

В. В. Болотов, Л. Ю. Клименко

КИСЛОТНИЙ ГИДРОЛИЗ В АНАЛИЗЕ ЗОПИКЛОНА

Національний фармацевтический університет

Ключові слова: зопиклон, кислотний гидроліз, (7RS)-6-(5-хлоропіридин-2-ил)-7-гідрокси-6,7-дигідро-5Н-пірроло[3,4-*b*]піразин-5-он, 2-аміно-5-хлорпіридин, тонкослойная хроматография,

Изучен кислотный гидролиз зопиклона. Установлено, что из кислого гидролизата хлороформом экстрагируется (7RS)-6-(5-хлоропиридин-2-ил)-7-гидрокси-6,7-дигидро-5Н-пирроло[3,4-*b*]піразин-5-он, а после нейтрализации гидролизата - указанное соединение и 2-амино-5-хлорпіридин, которые могут быть маркерами при обнаружении зопиклона в химико-токсикологическом анализе. Предложены системы растворителей, позволяющие разделять указанные соединения и продукты кислотного гидролиза препаратов группыベンゾдиазепинов.

Зопиклон - относительно новый (на рынке с 1988 г.) снотворный лекарственный препарат; длительное время он считался едва ли не самым безопасным препаратом в данной группе лекарственных средств, особенно в сравнении с препаратами группыベンゾдиазепинов или производными барбитуровой кислоты [1].

Но за последние пять-семь лет все чаще и чаще появляются данные о немедицинском применении зопиклона, о случаях самоубийств, передозировок и смертельных отравлений данным препаратом [2,3].

В Великобритании и Финляндии, по данным за 2000-2002 гг., зопиклон попал в первую десятку лекарственных препаратов, которые наиболее часто становятся причиной смертельных отравлений. В 2003 г. в докладе Всемирной организации здравоохранения было обращено внимание на все вышеупомянутые факты [4,5,6].

Симптоматика отравлений снотворными препаратами может напоминать отравления препаратами группыベンゾдиазепинов, направленный химико-токсикологический анализ которых начинают с кислотного гидролиза с помощью 6 M раствора кислоты хлористоводородной при температуре 110°C в течение одного часа. Полученный гидролизат нейтрализуют, экстрагируют хлороформом, а затем хлороформное извлечение исследуют методом ТСХ, используя в качестве элюента бензол. Пятна соответствующихベンзофенонов обнаруживают по наличию желтого окрашивания или флюoresценции в УФ-свете [7].

В работах [8,9] нами описан кислотный гидролиз зопиклона, и методами ТСХ и ВЭЖХ изучено поведение продуктов гидролиза, экстрагируемых хлороформом из кислой среды. Высказано предположение, что обнаруживае-

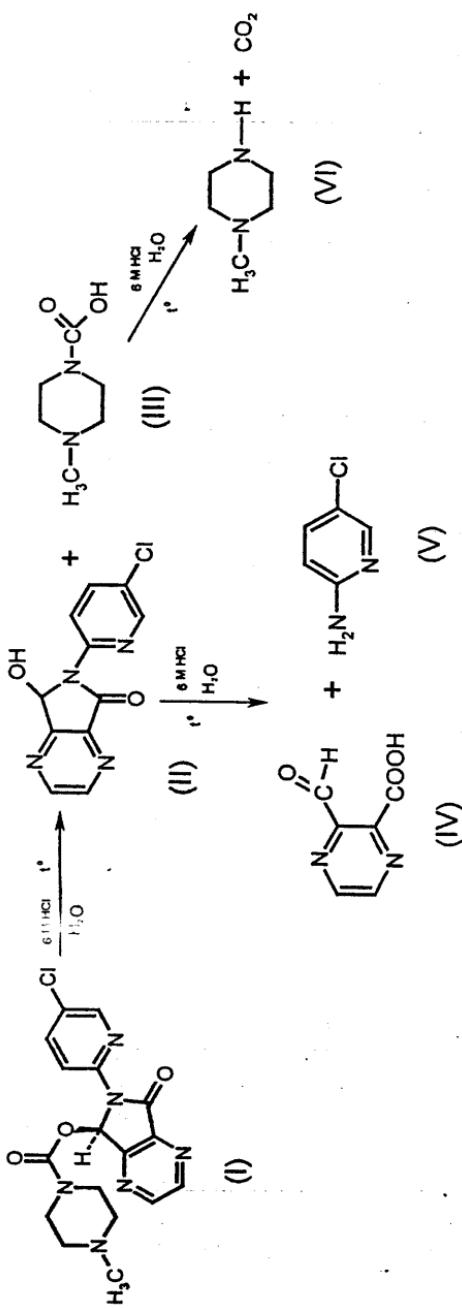


Рис. 1 Схема кислотного гидролізу зопіклона

мое при этом вещество - (7RS)-6-(5-хлорпиридин-2-ил)-7-гидрокси-6,7-дигидро-5Н-пирроло[3,4-*b*]пиразин-5-он.

