

**ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ  
БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ НА ЗОПІКЛОН  
МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ**

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
УКРАЇНСЬКИЙ ЦЕНТР НАУКОВОЇ МЕДИЧНОЇ ІНФОРМАЦІЇ  
І ПАТЕНТНО-ЛІЦЕНЗІЙНОЇ РОБОТИ

«УЗГОДЖЕНО»

Директор департаменту

організації та розвитку медичної  
допомоги населенню МОЗ України

 Р.О. Моїсєнко

“21” грудня 2006 р.

## ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ НА ЗОПІКЛОН

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Харків  
Видавництво НФаУ  
2007

## ВСТУП

Перелік імпортованих та вітчизняних препаратів, що пропонуються на фармацевтичному ринку України, постійно розширюється, тому розробка методів хіміко-токсикологічного аналізу та фармацевтичного контролю сильнотоксичних лікарських засобів є актуальним завданням токсикологічної та фармацевтичної хімії.

Установа-розробник: Національний фармацевтичний університет

Великий інтерес в хіміко-токсикологічному відношенні викликають препарати з групи снодійних засобів. До цих препаратів належить зопіклон, що за даними літератури за останні 10 років також представляє інтерес в хіміко-токсикологічному відношенні. Описано численні випадки гострих, летальних та суїцидальних отруєнь зопіклоном, а також не медичного застосування препарату в суміші з іншими лікарськими засобами та алкоголем. Клінічна картина отруєнь зопіклоном та морфологічні зміни в організмі при цьому не завжди характерні і мають багато спільного з препаратами групи бензодіазепінів. Діагностика отруєнь цим препаратом ускладнюється ще й тим, що разом з ним можуть застосовувати інші препарати. Саме тому в діагностиці цих отруєнь велике значення мають результати хіміко-токсикологічних досліджень.

У методичних рекомендаціях викладено результати використання загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів ізолювання лікарських отрут із біологічного матеріалу відносно зопіклону, а також розроблено алгоритми окремої методики ізолювання зопіклону за допомогою хлороформу.

Наведено методику виявлення та кількісного визначення зопіклону у витяжках із біологічного матеріалу за допомогою кольорових реакцій, тонкошарової та високоефективної рідинної хроматографії, оптичних методів аналізу.

Методичні рекомендації призначено для лікарів-лаборантів токсикологічних відділень лікарень та судово-медичних експертів-токсикологів бюро судово-медичної експертизи, видаються в Україні вперше.

За даними наукової літератури, снодійні засоби посідають певне місце серед ліків, що призводять до отруєнь, як випадкових, так і навмисних. Серед них останнім часом широко зустрічається і зопіклон – снодійний препарат групи циклопіролонів. 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, тому в діагностиці цих отруєнь велику увагу приділяють результатам хіміко-токсикологічних досліджень.

Відомості про системне хіміко-токсикологічне дослідження зопіклону в літературі відсутні, що зумовило необхідність розробки схеми дослідження біологічного матеріалу на зопіклон.

Укладачі: Болотов В.В. — д-р хім. наук, професор, зав. кафедри аналітичної хімії НФаУ  
тел. (0572) 67-94-24

Клименко Л.Ю. — асистент кафедри аналітичної хімії НФаУ  
тел. (0572) 67-91-93

Рецензент: д-р фармац. наук, професор Г.П. Петлюнін

Голова проблемної комісії «Фармація» МОЗ та АМН України:  
чл.-кор. НАН України В.П. Черних

© Болотов В.В.,  
Клименко Л.Ю., 2007  
© НФаУ, 2007

## 1. МЕТОДИКИ ІЗОЛЮВАННЯ ЗОПІКЛОНУ ІЗ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ

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

Кількість зопіклону, що використовувалась для проведення модельних дослідів, було розраховано, виходячи з даних наукової літератури щодо кількості препарату в органах і тканинах людини при смертельних отруєннях.

Ізолювання зопіклону з біологічного матеріалу проводили за допомогою модифікованих методів О.О. Васильєвої, Стаса-Отто, В.П. Крамаренка. 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.

