

АНАЛІЗ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН

Рекомендована д.ф.н., професором П.О.Безуглим

УДК 543.42.062:535.24:615.214.24:547.821

ВИВЧЕННЯ МЕТОДІВ ІЗОЛЮВАННЯ ЗОПІКЛОНУ З ОБ'ЄКТІВ БІОЛОГІЧНОГО ПОХОДЖЕННЯ

В.В.Болотов, Л.Ю.Клименко

Національний фармацевтичний університет

Вивчені умови ізолювання зопіклону із біологічного матеріалу за допомогою модифікованих методів О.О.Васильєвої, Стаса-Отто та В.П.Крамаренка, а також методики, запропонованої О.В.Удаловим, що є модифікацією методу Стаса-Отто. Запропоновано експресну методику ізолювання зопіклону за допомогою хлороформу з попередньою очисткою біологічного матеріалу гексаном, що дозволяє виділити від 60% до 80% препарату. Вивчені умови ідентифікації зопіклону в отриманих витяжках методом ТІХХ.

За даними наукової літератури снодійні засоби посідають певне місце серед ліків, які призводять до отруєнь як випадкових, так і навмисних [9, 11, 15]. Серед них останнім часом широко трапляється і зопіклон — снодійний препарат групи циклопіролонів [12, 14]. Препарат зареєстровано в Україні, таблетки зопіклону виробляються вітчизняними виробниками. Клінічна картина отруєнь зопіклоном та морфологічні зміни в організмі при цьому не є характерними та мають багато спільного з препаратами групи бензодіазепінів [13, 16], тому в діагностиці цих отруєнь велику увагу приділяють результатам хіміко-токсикологічних досліджень.

На першому етапі цих досліджень необхідно виділити препарат із біологічного матеріалу.

Ми поставили за мету вивчити можливості ізолювання зопіклону з біологічного матеріалу за допомогою загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів: О.О.Васильєвої (ізолювання водою, підкисленою кислотою оксалатною), Стаса-Отто (ізолювання спиртом етиловим, підкисленим кислотою оксалатною), В.П.Крамаренка (ізолювання водою, підкисленою кислотою сульфатною) [6, 7], проаналізувати їх переваги та вади і розробити більш ефективний та експресний метод ізолювання препарату з біологічного матеріалу, а також запропонувати зручні та специфічні

методи ідентифікації та кількісного визначення зопіклону у витяжках з біологічного матеріалу.

Для розробки оптимальних методик виділення препарату із біологічного матеріалу велике значення має ступінь екстракції зопіклону (R, %) із водних розчинів різними органічними розчинниками в залежності від рН середовища.

Попередньо нами встановлено [5], що хлороформ екстрагує зопіклон із водних розчинів в слабко кислому і лужному середовищі — при цьому при одноразовій екстракції в органічний шар переходить близько 95% препарату (див. рис.). Ступінь одноразової екстракції зопіклону з водних розчинів діетиловим етером досягає максимуму (70%) при рН = 9. Гексан практично не екстрагує зопіклон із водних розчинів ні в кислому, ні в лужному середовищі.

Експериментальна частина

При дослідженні виділення зопіклону з біологічного матеріалу використовували модельні суміші препарату з печінкою, що не зазнала гнилісних змін, взятої від трупа людини, яка загинула від травм. Для цього до 10 г подрібненої печінки додавали 1,0 мл розчину зопіклону в 0,1 М розчині кислоти хлористоводневої (1000 мкг препарату), ретельно перемішували і залишали на добу. Готували також контрольні суміші, дослідження яких проводили паралельно з основними.

Ізолювання зопіклону з біологічного матеріалу проводили за допомогою модифікованих методів О.О.Васильєвої, Стаса-Отто, В.П.Крамаренка [6, 7]. Модифікація методів полягала у зменшенні наважок біологічного матеріалу до 10 г, а також у відповідному зменшенні об'ємів органічних розчинників та заміні стадій проціджування на центрифугування.

“Лужні” хлороформні витяжки збирали до мірної колби місткістю 25,0 мл та доводили хлороформом до позначки. Таким чином, отримували витяжку 1 (за О.О.Васильєвою), витяжку 2 (за В.П.Крамаренком) та витяжку 3 (за Стасом-Отто).