В связи с этим представляло интерес выполнить кислотный гидролиз зопиклона, провести экстракцию продуктов гидролиза из нейтрального раствора и установить их структуру.

Предполагаемую схему кислотного гидролиза зопиклона можно представить следующим образом (рис. 1).

Параллельно с гидролизом зопиклона проводили гидролиз препарата из группы бензодиазепинов - феназепама и смеси зопиклона с феназепамом.

Методика проведения кислотного гидролиза

1. 1 мл раствора зопиклона в 0,1 М растворе кислоты хлористоводородной (концентрация 1 мг/мл) вносили в колбу, добавляли 1 мл воды очищенной и 5 мл 6 М раствора кислоты хлористоводородной. Смесь кипятили на водяной бане в течение 1 часа с обратным холодильником. После охлаждения смеси ее нейтрализовали натрия гидрокарбонатом до pH 7-8 и трижды экстрагировали хлороформом порциями по 5 мл. Хлороформные извлечения объединяли, фильтровали через фильтр с 1 г безводного натрия сульфата и упаривали на водяной бане до объема 2 мл (проба 1).

2. 1 мл раствора феназепама в 0,1 М растворе кислоты хлористоводородной (концентрация 1 мг/мл) вносили в колбу, добавляли 1 мл воды очищенной и 5 мл 6 М раствора кислоты хлористоводородной. Далее поступали как указано выше (проба 2).

3. По 1 мл растворов зопиклона и феназепама в 0,1 М растворе кислоты хлористоводородной (концентрация 1 мг/мл) вносили в колбу, добавляли 5 мл 6 М раствора кислоты хлористоводородной. Далее поступали как указано выше (проба 3).

Пробы 1, 2 и 3 исследовали методом ТСХ на хроматографических пластинах Sorbfil (силикагель СТХ-1ВЭ, тип подложки - ПЭТФ, связывающее вещество - силиказоль, фракция - 8÷12 мкм, толщина слоя - 100 мкм) с использованием в качестве элюента бензола. В качестве проявителей использовали:

- УФ-свет, позволяющий обнаружить продукты гидролиза препаратов группы бензодиазепинов [7], зопиклон (I) и соединение II [8,10];

- УФ-свет после обработки пластин парами кислоты хлористоводородной концентрированной, позволяющий обнаружить 2-амино-5-хлорпиридин (V) [8,10];

- 5% хлороформный раствор *n*-диметиламинобензальдегида после обработки пластин парами кислоты хлористоводородной концентрированной - появление окрашенных пятен позволяет обнаружить 2-амино-5-хлорпиридин (V) и продукты гидролиза препаратов группы бензодиазепинов, содержащие первичную ароматическую аминогруппу [8,10].

Исследование проводили в присутствии "свидетелей" - 1% хлороформных растворов зопиклона (I) и 2-амино-5-хлорпиридина (V). На линию старта хроматографической пластины наносили по 20 мкл проб 1, 2, 3 и растворов "свидетелей"; длина пробега растворителей составляла 10 см.

Результаты проведенных исследований представлены в таблице 1.

Данные табл.1 свидетельствуют о возможном образовании в ходе кислотного гидролиза зопиклона 2-амино-5-хлорпиридина (V). Кроме того, необходимо отметить, что проведение ТСХ-исследования с использованием в качестве элюента бензола позволяет четко отличить продукты гидролиза зопиклона от продуктов гидролиза препаратов группы бензодиазепинов (продукты гидролиза зопиклона в отличие от продуктов гидролиза препаратов группы бензодиазепинов остаются на старте).

При этом полученные результаты не позволяют однозначно говорить о том, что салатная флуоресценция продуктов гидролиза зопиклона обусловлена наличием соединения II. С равной вероятностью можно говорить о том, что салатная флуоресценция может быть обусловлена зопиклоном, не подвергшимся процессу гидролиза. Поэтому мы провели исследование проб 1, 2 и 3 методом ТСХ в системе растворителей хлороформ-акетон (8:2), позволяющей удовлетворительно разделить зопиклон (I), соединение II и 2-амино-5-хлорпиридин (V) [8,10].

Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 1

Результаты исследования проб 1, 2 и 3 методом тонкослойной хроматографии (элюент - бензол)

Исследуемая проба	R_f	Окраска пятен или цвет флуоресценции			
		окраска пятен	цвет флуоресценции в УФ-свете	цвет флуоресценции в УФ-свете после обработки парами HCl	окраска пятен после обработки парами HCl и 5% хлороформным раствором <i>n</i> -диметиламинобензальдегида
проба 1	0,00	—	салатная	салатная	желтое
проба 2	0,35	желтое	коричневая	коричневая	оранжевое
проба 3	0,00	—	салатная	салатная	желтое
	0,35	желтое	коричневая	коричневая	оранжевое
зопиклон	0,00	—	салатная	салатная	—
2-амино-5-хлорпиридин	0,00	—	—	—	желтое

Результаты исследования проб 1, 2 и 3 методом тонкослойной хроматографии (система растворителей хлороформ-ацетон (8:2))

Исследуемая проба	R_f	Окрашивание или флуоресценция пятен			
		окраска пятен	цвет флуоресценции в УФ-свете	цвет флуоресценции в УФ-свете после обработки парами HCl	окраска пятен после обработки парами HCl и 5% хлороформным раствором <i>n</i> -диметиламинобензальдегида
проба 1	0,31	—	—	фиолетовая	желтое
	0,38	—	салатная	салатная	—
проба 2	0,70	желтое	коричневая	коричневая	оранжевое
проба 3	0,31	—	—	фиолетовая	желтое
	0,38	—	салатная	салатная	—
	0,70	желтое	коричневая	коричневая	оранжевое
зопиклон	0,09	—	салатная	салатная	—
2-амино-5-хлорпиридин	0,31	—	—	фиолетовая	желтое

Полученные данные (табл. 2) свидетельствуют о том, что продуктами кислотного гидролиза зопиклона являются соединения II и V. Необходимо отметить, что система растворителей хлороформ-ацетон (8:2) позволяет разделить продукты кислотного гидролиза зопиклона и препаратов группы бензодиазепинов.

Кроме того, система растворителей хлороформ-ацетон (8:2) была использована для проведения двумерной хроматографии пробы 1 в условиях, описанных для соединения II в работе [8]: после первого элюирования пластину обрабатывали парами кислоты хлористоводородной концентрированной и просматривали в УФ-свете. Через центры обнаруженных пятен проводили линию старта, обрабатывали ее 10% раствором натрия гидроксида и высушивали на воздухе. Пластину вновь элюировали в указанной системе растворителей, высушивали, обрабатывали парами кислоты хлористоводородной концентрированной и просматривали в УФ-свете. При этом наблюдали два флуоресцирующих фиолетовым цветом пятна на одном уровне ($R_f=0,31$), которые после обработки 5% хлороформным раствором *n*-диметиламинобензальдегида приобретают желтое окрашивание (2-амино-5-хлорпиридин).

Данное исследование, с одной стороны, позволяет подтвердить наличие в исходном материале зопиклона, а с другой стороны, свидетельствует о том, что 2-амино-5-хлорпиридин является структурным фрагментом молекулы соединения II.

Для подтверждения структуры вещества II нами проведен препаративный гидролиз: 0,6 г зопиклона вносили в колбу, добавляли 2 мл воды очищен-

ной и 5 мл 6 М раствора кислоты хлористоводородной; смесь кипятили на водяной бане в течение 1 часа с обратным холодильником. После охлаждения смеси ее трижды экстрагировали хлороформом порциями по 5 мл. Хлороформные извлечения объединяли, фильтровали через фильтр с 1 г безводного натрия сульфата и упаривали на водяной бане досуха (вещество II). Водный слой нейтрализовали натрия гидрокарбонатом до pH 7-8 и трижды экстрагировали хлороформом порциями по 5 мл. Хлороформные извлечения объединяли, фильтровали через фильтр с 1 г безводного натрия сульфата и упаривали на водяной бане досуха (вещество V).

Вещества II и V перекристаллизовывали из этанола, после чего для них были определены температуры плавления, которые составили 242°C и 138°C соответственно, что соответствует литературным данным для (7RS)-6-(5-хлоропиридин-2-ил)-7-гидрокси-6,7-дигидро-5Н-пирроло[3,4-*b*]пиразин-5-она и 2-амино-5-хлорпиридины [11,12].

Для них также получены УФ-спектры: вещество II - спектр в целом напоминает УФ-спектр зопиклона, но максимум поглощения составляет 310 нм в отличие от 304 нм для зопиклона; вещество V - два максимума поглощения при 234 и 316 нм.

