

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

УДК 543.42.062:535.24:615.214.24:547.821

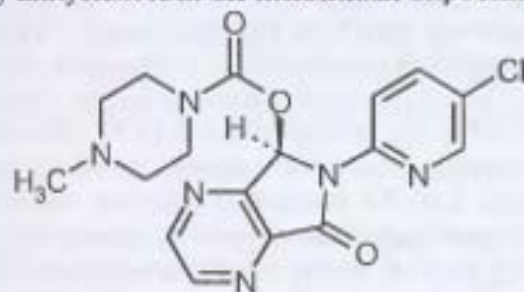
## СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ТА ЕКСТРАКЦІЙНО-ФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ЗОПІКЛОНУ ТА ПРОДУКТУ ЙОГО ЛУЖНОГО ГІДРОЛІЗУ — 2-АМІНО-5-ХЛОРПІРИДИНУ

В.В.Бологов, Л.Ю.Клименко

Національний фармацевтичний університет

Запропоновано методику спектрофотометричного визначення зопіклону та продукту його лужного гідролізу — 2-аміно-5-хлорпіридину, що дає можливість визначити зопіклон у межах концентрацій від 2 мкг до 20 мкг у 1 мл розчину та 2-аміно-5-хлорпіридину — від 1 мкг до 20 мкг у 1 мл розчину. Відносна невизначеність методу складає  $\pm 2,00\%$  для зопіклону та  $\pm 3,08\%$  для 2-аміно-5-хлорпіридину. Розроблено методику екстракційно-фотометричного визначення зопіклону з використанням кислотно-основного індикатора метилового оранжевого. Методика дозволяє визначити препарат при його вмісті у пробі від 10 мкг до 140 мкг. Відносна невизначеність методу складає  $\pm 2,17\%$ .

Зопіклон — (5RS)-6-(5-хлорпіридин-2-іл)-7-оксо-6,7-дигідро-5H-піроло-[3,4-b]піразин-5-іл-4-метилпіперазин-1-карбоксилат — є снодійним препаратом групи циклопіролонів, який широко застосовується для лікування безсоння [9, 15, 16]. Препарат зареєстровано в Україні, таблетки зопіклону випускаються вітчизняними виробниками.



За даними, наведеними в науковій літературі за останні 10 років, зопіклон викликає інтерес у хіміко-токсикологічному відношенні [6, 10, 12, 13]. Клінічна картина отруєнь зопіклоном та морфологічні зміни в організмі при цьому не завжди характерні і мають багато спільного з препаратами групи бензодіазепінів [8, 14]. Діагностика отруєнь цим препаратом ускладнюється ще й тим, що разом з ним застосовуються інші препарати (бен-

зодіазепіни, фенотіазини, золпідем, варфарин, ле-понекс, фенобарбітал та ін.) [8, 10, 16, 17]. Саме тому в діагностиці цих отруєнь велике значення мають результати хіміко-токсикологічних досліджень.

Зопіклон та його основні метаболіти (N-оксид зопіклону, N-дезметилзопіклон та продукт кислотного гідролізу зопіклону) у лужному середовищі гідролізуються з утворенням 2-аміно-5-хлорпіридину, внаслідок чого останній може бути використаний як маркер наявності зопіклону в організмі [7, 11].

Серед сучасних методів, які застосовуються у хіміко-токсикологічному аналізі, велику увагу приділяють методам спектрофотометрії та екстракційної фотометрії [1, 2, 3]. У зв'язку з цим ми розробили методику спектрофотометричного визначення зопіклону та 2-аміно-5-хлорпіридину, а також методику екстракційно-фотометричного визначення зопіклону з використанням кислотно-основного індикатора метилового оранжевого.