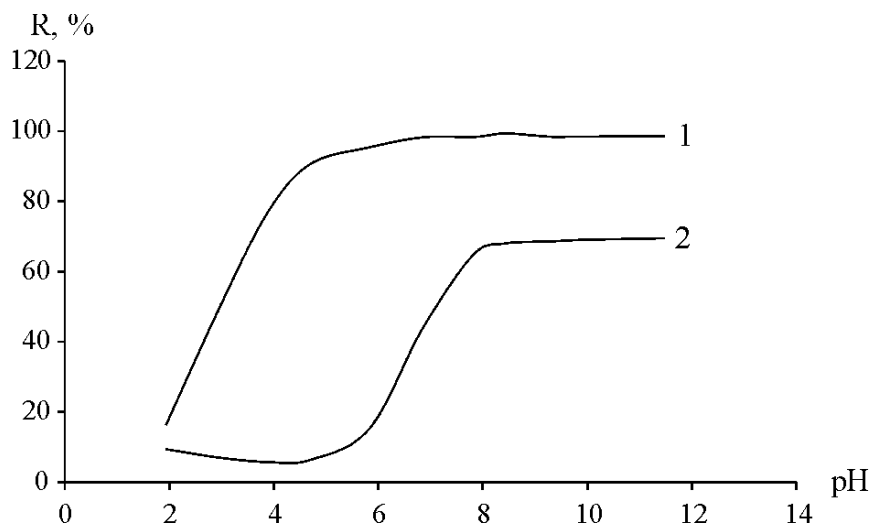


Рис. Залежність ступеня екстракції зопіклону органічними розчинниками (1 — хлороформ, 2 — діетиловий етер) від pH середовища.

Крім того, виділення зопіклону з біологічного матеріалу проводили за допомогою методики, запропонованої О.В.Удаловим [8], що є модифікацією методу Стаса-Отто та відрізняється від нього тим, що екстракцію етанолом проводять у нейтральному середовищі, а осадження білків проводять за допомогою ацетону після підкислення спиртової витяжки кислотою хлористоводневою.

Методика ізолювання зопіклону за Стасом-Отто в модифікації О.В.Удалова. До 10 г модельної суміші біологічного матеріалу з зопіклоном додавали 20 мл 96% етанолу та залишали на добу в теплому місці (25-30°C) при періодичному перемішуванні. Через добу суміш центрифугували та зливали спиртову витяжку. Настоювання біологічного матеріалу з новою порцією етилового спирту проводили ще 1 раз протягом 18 годин. Отримані витяжки об'єднували, а біологічний матеріал промивали етанолом. Промивну рідину приєднували до раніше отриманих етанольних витяжок. Об'єднані етанольні витяжки підкислювали 6 М розчином кислоти хлористоводневої до pH 2, перенесли в порцелянову чашку і випаровували на водяній бані (при температурі не вище 40°C) до густоти сиропу. Сиропоподібну рідину тричі обробляли ацетоном порціями по 7,5 мл, суміш центрифугували. Центрифугат знову випаровували до об'єму 0,5 мл, залишок двічі по чергово обробляли 2,5 мл діетилового етеру та 2 мл 0,1 М розчину кислоти хлористоводневої. Збирали органічний шар та в подальшому не досліджували. Кислу водну витяжку підлужували 25% розчином аміаку до pH 11, потім 3 рази екстрагували хлороформом порціями по 10 мл. Хлороформні витяжки об'єднували, фільтрували через паперовий фільтр (при утворенні стійких емульсій застосовували центрифугування). Отримували 25,0 мл хлороформної витяжки (витяжка 4).

Нами також запропонована методика ізолювання зопіклону з біологічного матеріалу за допо-

могою хлороформу та модифікація цієї методики, що полягає в попередній екстракції біологічного матеріалу гексаном з метою видалення із біологічного матеріалу ліпофільних сполук.