### Методика ізолювання зопіклону хлороформом

До 10 г біологічного матеріалу додають 30 г безводного натрію сульфату, змішують та періодично перемішують у ступці до утворення сипкої маси (близко 2-3 години). У вузьку нижню частину скляної колонки діаметром 17-20 мм поміщають марлевий тампон, заливають гексан (частина від попередньо відміряного гексану об'ємом 100 мл) та засипають отриману сипку масу, періодично додаючи гексан таким чином, щоб над біологічним матеріалом постійно утримувалося "дзеркало" товщиною 1-2 см; після повного перенесення сипкої маси колонку залишають на годину. Далі над колонкою поміщають ділільну лійку з залишком гексану, який пропускають через колонку зі швидкістю 60-80 крапель за хвилину, утримуючи "дзеркало" над біологічним матеріалом. Гексаний витяг збирають і далі не досліджують.

Біологічний матеріал висипають із колонки та залишають до видалення гексану, після чого знову переносять в скляну колонку та проводять екстракцію, використовуючи як розчинник хлороформ (100 мл) за схемою, що описана вище. Хлороформну витяжку збирають до мірної колби місткістю 100,0 мл та доводять хлороформом до позначки ( $V_1$ ).

### Методика ізолювання зопіклону із крові

До 10 мл крові додають 5 мл 10% водного розчину кислоти трихлорацетатної, перемішують та залишають на годину при постійному перемішуванні. Суміш центрифугують протягом 10 хв (5000 об / хв), зливають надосадову рідину, перевіряють рН (рН має дорівнювати 2) та тричі екстрагують діетиловим етером порціями по 5 мл. Етерні витяжки відділяють і в подальшому не досліджують.

Водний шар підлужують 50% розчином натрію гідроксиду до рН = 11 і тричі екстрагують хлороформом порціями по 10 мл (при утворенні стійких емульсій застосовують центрифугування протягом 10 хв (5000 об / хв). Лужні хлороформні витяжки об'єднують та фільтрують через паперовий фільтр з 1 г безводного натрію сульфату до мірної колби місткістю 25,0 мл, доводять об'єм хлороформом до позначки ( $V_1$ ).

### Методика ізолювання зопіклону із сечі

До 10 мл сечі додають 0,1 М розчин кислоти хлористоводневої до рН = 2 і тричі екстрагують діетиловим етером порціями по 5 мл. Етерні витяжки відділяють і в подальшому не досліджують.

Водний шар підлужують 50% розчином гідроксиду натрію до рН = 11 і тричі екстрагують хлороформом порціями по 10 мл (при утворенні стійких емульсій застосовують центрифугування протягом 10 хв (5000 об / хв). Лужні хлороформні витяжки об'єднують та фільтрують через паперовий фільтр з 1 г безводного натрію сульфату до мірної колби місткістю 25,0 мл, доводять об'єм хлороформом до позначки ( $V_1$ ).

Результати наведено в табл. 1.

Таблиця 1

Результати ізолювання зопіклону із біологічного матеріалу  
( $n = 3, a = 0,95$ )

Метод ізолювання	Виділено зопіклону, % (метод кількісного визначення)
За О.О. Васильєвою («кисла» хлороформна витяжка)	Не ізолюється
За О.О. Васильєвою («лужна» хлороформна витяжка)	57,24 ± 5,66 (УФ-спектрофотометричний) 54,88 ± 3,44 (екстракційно-фотометричний) 54,17 ± 4,19 (метод ВЕРХ після ТПХ-очищення)
За В.П. Крамаренком	64,27 ± 4,12 (УФ-спектрофотометричний) 60,50 ± 0,92 (екстракційно-фотометричний) 60,83 ± 1,79 (метод ВЕРХ після ТПХ-очищення)
За Стасом-Отто	Не ізолюється
Методика ізолювання хлороформом із печінки	80,02 ± 2,15 (УФ-спектрофотометричний) 66,41 ± 3,07 (УФ-спектрофотометричний після ТПХ-очищення) 59,37 ± 3,41 (екстракційно-фотометричний після ТПХ-очищення)
Методика ізолювання хлороформом із крові	59,61 ± 1,84 (метод ВЕРХ після ТПХ-очищення) 59,74 ± 4,66 (УФ-спектрофотометричний) 53,81 ± 3,54 (екстракційно-фотометричний) 55,02 ± 3,23 (метод ВЕРХ після ТПХ-очищення)
Методика ізолювання хлороформом із сечі	68,64 ± 3,89 (УФ-спектрофотометричний) 65,34 ± 5,94 (екстракційно-фотометричний) 64,14 ± 3,94 (метод ВЕРХ після ТПХ-очищення)