### Експериментальна частина

Попередньо нами були зняті УФ-спектри абсорбції зопіклону та 2-аміно-5-хлорпіридину у 0,1 М розчині кислоти хлористоводневої. Визначення проводили на спектрофотометрі SPECORD M-40 UV-VIS у діапазоні довжин хвиль 220-350 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм; як розчин порівняння використовували 0,1 М розчин кислоти хлористоводневої. Максимум абсорбції зопіклону спостерігали при 304 нм, а 2-аміно-5-хлорпіридину — при 234 та 316 нм (див рис.).

Для спектрофотометричного визначення зопіклону використовували абсорбцію при довжині хвилі 304 нм, а для спектрофотометричного визначення 2-аміно-5-хлорпіридину — абсорбцію при довжині хвилі 316 нм.

Методика побудови градуовального графіка для спектрофотометричного визначення зопіклону та 2-аміно-5-хлорпіридину.

Розчини зопіклону та 2-аміно-5-хлорпіридину 1, 2, 3 та 4 готували наступним чином: 50,0 мг

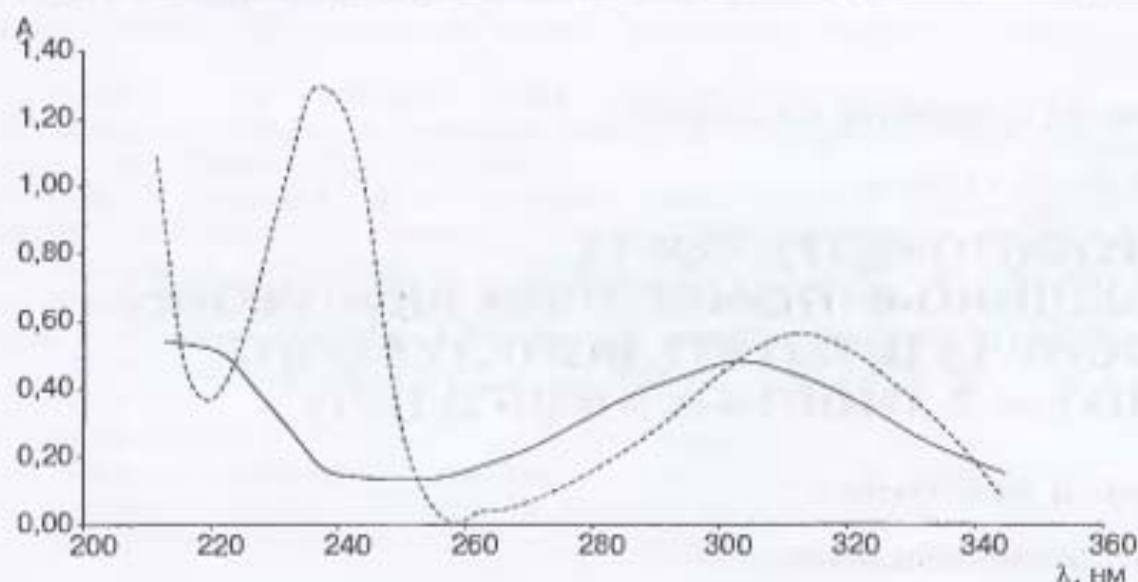


Рис. УФ-спектри зопіклону (—) та 2-аміно-5-хлорпіридину (---) в 0,1 М розчині кислоти хлористоводневої [концентрація 10 мкг/мл].