Методика ізолювання зопіклону за допомогою хлороформу. До 10 г печінки тупа, зараженої зопіклоном як зазначено вище, додавали 30 г безводного натрію сульфату, змішували та сушили у ступці до утворення сипкої маси. У скляну колонку діаметром 17-20 мм, у вузьку нижню частину якої поміщали марлевий тампон, заливали хлороформ (частина від попередньо відміряного хлороформу об'ємом 100 мл) та засипали отриману сипку масу, періодично додаючи хлороформ таким чином, щоб над біологічним матеріалом постійно утримувалося "дзеркало" товщиною 1-2 см, після повного перенесення сипкої маси колонку залишали на годину. Далі над колонкою поміщали ділильну лійку з залишком хлороформу, який пропускали через колонку зі швидкістю 60-80 крапель за хвилину, утримуючи "дзеркало" над біологічним матеріалом. Хлороформну витяжку збирали до мірної колби місткістю 100,0 мл та доводили хлороформом до позначки (витяжка 5).

З метою екстракційної очистки 50 мл отриманої витяжки тричі реекстрагували 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої порціями по 10 мл. Хлороформні шари відокремлювали та надалі не досліджували. Водні шари об'єднували, підлужували 25% розчином аміаку до pH 11 та тричі екстрагували хлороформом порціями по 10 мл. Хлороформні шари збирали до мірної колби місткістю 50,0 мл через паперовий фільтр з 1 г безводного натрію сульфату та доводили хлороформом до позначки (витяжка 6).

Модифікована методика ізолювання зопіклону за допомогою хлороформу. Сипку масу біологічного матеріалу з безводним натрію сульфатом, отриману як зазначено вище, засипали в колонку та обробляли замість хлороформу гексаном (загаль-

Таблиця 1

Результати ізолювання зопіклону із біологічного матеріалу (модельні суміші з печінкою) та їх метрологічні характеристики ($n = 3$, $\alpha = 0,95$)

Метод ізолювання	Виділено зопіклону, % (метод кількісного визначення)
За О.О.Васильєвою	57,24±5,66 (УФ-спектрофотометричний) 54,88±3,44 (екстракційно-фотометричний) 54,17±4,19 (метод ВЕРХ після ТШХ-очистки)
За В.П.Крамаренком	64,27±4,12 (УФ-спектрофотометричний) 60,50±0,92 (екстракційно-фотометричний) 60,83±1,79 (метод ВЕРХ після ТШХ-очистки)
Метод ізолювання хлороформом	81,17±2,40 (УФ-спектрофотометричний)
Метод ізолювання хлороформом (після екстракційної очистки)	64,58±3,12 (УФ-спектрофотометричний)
Модифікований метод ізолювання хлороформом	80,02±2,15 (УФ-спектрофотометричний) 66,41±3,07 (УФ-спектрофотометричний після ТШХ-очистки) 59,37±3,41 (екстракційно-фотометричний після ТШХ-очистки) 59,61±1,84 (метод ВЕРХ після ТШХ-очистки)

ний об'єм 100 мл), як зазначено вище. Далі біологічний матеріал висипали з колонки, висушували та проводили ізолювання хлороформом, як зазначено вище (витяжка 7).

По 5, 10 та 100 мкл витяжок 1-4 та по 10, 20, 50 та 100 мкл витяжок 5-7 використовували для ідентифікації зопіклону методом ТШХ.

Кількісне визначення зопіклону проводили за УФ-спектрофотометричною та екстракційно-фотометричною методиками в 5 мл витяжок 1-4 та в 10 мл витяжок 5-7 до та після їх ТШХ-очистки. Кількісне визначення зопіклону методом ВЕРХ проводили в 5 мл витяжок 1-4 та в 10 мл витяжок 5-7 після їх очистки за методом ТШХ.

Методика ТШХ-очистки витяжок із біологічного матеріалу. Зазначену кількість хлороформних витяжок випаровували на водяній бані до об'єму 0,5 мл та кількісно наносили на лінію старту хроматографічної пластини "Sorbfil" смугою шириною 2 см. Пластину елюювали в системі розчинників хлороформ-метанол (90:10) у присутності "свідка" — зопіклону. Для витяжок 5 — 7 пластину попередньо елюювали у хлороформі з метою очистки від співекстрактивних речовин.