Дані табл. 1 свідчать, що при проведенні *неспрямованого аналізу* біологічного матеріалу зопіклон можна ізолювати за допомогою загальноприйнятих методів О.О. Васильєвої та В.П. Крамаренка, що дозволяють отримати витяжки достатньою мірою звільнені від співекстрактивних речовин. Слід зазначити, що при ізолюванні за методом О.О. Васильєвої зопіклон потрапляє до «лужної» хлороформної витяжки.

При виконанні *спрямованого дослідження* біологічного матеріалу на зопіклон рекомендовано застосовувати методику ізолювання хлороформом з попереднім очищенням біологічного матеріалу гексаном (див. вище).

## II. МЕТОДИКИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЗОПІКЛОНУ

### Методика ідентифікації зопіклону методом ТПХ

Ідентифікацію зопіклону методом ТПХ проводять на хроматографічних пластинках «Sorbfil» ППСХ-ІІВ (силікагель СТХ-ІВЕ, тип підложки – ПЕТФ, зв'язуюча речовина – силіказоль, фракція – 8÷12 мкм, товщина шару – 100 мкм).

Хроматографування проводять в камері об'ємом 500 см<sup>3</sup>, в яку вносять 50 мл систем розчинників. Камеру насичують протягом 30 хв. Довжина шляху пробігу розчинників складає 5 см.

Для ідентифікації зопіклону використовують по 100 мкл отриманих хлороформних витяжок. У випадку негативного результату по 1/10 частині отриманих хлороформних витяжок випаровують на водяній бані до об'єму 0,3-0,5 мл і по 100 мкл згущених витяжок використовують для ідентифікації зопіклону.

При проведенні *неспрямованого дослідження* біологічного матеріалу аналіз виконують відповідно до загальноприйнятої схеми ТПХ-скринінгу в одній із наступних загальних систем розчинників 1 або 2 для речовин основного характеру:

1. Хлороформ – діоксан – ацетон – 25% розчин амоніаку (47,5:45:5:2,5).
2. Толуол – ацетон – етанол – 25% розчин амоніаку (45:45:7,5:2,5).

R<sub>f</sub> зопіклону в цих системах розчинників становить 0,80 та 0,49 відповідно [4].

Як проявники використовують:

- 1) УФ-світло – пляма зопіклону повинна давати флуоресценцію салатного кольору, плями співекстрактивних речовин мають такий же колір в УФ-світлі;
- 2) послідовно реактив Драгendorфа та сульфатну кислоту (для проявлення алкалоїдів, похідних 1,4-бензодіазепіну та *n*-амінобензойної кислоти) – пляма зопіклону забарвлюється в червоно-коричневий колір на відміну від плям співекстрактивних речовин, колір яких є жовто-коричневим та швидко зникає;

- 3) розчин калію перманганату (для виявлення кокаїну, речовин-зідновників);
- 4) 50% розчин сульфатної кислоти в етанолі (для виявлення похідних фенотіа-зину);
- 5) розчин нінігідрину з наступним нагріванням пластин (для виявлення фенола-кліламінів та речовин, що мають в структурі первинну або вторинну аміно-групу).

Проявниками 3-5 плями зопіклону не забарвлюються.