відповідної речовини вносили в мірну колбу місткістю 250,0 мл, розчиняли у 0,1 М розчині кислоти хлористоводневої і доводили об'єм розчину до мітки 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої (стандартний розчин 1, концентрація — 200 мкг/мл). У дві мірні колби місткістю 100,0 мл вносили із бюретки 5,00 та 10,00 мл стандартного розчину 1 відповідно і доводили об'єми розчинів до мітки 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої (розчини 2 та 3 відповідно, концентрація — 10 та 20 мкг/мл). У мірну колбу місткістю 200,0 мл вносили із бюретки 15,00 мл стандартного розчину 1 і доводили об'єм розчину до мітки 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої (розчин 4, концентрація 15 мкг/мл). У дві мірні колби місткістю 50,0 мл вносили із бюретки 10,00 та 30,00 мл розчину зопіклону 2 відповідно і доводили об'єми розчинів до мітки 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої (розчини зопіклону 5 та 6 відповідно, концентрація — 2 та 6 мкг/мл). У ряд мірних колб місткістю 50,0 мл вносили із бюретки 5,00, 10,00, 25,00 мл розчину 2-аміно-5-хлорпіридину 2 відповідно і доводили об'єми розчинів до мітки 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої (розчини 2-аміно-5-хлорпіридину 5, 6, 7 відповідно, концентрація — 1, 2 та 5 мкг/мл). Після ретельного перемішування визначали оптичну густину розчинів зопіклону 2, 3, 4, 5, 6 та розчинів 2-аміно-5-хлорпіридину 2, 3, 4, 5, 6 та 7.

Для розробки методики екстракційно-фотометричного визначення зопіклону використовували розчини субстанції у 0,01 М розчині кислоти хлористоводневої. Визначення проводили на фотоспектроколориметрі КФК-2 (світлофільтр з  $\lambda_{\text{еф}} = 540 \pm 10$  нм). Як розчин порівняння використовували хлороформ.

Нами встановлено, що 0,02% розчин метилового оранжевого утворює з зопіклоном у середовищі ацетатного буферного розчину з рН 4,6 іонні асоціати, які екстрагуються хлороформом. Забар-

влення розчинів іонних асоціатів виявилось малоінтенсивним, тому для підсилення чутливості методу утворені іонні асоціати руйнували додаванням до їх хлороформних розчинів 1% розчину сірчаної кислоти в абсолютному етанолі. При цьому одержували розчини, що мали значно вищу оптичну густину.

У процесі розробки найефективніших умов визначення були підібрані оптимальні об'єми розчину метилового оранжевого та хлороформу. Встановлено, що оптимальне значення кількості 0,02% розчину метилового оранжевого складас 5 мл, а іонні асоціати практично повністю екстрагуються у процесі одноразової екстракції 10 мл хлороформу. Також було підібране оптимальне значення рН буферного розчину та довжина кювети — 20 мм. Для підбору оптимального значення рН буферного розчину нами був виготовлений ряд ацетатних буферних розчинів з рН від 3,0 до 6,0 [5]. Величини рН буферних розчинів контролювали потенціометрично. Найбільш придатне значення рН становить 4,6.

Методика побудови градуювального графіка для екстракційно-фотометричного визначення зопіклону.

50,0 мкг зопіклону вносили в мірну колбу місткістю 250,0 мл, розчиняли у 0,01 М розчині кислоти хлористоводневої і доводили об'єм розчину до мітки 0,01 М розчином кислоти хлористоводневої (стандартний розчин 1, концентрація — 200 мкг/мл). У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили із бюретки 20,00 мл стандартного розчину зопіклону 1 і доводили об'єм розчинів до мітки 0,01 М розчином кислоти хлористоводневої (стандартний розчин 2, концентрація — 40 мкг/мл). У ряд мірних колб місткістю 100,0 мл вносили із бюретки 5,00, 10,00 та 20,00 мл стандартного розчину зопіклону 2 відповідно і доводили об'єми розчинів до мітки 0,01 М розчином кислоти хлористоводневої (розчини 3, 4 та 5 відповідно, концентрація 2, 4 та 8 мкг/мл). У ряд мірних колб

Таблиця 1

Метрологічні характеристики градувальної залежності оптичної густини від вмісту зопіклону ( $y = bx + a$ ), отриманої методом спектрофотометрії

r	b	a	S <sup>2</sup>	Δb	Δa
1,0000	0,05000	0,001400	0,000008327	0,0000001303	0,00001994