За допомогою скальпеля напроти плями "свідка" з пластини знімали сорбент з площі 3 см x 1 см у скляний флакон. У флакон додавали 10 мл 0,1 М розчину кислоти хлористоводневої (при наступному проведенні кількісного визначення за УФ-спектрофотометричною методикою) або 10 мл 0,01 М розчину кислоти хлористоводневої (при наступному проведенні кількісного визначення за екстракційно-фотометричною або ВЕРХ-методикою) та струшували протягом 5 хв, після чого фільтрували до мірної колби місткістю 10,0 мл і доводили відповідним розчинником до позначки. Для кількісного визначення за екстракційно-фотометричною методикою використовували 5 мл елюату, для кількісного визначення за ВЕРХ-ме-

тодікою використовували 1 мл елюату, який перед хроматографуванням змішували з 1 мл води очищеної.

Ідентифікацію зопіклону методом ТШХ проводили на хроматографічних пластинках "Sorbfil" у системі розчинників хлороформ-метанол (90:10) у присутності "свідка" — зопіклону за методикою, розробленою нами раніше [3]. Для витяжок 5-7 пластини попередньо елюювали в хлороформі з метою очистки від співекстрактивних речовин (за цих умов зопіклон залишається на лінії старту, а співекстрактивні речовини мігрують до лінії фінішу).

Для проявлення плям на пластинках використовували УФ-світло, реактив Драгендорфа та деякі реактиви для виявлення зопіклону, запропоновані нами раніше [2] (див. табл. 2).

Кількісне визначення зопіклону за УФ-спектрофотометричною методикою. Зазначену кількість витяжок випаровували на водяній бані при температурі 80°C до сухого залишку. Сухий залишок після охолодження розчиняли в 10 мл 0,1 М розчину кислоти хлористоводневої. Оптичну густину отриманого розчину або зазначеного елюату (при проведенні ТШХ-очистки) визначали на спектрофотометрі SPECORD M-40 UV-VIS при $\lambda = 304$ нм та довжині кювети 10 мм. Концентрацію зопіклону в розчині розраховували за допомогою градувального графіка або за відповідним рівнянням лінійної залежності оптичної густини розчину від його концентрації [1].

Кількісне визначення зопіклону за екстракційно-фотометричною методикою. Зазначену кількість витяжок випаровували на водяній бані при температурі 80°C до сухого залишку. Сухий залишок після охолодження розчиняли в 5 мл 0,01 М розчину кислоти хлористоводневої. Отриманий розчин або зазначену кількість елюату (при проведенні ТШХ-очистки) вносили у ділильну лійку, додавали 5,00 мл

Таблиця 2

Результати виявлення зопіккону у витяжках із біологічного матеріалу

Проявник*	Забарвлення плями зопіккону	витяжка 1	витяжка 2	витяжка 5	витяжка 6	витяжка 7
1	Салатна флуоресценція	+***	+	+	+	+
2	Червоно-коричневе	+	+	+	+	+
3	Жовто-гаряче →** сіре	+	+	+	+	+
4	Червоно-коричневе	+	+	+	+	+
5	Чорне	+	+	+	+	+
6	Яскраво-жовте	+	+	+	+	+
7	Зелене →фіолетове	+	+	+	+	+
8	Яскраво-жовте	+	+	+	+	+

Проявники:

1 — УФ-світло;

2 — реактив Драгендорфа [10];

3 — реактив Неслера [10];

4 — суміш 10% розчину NaOH, 10% розчину H₂O₂ та 2% розчину о-фенілендіаміну в етанолі (1:1:1) [2];

5 — пластини 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) [2];

6 — пластини обробляють 0,5% розчином бензидину в суміші етанолу та 20% розчину NaOH (1:1), висушують при кімнатній температурі і обробляють 80% розчином оцтової кислоти [2];

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

8 — пластини обробляють 10% розчином NaOH, висушують при кімнатній температурі, обробляють 20% розчином HCl, висушують при кімнатній температурі та обробляють 5% розчином п-диметиламінобензальдегіду [10] у хлороформі;