Далі проводять ТПХ-дослідження в окремих системах розчинників для ал-калоїдів, похідних 1,4-бензодіазепіну та *n*-амінобензойної кислоти з викорис-танням відповідних проявників. Для зопіклону рекомендується використовувати на цьому етапі систему розчинників хлороформ-метанол (90:10). Попе-редньо пластину елююють в хлороформі з метою очищення від співекстрактив-них речовин – один раз або, за необхідності, двічі (для згущених витяжок). За цих умов зопіклон залишається на лінії старту, а співекстрактивні речовини мігру-ють до лінії фінішу.

Для проявлення плям зопіклону на пластинах використовують будь-які два проявники із наступних:

- 1) реактив Несслера [7] – спостерігається жовто-гаряче забарвлення, що по-ступово переходить на сіре; плями співекстрактивних речовин за цих умов одразу ж набувають сірого забарвлення;
- 2) суміш 10% розчину NaOH, 10% розчину H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> та 2% розчину *o*-фенілєндіаміну в етанолі (1:1:1) [3] – пляма зопіклону забарвлюється в че-рвоно-коричневий колір (пластину обробляють методом занурення і за не-обхідності – наявність темного фону – промивають водою очищеною);
- 3) пластини обробляють 10% розчином NaOH, висушують при кімнатній тем-пературі, обробляють 5% розчином гідроксиламіну гідрохлориду в етанолі, висушують при кімнатній температурі та обробляють 2% розчином хлориду заліза (III) [3] – пляма зопіклону набуває чорного кольору.

R<sub>f</sub> зопіклону в цій системі розчинників становить 0,55 [4].

Запропоновані проявники дозволяють виявити 0,2 мкг зопіклону в пробі.

За умов позитивного результату з проявниками 1-3 проводять дослідження отриманої хлороформної витяжки методом двомірної тонкошарової хромато-графії за такою методикою.

На першу лінію старту хроматографічної пластини наносять зазначену кі-лькість хлороформної витяжки та проводять очищення витяжок в хлороформі як зазначено вище. Хроматограму розвивають в системі розчинників хлоро-форм-метанол (90:10) та проявляють в УФ-світлі – виявляється пляма, що має салатну флуоресценцію в УФ-світлі. Через центр утвореної плями перпендику-лярно першій лінії старту проводять другу лінію старту та наносять поряд 10 мкл стандартного хлороформного розчину 2-аміно-5-хлорпіридину (концен-трація 1 мкг/мкл). Другу лінію старту обробляють 10% розчином натрію гідро-ксиду. Пластину висушують та знову елюють у зазначеній системі роз-чинників, висушують та поміщають на 5 хв у камеру, насичену парами кислоти хлористоводневої концентрованої, після чого проявляють в УФ-світлі. При цьому спостерігають дві плями на одному рівні, що мають фіолетову флуорес-ценцію в УФ-світлі. Після обробки пластин 5% хлороформним розчином *n*-диметиламінобензалдегіду плями набувають яскраво-жовтого кольору, що посилюється з часом.

При проведенні *спрямованого дослідження* біологічного матеріалу на зо-піклон ТПХ-дослідження проводять таким чином.

На лінію старту хроматографічної пластини наносять у дві точки зазначену кількість отриманої хлороформної витяжки (точки 1 та 2). Поряд на лінію старту хроматографічної пластини наносять по 10 мкл хлороформних розчинів «свідків» – зопіклону (точка 3) та 2-аміно-5-хлорпіридину (точка 4) (концен-трація 1 мг / мл). Точку 1 обробляють 10% розчином натрію гідроксиду та ви-сушують при кімнатній температурі. Пластину висушують та попередньо елюють в хлороформі з метою очищення від співекстрактивних речовин – один раз або, за необхідності, двічі (для згущених витяжок). За цих умов зопіклон та 2-аміно-5-хлорпіридин залишаються на лінії старту, а співекстрактивні ре-човини мігрують до лінії фінішу. Далі пластину висушують та елюють в сис-темі розчинників ацетон.

