 мл розчинів зопіклону 3, 4, 5 та 7, додавали по 2 мл 10% розчину гідроксиду натрію та через 2 хв доводили об'єми розчинів до позначки розчинником. Хроматографування отриманих сумішей проводили у вищезазначених умовах; об'єм проби становив 2 мкл.

#### Висновки

1. Проведено аналіз зопіклону та продукту його лужного гідролізу — 2-аміно-5-хлорпіридину методом ВЕРХ.

2. Проведено лужний та кислотний гідроліз зопіклону, виконано дослідження продуктів гідролізу методом ВЕРХ. За характером УФ-спектра продукту кислотного гідролізу зроблено припущення щодо його хімічної структури (6-(5-хлорпіридин-2-іл)-5-гідрокси-7-оксо-6,7-дигідро-5Н-піроло[3,4- b]піразин).

3. Розроблені методики кількісного визначення зопіклону та 2-аміно-5-хлорпіридину методом ВЕРХ.

4. Встановлено, що лужний гідроліз зопіклону відбувається кількісно, що дозволяє використовувати градувальний графік для кількісного визначення 2-аміно-5-хлорпіридину для кількісного визначення зопіклону за продуктом його лужного гідролізу.

#### Література

1. *European Pharmacopea. 4 ed. — Council of Europe. — Strasbourg, 2002. — 2416 p.*
2. *Varam G.I. // J. Chromatogr. A. — 1996. — Vol. 728. — P. 387.*
3. *Bogusz M. // J. Analyt. Toxicol. — 1991. — Vol. 15. — P. 174-178.*
4. *Kohn A. // Toxichem + Krimtech. — 1993. — Vol. 60, №2. — P. 39-50.*
5. *Барам Г.И., Рейхарт Д.В., Гольдберг Е.Д. и др. // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. — 2003. — Т. 135, №1. — С. 75-79.*
6. *Gaillot J., Le Roux Y., Houghton G.W. // Sleep. — 1987. — Vol. 10. — P. 7-21.*
7. *Еремин С.К., Изотов Б.Н., Веселовская Н.В. Анализ наркотических средств: Руков. по хим.-токсикол. анализу наркотических и других одурманивающих средств. — М.: Мысль, 1993. — 272 с.*
8. *Болотов В.В., Клименко Л.Ю. // ЖОФХ. — 2005. — №1. — С. 65-69.*
9. *Доерфель К. Статистика в аналитической химии / Пер. с нем. под ред. В.В.Налимова. — М.: Мир, 1969. — 223 с.*

Надійшла до редакції 31.10.2005 р.