** позначка "→" означає перехід забарвлення;

*** позначка "+" означає позитивний результат реакції.

ацетатного буферного розчину з рН 4,6, 5,00 мл 0,02% розчину метилового оранжевого та до отриманої суміші додавали 10,00 мл хлороформу. Суміш у ділильній лійці струшували протягом 5 хв за допомогою механічного струшувача і залишали на 10 хв для розділення шарів. Збирали 8,00 мл хлороформного шару, відкидаючи його перші та останні порції (близько 1,00 мл), і додавали до нього 2,00 мл 1% розчину кислоти сульфатної в абсолютному етанолі. Одержану суміш ретельно перемішували та визначали її оптичну густину на фотоелектроколориметрі КФК-2 (довжина кювети — 20 мм, світлофільтр з $\lambda_{\text{ef}} = 540 \pm 10$ нм). Як розчин порівняння використовували хлороформ. Концентрацію зопіккону в розчині розраховували за допомогою градувального графіка або за відповідним рівнянням лінійної залежності оптичної густини розчину від його концентрації [1].

Методику кількісного визначення зопіккону методом ВЕРХ наведено в літературі [4].

Результати та їх обговорення

Результати кількісного визначення зопіккону у витяжках з біологічного матеріалу наведено в табл. 1.

Слід зазначити, що за методом Стаса-Отто та за методикою, запропонованою О.В.Удаловим, зопіккон із біологічного матеріалу виділити не вдалося.

Методи О.О.Васильєвої та В.П.Крамаренка дозволяють виділити достатньо велику кількість зопіккону із біологічного матеріалу. Крім того, за цими методами ми отримуємо витяжки, що є практично звільненими від співекстрактивних речовин, які б могли заважати виявленню зопіккону методом ТШХ. Кількісне визначення зопіккону в цих витяжках можна проводити за УФ-спектрофотометричною та екстракційно-фотометричною методиками без додаткової ТШХ-очистки, оскільки поглинання в контрольних дослідах для цих випадків практично відсутнє (не перевищує 5% від поглинання у відповідних основних дослідах).

Найбільш експресним та зручним у виконанні методом ізолювання зопіккону з біологічного матеріалу є, на наш погляд, модифікований метод ізолювання хлороформом. Метод дозволяє швидко виділити від 60 до 80% препарату. При цьому отримана витяжка звільнена від більшої кількості ліпофільних сполук, завдяки чому вона є більш зручною в роботі — при нанесенні на хроматографічну пластину не залишається жирних плям.

Пряме УФ-спектрофотометричне кількісне визначення зопіккону у витяжках 5 та 7 є небажаним, оскільки для цих випадків поглинання в контрольних дослідах досягає 20% від поглинання у відповідних основних дослідах. Після екстракційної та ТШХ-очистки поглинання в контрольних дослідах практично відсутнє.

Проведення кількісного визначення за методом ВЕРХ після ТШХ-очистки взагалі дозволяє

виключити вплив співекстрактивних речовин на результати аналізу.

Результати ідентифікації зопіклону у витяжках з біологічного матеріалу методом ТШХ наведені в табл. 2.

У витяжках із біологічного матеріалу, отриманих за методом Стаса-Отто, та за методикою, запропонованою О. В. Удаловим, зопіклон не виявляється.

Слід зазначити, що співекстрактивні речовини з проявниками 4-8 (табл. 2) не дають забарвлення. Проявник 3 (табл. 2) співекстрактивні речовини також забарвлює в сірий колір, але це відбувається без попереднього забарвлення плям у жовтогарячий колір на відміну від плям препарату.

За допомогою запропонованих реактивів можна виявити до 0,2 мкг зопіклону в пробі. Плями співекстрактивних речовин при цьому знаходяться або на лінії фінішу, або на лінії старту та не заважають виявленню зопіклону.

ВИСНОВКИ

1. Вивчено умови ізолювання зопіклону з біологічного матеріалу в модельних сумішах з пеміною за допомогою модифікованих методів О.О.Васильєвої, Стаса-Отто та В.П.Крамаренка, а також методики, запропонованої О.В.Удаловим. З використаних методів найбільш ефективними є методи О.О.Васильєвої та В.П.Крамаренка, які дозволяють ізолювати до 60% та 65% зопіклону відповідно. За методом Стаса-Отто як у класичному варіанті, так і в модифікації О.В.Удалова зопіклон не ізолюється з біологічного матеріалу.