Пластину проявляють в УФ-світлі та спостерігають на смугах 2 і 3 плями (R<sub>f</sub> = 0,36), що мають флуоресценцію салатного кольору. Далі пластину витри-мують протягом 5 хв у камері, насиченій парами кислоти хлористоводневої концентрованої, і знову проявляють в УФ-світлі – спостерігають на смугах 1 та 4 плями з R<sub>f</sub> = 0,54, що мають флуоресценцію фіолетового кольору.

Далі смуги 1 та 4 накривають склом і обробляють смуги 2 та 3 сумішшю 10% розчину  $\text{NaOH}$ , 10% розчину  $\text{H}_2\text{O}_2$  та 2% розчину *o*-фенілдіаміну в етанолі (1:1:1) – спостерігають червоно-коричневе забарвлення плям ( $R_f = 0,36$ ); смуги 2 та 3 накривають склом і смуги 1 та 4 обробляють 5% хлороформним розчином *n*-диметиламінобензалдегіду – спостерігають яскраво-жовте забарвлення плям ( $R_f = 0,54$ ).

Кількісне визначення зопіклону проводять за УФ-спектрофотометричною, екстракційно-фотометричною та ВЕРХ-методами в 5 мл витяжок, отриманих за методами О.О. Васильєвої, В.П. Крамаренка і методиками ізолювання із крові та сечі, та в 10 мл витяжки, отримані за методом ізолювання хлороформом, до та після їх ТПХ-очищення.

#### Методика ТПХ-очищення витяжок із біологічного матеріалу

Зазначену кількість хлороформної витяжки випаровують на водяній бані до об'єму 0,5 мл та кількісно наносять на лінію старту хроматографічної пластини «Sorbfil» ПТСХ-ІВ смугого ширини 2 см. Поряд наносять 10 мкл стандартного хлороформного розчину зопіклону (концентрація 1 мкг/мл). Пластину елююють в хлороформі з метою очищення від співекстрактивних речовин – один раз або, за необхідності, двічі. За цих умов зопікстон залишається на лінії старту, а співекстрактивні речовини мігрують до лінії фінішу.

Після висушування елююють пластини в системі розчинників хлороформ-метанол (90:10), висушують та проявляють в УФ-світлі.

Хроматографування проводять в камері об'ємом 500  $\text{см}^3$ , в яку вносять 50 мл систем розчинників. Камеру насичують протягом 30 хв. Довжина шляху пробігу розчинників складає 5 см.

За допомогою скальпеля напроти плями «свідка» з пластини ретельно знімають сорбент з площі 3  $\text{см} \times 1 \text{ см}$  в скляний флакон. У флакон додають 10 мл 0,1 М розчину кислоти хлористоводневої –  $V_3$  (при наступному проведенні кількісного визначення за УФ-спектрофотометричною методикою) або 10 мл 0,01 М розчину кислоти хлористоводневої –  $V_3$  (при наступному проведенні кількісного визначення за екстракційно-фотометричною або ВЕРХ-методикою) та струшують протягом 5 хв, після чого центрифугують протягом 10 хв (5000 об / хв). Надосадову рідину (елюат) використовують для проведення кількісного визначення.

#### УФ-спектрофотометрична методика кількісного визначення зопіклону

Методика побудови градуовального графіка для УФ-спектрофотометричного визначення зопіклону. Розчини зопіклону 1, 2, 3 та 4 готують таким чином: 50,0 мг зопіклону вносять в мірну колбу місткістю 250,0 мл, розчиняють у 0,1 М розчині кислоти хлористоводневої і доводять об'єм розчину 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої до позначки (стандартний розчин 1, концентрація 200 мкг/мл). У дві мірні колби місткістю 100,0 мл вносять із бюретки 5,00 та 10,00 мл стандартного розчину 1 відповідно і доводять об'єми розчинів 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої до позначки (розчини 2 та 3 відповідно, концентрація 10 та 20 мкг/мл). У мірну колбу місткістю 200,0 мл вносять із бюретки 15,00 мл стандартного розчину 1 і доводять об'єм розчину 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої до позначки (розчин 4, концентрація 15 мкг/мл). У дві мірні колби місткістю 50,0 мл вносять із бюретки 10,00 та 30,00 мл розчину зопіклону 2 відповідно і доводять об'єми розчинів 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої до позначки (розчини 5 та 6 відповідно, концентрація 2 та 6 мкг/мл). Після ретельного перемішування визначають оптичну густину розчинів 2, 3, 4, 5 та 6 на спектрофотометрі SPECORD M-40 UV-VIS при  $\lambda = 304 \text{ нм}$  та довжині кванти 10 мм.