Таблиця 2

Метрологічні характеристики градувальної залежності оптичної густини від вмісту 2-аміно-5-хлорпіридину ( $y = bx + a$ ), отриманої методом спектрофотометрії

r	b	a	S <sup>2</sup>	Δb	Δa
0,9999	0,05490	0,01410	0,001204	0,00001665	0,001468

Таблиця 3

Результати спектрофотометричного визначення зопіклону у розчині

Внесено зопіклону у пробу, мкг	Оптична густина	Знайдено зопіклону		Метрологічні характеристики
		мкг	%	
2	0,1019	2,07	103,30	$\bar{X}=100,51$ $S=1,619$ $S_x=0,724$ $\Delta X=2,01$ $\epsilon=+2,00\%$ $\bar{X} \pm \Delta X=100,51 \pm 2,01$
6	0,2960	5,95	99,13	
10	0,4975	9,98	99,78	
15	0,7492	15,01	100,08	
20	1,0010	20,05	100,24	

місткістю 100,0 мл вносили із бюретки 6,00, 8,00, 10,00, 12,00 та 14,00 мл стандартного розчину зопіклону і відповідно і доводили об'єми розчинів до мітки 0,01 М розчином кислоти хлористоводневої (розчини 6, 7, 8, 9 та 10 відповідно, концентрація 12, 16, 20, 24 та 28 мкг/мл).

У ділильну лійку вносили 5,00 мл ацетатного буферного розчину з рН 4,6, 5,00 мл 0,02% розчину метилового оранжевого та по 5,00 мл розчинів зопіклону 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 та 10 відповідно. 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 сірчаної в абсолютному етанолі. Одержану суміш ретельно перемішували та визначали оптичну густину.

#### Результати та їх обговорення

Для розрахунку вмісту зопіклону та 2-аміно-5-хлорпіридину в розчинах спектрофотометричним методом користувались градувальними графіками або рівняннями прямих 1 або 2 відповідно виду  $y = bx + a$ , що мають вигляд [4]:

$$A = 0,05 \cdot C - 0,0014, \quad (1)$$

$$A = 0,0549 \cdot C + 0,0141, \quad (2)$$

де: A — оптична густина;

C — концентрація розчину зопіклону та 2-аміно-5-хлорпіридину відповідно, мкг/мл.

Метрологічні характеристики отриманих градувальних залежностей наведені в табл. 1 та 2.

Таблиця 4

Результати спектрофотометричного визначення 2-аміно-5-хлорпіридину у розчині

Внесено 2-аміно-5-хлорпіридину у пробу, мкг	Оптична густина	Знайдено 2-аміно-5-хлорпіридину		Метрологічні характеристики
		мкг	%	
1	0,0695	1,01	101,00	$\bar{X}=100,63$ $S=2,95$ $S_x=1,20$ $\Delta X=3,10$ $\epsilon=+3,08\%$ $\bar{X} \pm \Delta X=100,63 \pm 3,10$
2	0,1303	2,12	106,00	
5	0,2804	4,85	97,00	
10	0,5632	10,00	100,00	
15	0,8356	14,96	99,73	
20	1,1140	20,03	100,15	

Таблиця 5

Метрологічні характеристики градуовальної залежності оптичної густини від вмісту зопіклону ( $y = bx + a$ ), отриманої методом екстракційної фотометрії

r	b	a	S <sup>2</sup>	Δb	Δa
0,9991	0,007400	0,02680	0,004192	0,0000006632	0,004651

Таблиця 6

Результати екстракційно-фотометричного визначення зопіклону

Внесено зопіклону у пробу, мкг	Оптична густина	Знайдено зопіклону		Метрологічні характеристики
		мкг	%	
10	0,105	10,57	105,7	$\bar{X} = 101,04$ $S = 2,62$ $Sx = 0,92$ $\Delta X = 2,19$ $\epsilon = 2,17\%$ $\bar{X}_{\Delta X} = 101,04 \pm 2,19$
20	0,18	20,70	103,5	
40	0,32	39,62	99,05	
60	0,47	59,89	99,82	
80	0,61	78,81	98,51	
100	0,78	101,78	101,78	
120	0,90	118,00	98,33	
140	1,08	142,32	101,66	

Після перевірки значущості коефіцієнтів а у рівняннях 1 та 2 [4] був зроблений висновок про неможливість переходу до рівняння виду  $y = b'x$ .