2. Запропоновано експресну методику ізолювання зопіклону за допомогою хлороформу з попередньою очисткою біологічного матеріалу гексаном, що дозволяє виділити від 60% до 80% препарату.

3. Вивчено умови ідентифікації зопіклону в отриманих витяжках методом ТШХ.

ЛІТЕРАТУРА

1. Болотов В.В., Клименко Л.Ю. // *Вісник фармації*. — 2004. — №4 (40). — С. 15-19.
2. Болотов В.В., Клименко Л.Ю. // *ЖОФХ*. — 2005. — Т. 3, вип. 1 (9). — С. 65-69.
3. Болотов В.В., Клименко Л.Ю., Іванчук І.М. // *Вісник фармації*. — 2005. — №2 (42). — С. 7-11.
4. Болотов В.В., Клименко Л.Ю. // *ЖОФХ*. — 2005. — Т. 3, вип. 4 (12). — С. 77-81.
5. Болотов В.В., Клименко Л.Ю. // *Матеріали VI Національного з'їзду фармацевтів України "Досягнення та перспективи розвитку фармацевтичної галузі України". 28-30 вересня 2005 р.* — Х., 2005. — С. 142-144.
6. Крамаренко В.Ф. *Токсикологическая химия*. — К.: Вища школа, 1989. — 456 с.
7. *Токсикологическая химия: Учеб. для вузов / Под ред. Т.В.Плетеневой*. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. — 512 с.
8. Удалов А.В. // *Лабор. журн.* — 2003. — №1 (3). — С. 54-58.
9. Bramness J.G., Arnestad M., Karinen R., Hilberg T. // *J. Forensic Sci.* — 2001. — №46 (5). — P. 1247-1249.
10. Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals body fluids and postmortem material. — London: The Pharm. Press, 1986. — 1200 p.
11. Galloway J.H., Marsh I.D., Newton C.M., Forrest A.R. // *Sci. Justice*. — 1999. — №39 (4). — P. 253-256.
12. Grobler L.A., Schweltnus M.P., Trichard C., Calder S. // *Clin. J. Sport Med.* — 2000. — Apr., №10 (2). — P. 123-128.
13. Koski A., Ojanpera I., Akbari A. // *Hum. Exp. Toxicol.* — 2003. — №41 (5). — P. 17-20.
14. Mannaert E., Tytgat J., Daenens P. // *J. Anal. Toxicol.* — 1997. — №43 (5). — P. 471-474.
15. Meatherall R.C. // *J. Forensic Sci.* — 1997. — №42 (2). — P. 340-343.
16. Reith D.M., Fountain J., McDowell R., Tilyard M. // *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* — 2003. — №41 (7). — P. 975-980.

УДК 543.42.062:535.24:615.214.24:547.821

ИЗУЧЕНИЕ МЕТОДОВ ИЗОЛИРОВАНИЯ ЗОПИКЛОНА ИЗ ОБЪЕКТОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

В.В.Болотов, Л.Ю.Клименко

Изучены условия изолирования зопиклона из биологического материала с помощью модифицированных методов А.А.Васильевой, Стаса-Отто и В.Ф.Крамаренко, а также методики, предложенной А.В.Удаловым, которая является модификацией метода Стаса-Отто. Предложена экспресная методика изолирования зопиклона хлороформом с предварительной очисткой биологического материала гексаном, которая позволяет выделить от 60% до 80% препарата. Изучены условия идентификации зопиклона в полученных извлечениях методом ТСХ.

UDC 543.42.062:535.24:615.214.24:547.821

THE STUDY OF THE ZOPICLONE ISOLATION METHODS FROM THE OBJECTS OF BIOLOGICAL ORIGIN

V.V.Bolotov, L.Yu.Klimenko

The conditions of zopiclone isolation from the biological material by the modified methods of A.A.Vasileva, Stas-Otto and V.F.Kramarenko as well as the method suggested by A.V.Udalov, which is a modification of Stas-Otto method, have been studied. The express method of zopiclone isolation by chloroform with the preliminary purification of the biological material by hexane, which allows isolating from 60% to 80% of the drug, has been suggested. The conditions of identification of zopiclone in the extracts by the TLC method have been studied.