Для подтверждения структуры вещества II были получены ЯМР-¹Н-спектры зопиклона и вещества II (спектрометр Varian Mercury VX-200 (200 MHz), растворитель - DMSO-D₆, внутренний стандарт - TMC):

- зопиклон δ, м. д.: 8,98 (1Н, д, 2-Н), 8,93 (1Н, д, 3-Н), 8,53 (1Н, д, 6'-Н), 8,36 (1Н, д, 3'-Н), 8,10 (1Н, дд, 4'-Н), 7,78 (1Н, с, 7-Н), 3,6 - 2,9 (4Н, м, CON(CH₂)₂), 2,2 - 1,6 (4Н, м, CN(CH₂)₂), 2,00 (3Н, с, CH₃);

- вещество II, δ, м. д.: 8,92 (2Н, с, 2,3-Н), 8,57 (1Н, д, 6'-Н), 8,27 (1Н, д, 3'-Н), 8,08 (1Н, дд, 4'-Н), 7,25 (1Н, д, 7-Н), 6,84 (1Н, д, OH).

Данные о температуре плавления и спектральные характеристики соединения I позволяют утверждать, что соединение II - это (7RS)-6-(5-хлоропиридин-2-ил)-7-гидрокси-6,7-дигидро-5Н-пирроло[3,4-*b*]пиразин-5-он.

Наличие вещества IV, содержащего альдегидную группу, в кислом гидролизате (до проведения нейтрализации и экстракции) было подтверждено качественной реакцией на хроматографических пластинах с раствором *o*-фенилендиамина в ледяной уксусной кислоте, предложенной нами ранее [8].

Таким образом, проведенные исследования подтверждают предложенную нами схему кислотного гидролиза зопиклона. И позволяют рекомендовать соединения II и V в качестве "маркеров" наличия зопиклона при проведении исследования на препараты группы бензодиазепинов.

ЛІТЕРАТУРА

1. Reith D. M., Fountain J., McDowell R., Tilyard M. Comparison of the fatal toxicity index of zopiclone with benzodiazepines. // J. Toxicol. Clin. Toxicol.-2003.-№41(7).-P.975-980.

2. Haga C. Poisonings with benzodiazepine-like drugs // Tidsskr. Nor. Laegeforen.-2003.-№123(4).-P.473-474.
3. Bramness J. G., Arnèstad M., Karinen R., Hilberg T. Fatal overdose of zopiclone in an elderly woman with bronchogenic carcinoma. // J. Forensic. Sci.-2001.- №46(5).-P.1247-1249.
4. Carlsten A., Waern M., Holmgren P., Allebeck P. The role of benzodiazepines in elderly suicides. // Scand. J. Public. Health.-2003.-№31(3).-P.224-228.
5. Buckley N. A., McManus P. R. Changes in fatalities due to overdose of anxiolytic and sedative drugs in the UK (1983 - 1999) // Drug Saf.-2004.-№27(2).- P.135-141.
6. Strohle A., Antonijevic I. A., Steiger A., Sonntag A. Dependency of non-benzodiazepine hypnotics. Two case reports // Nervenarzt.-1999.-№70(1).- P.72-75.
7. 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.-272с.
8. Болотов В. В., Клименко Л. Ю. Розробка кольорових реакцій на зопіклон // Журнал органічної та фармацевтичної хімії.-2005.-№1(9).-С.65-69.
9. Болотов В. В., Клименко Л. Ю. Високоефективна рідинна хроматографія в аналізі зопіклону // Журнал органічної та фармацевтичної хімії.-2005.- №4(12).-С.77-81.
10. Болотов В. В., Клименко Л. Ю., Іванчук І. М. Застосування тонкошарової хроматографії в аналізі снодійних засобів - зопіклону та донормілу // Вісник фармації.-2005.-№2(42).-С.7-11.
11. Пат. 3862149 США, МПК С 07 D 51/72. Pyrrolo(3,4-b)pyrazine derivatives: Пат. 3862149 США, МПК С 07 D 51/72 / C. Cotrel et al. (France); Rhone-Poulenc S. A. - № 319876; Заявл. 29.12.72; Опубл. 21.01.75.-6c.
12. Beilstein Handbook of Organic Chemistry.-Vol.22(8).-Suppl.V.-P.451.

Поступила 09.02.2006г.

Сведения об авторах:

Болотов В.В., д.хим.н., профессор, зав. кафедрой аналитической химии НФаУ;
Клименко Л.Ю., аспирант кафедры аналитической химии НФаУ.

Адрес для переписки:

Болотов Валерий Васильевич, г. Харьков, пр. Гагарина, д. 38, кв. 63.
Тел. (0572) 67-94-24.