Світлопоглинання розчинів підлягає закону Бугера — Ламберта — Бера в межах концентрацій від 2 мкг до 20 мкг в 1 мл розчину для зопіклону та від 1 мкг до 20 мкг в 1 мл розчину для 2-аміно-5-хлорпіридину.

Результати кількісного визначення зопіклону та 2-аміно-5-хлорпіридину в розчинах за допомогою розроблених методик наведені в табл. 3 та 4.

Відносна невизначеність середнього результату становить  $\pm 2,00\%$  для зопіклону та  $\pm 3,08\%$  для 2-аміно-5-хлорпіридину.

Для розрахунку вмісту зопіклону в розчинах методом екстракційної фотометрії використовували градуовальний графік або рівняння прямої 3 виду  $y = bx + a$ , що має вигляд [4]:

$$A = 0,0074 \cdot C + 0,0268, \quad (3)$$

де: А — оптична густина;

С — вміст зопіклону у пробі, мкг.

Метрологічні характеристики отриманої градуовальної залежності наведені в табл. 5.

Після перевірки значущості коефіцієнта а [4] був зроблений висновок про неможливість переходу до рівняння виду  $y = b'x$ .

Світлопоглинання розчинів підлягає закону Бугера — Ламберта — Бера в межах концентрацій від 10 мкг до 140 мкг зопіклону у пробі.

Результати кількісного визначення зопіклону в розчинах за допомогою розробленої методики наведені в табл. 6. Відносна невизначеність середнього результату становить  $\pm 2,17\%$ .

#### ВИСНОВКИ

1. Розроблено методику спектрофотометричного визначення зопіклону, що дає можливість визначити препарат у межах концентрації від 2 мкг до 20 мкг в 1 мл розчину. Відносна невизначеність середнього результату складає  $\pm 2,00\%$ .

2. Розроблено методику спектрофотометричного визначення 2-аміно-5-хлорпіридину, що дає можливість визначити його у межах концентрації від 1 мкг до 20 мкг в 1 мл розчину. Відносна невизначеність середнього результату складає  $\pm 3,08\%$ .

3. Розроблено методику екстракційно-фотометричного визначення зопіклону з використанням як реагента кислотного барвника метилового оранжевого, що утворює із зопіклоном іонні асоціати. Запропонований метод дає можливість визначити від 10 мкг до 140 мкг зопіклону у пробі. Відносна невизначеність середнього результату складає  $\pm 2,17\%$ .

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Баторка С.В., Болотов В.В., Карпушина С.А. та ін. // Вісник фармації. — 2001. — №4 (28). — С. 30-32.
2. Болотов В.В., Ахмедов Е.Ю. // Вісник фармації. — 1998. — №2 (18). — С. 116-117.
3. Болотов В.В., Ткаченко В.Г. // Вісник фармації. — 2002. — №4 (32). — С. 12-14.
4. Доерфель К. Статистика в аналитической химии / Пер. с нем. под ред. В.В.Налимова. — М.: Мир, 1969. — 223 с.

5. Дурье Ю. Ю. *Справочник по аналитической химии.* — М.: Химия, 1989. — 448 с.
6. Branness J. G., Arnestad M., Karinen R., Hilberg T. // *J. Forensic Sci.* — 2001. — №46 (5). — P. 1247-1249.
7. Galloway J. H., Marsh I. D., Newton C. M., Forrest A. R. // *Sci. Justice.* — 1999. — №39 (4). — P. 253-256.
8. Grobler L. A., Schwelnuus M. P., Trichard C., Calder S. // *Clin. J. Sport Med.* — 2000. — №10 (2). — P. 123-128.
9. Hujak G., Rodenbeck A. // *PharmacoEcon.* — 1996. — Vol. 10 ISS, Suppl. 1. — P. 29-38.
10. Koski A., Ojanpera I., Akbari A. // *Hum. Exp. Toxicol.* — 2003. — №41 (5). — P. 17-20.
11. Mannaert E., Tytgat J., Daenens P. // *J. Anal. Toxicol.* — 1997. — №43 (5). — P. 471-474.
12. Meatherall R. C. // *J. Forensic Sci.* — 1997. — №42 (2). — P. 340-343.
13. Pounder D., Davies J. // *J. Anal. Toxicol.* — 1996. — №20 (4). — P. 273-274.
14. Reith D. M., Fountain J., McDowell R., Tilyard M. // *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* — 2003. — №41 (7). — P. 975-980.
15. Ruiz Rutz M. D., Garcia Sanchez F. M., Moreno Gavira R. // *Farm. Clin.* — 1995. — Vol. 12 ISS. — P. 337-338, P. 340-346.
16. Wagner J., Wagner M. L., Hening W. A. // *Ann. Pharmacother.* — 1998. — Vol. 32 ISS. — P. 680-691, P. 726-727.
17. Yamazaki M., Terada M., Mitsukuni Y., Yoshimura M. // *Nippon Hoigaku Zasshi.* — 1998. — №52 (4). — P. 245-252.

УДК 543.42.062-535.24:615.214.24:547.821

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ И ЭКСТРАКЦИОННО-ФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗОПИКЛОНА И ПРОДУКТА ЕГО ЩЕЛОЧНОГО ГИДРОЛИЗА — 2-АМИНО-5-ХЛОРОПИРИДИНА

В.В.Болотов, Л.Ю.Клименко

Предложена методика спектрофотометрического определения зопиклона и продукта его щелочного гидролиза — 2-амино-5-хлорпиридина, которая даёт возможность определить зопиклон в пределах концентраций от 2 мкг до 20 мкг в 1 мл раствора и 2-амино-5-хлорпиридин — от 1 мкг до 20 мкг в 1 мл раствора. Относительная неопределённость метода равна  $\pm 2,00\%$  для зопиклона и  $\pm 3,08\%$  для 2-амино-5-хлорпиридина. Разработана методика экстракционно-фотометрического определения зопиклона с использованием кислотно-основного индикатора метилового оранжевого. Методика позволяет определить препарат при его содержании в пробе от 10 мкг до 140 мкг. Относительная неопределённость метода равна  $\pm 2,17\%$ .

UDC 543.42.062-535.24:615.214.24:547.821

SPECTROPHOTOMETRIC AND EXTRACTION-PHOTOMETRIC DETERMINATION OF ZOPICLONE AND 2-AMINO-5-CHLOROPYRIDINE — ITS ALKALINE HYDROLYSIS PRODUCT

V.V.Bolotov, L.Yu.Klimentko

The spectrophotometric determination method of zopiclone and 2-amino-5-chloropyridine, its alkaline hydrolysis product has been proposed. It allows to determine zopiclone in the concentration range of 2 mkg to 20 mkg in 1 ml of the solution and 2-amino-5-chloropyridine from 1 mkg to 20 mkg in 1 ml of the solution. A relative error of the method is  $\pm 2,00\%$  for zopiclone and  $\pm 3,08\%$  for 2-amino-5-chloropyridine. The method of extraction photometric determination of zopiclone using acid — basic methyl orange indicator has been developed. The method allows to determine the substance in a sample with its content from 10 mkg to 140 mkg. A relative error of the method is  $\pm 2,17\%$ .