За отриманими даними будують градуовальний графік залежності оптичної густини розчину від концентрації зопіклону (С, мкг / мл) та розраховують відповідне рівняння лінійної залежності оптичної густини розчину від його концентрації.

Зазначену кількість витяжок ( $V_2$ ) випаровують на водяній бані при температурі 80°C до сухого залишку. Сухий залишок після охолодження розчиняють в 10 мл 0,1 М розчину кислоти хлористоводневої ( $V_3$ ). Оптичну густину отриманого розчину або зазначеного елюату (при проведенні ТПХ-очищення) визначають на спектрофотометрі SPECORD M-40 UV-VIS при  $\lambda = 304 \text{ нм}$  та довжині кванти 10 мм.

Концентрацію зопіклону в розчині, що аналізується, (С, мкг / мл) розраховують за допомогою градуовального графіка або за відповідним рівнянням лінійної залежності оптичної густини розчину від його концентрації [2].

Кількість зопіклону в наважці біологічного матеріалу X (мкг / 10 г) розраховують за формулою:

$$X = \frac{C \cdot V_1 \cdot V_3}{V_2}$$

де: С – концентрація зопіклону в розчині, що аналізується, мкг / мл;

V<sub>1</sub> – об'єм хлороформної витяжки, що отримано із наважки біологічного матеріалу, мл;

V<sub>2</sub> – об'єм хлороформної витяжки, що взято для аналізу, мл;

V<sub>3</sub> – об'єм 0,1 М розчину кислоти хлористоводневої, що використано для розчинення сухого залишку (або об'єм отриманого елюату при виконанні ТПХХ-очищення), мл.

#### Екстракційно-фотометрична методика кількісного визначення зопіклону

*Методика побудови градувального графіка для екстракційно-фотометричного визначення зопіклону.* 50,0 мг зопіклону вносять в мірну колбу місткістю 250,0 мл, розчиняють у 0,01 М розчині кислоти хлористоводневої і доводять об'єм розчину 0,01 М розчином кислоти хлористоводневої до позначки (стандартний розчин 1, концентрація 200 мкг/мл). У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносять із бюретки 20,00 мл стандартного розчину зопіклону 1 і доводять об'єм розчинів 0,01 М розчином кислоти хлористоводневої до позначки (стандартний розчин 2, концентрація 40 мкг/мл). У ряд мірних колб місткістю 100,0 мл вносять із бюретки 5,00, 10,00 та 20,00 мл стандартного розчину зопіклону 2 відповідно і доводять об'єми розчинів 0,01 М розчином кислоти хлористоводневої до позначки (стандартний розчин 3, 4 та 5 відповідно, концентрація 2, 4 та 8 мкг/мл). У ряд мірних колб місткістю 100,0 мл вносять із бюретки 6,00, 8,00, 10,00, 12,00 та 14,00 мл стандартного розчину зопіклону 1 відповідно і доводять об'єми розчинів 0,01 М розчином кислоти хлористоводневої до позначки (розчини 6, 7, 8, 9 та 10 відповідно, концентрація 12, 16, 20, 24 та 28 мкг/мл).

У ділильні лійки вносять по 5,00 мл ацетатного буферного розчину з рН = 4,6, по 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 отриманих розчинів додають по 10,00 мл хлороформу. Суміші в ділильних лійках струшують про-

тягом 5 хв за допомогою механічного струшувача і залишають на 10 хв для розділення шарів. Збирають по 8,00 мл хлороформних шарів, відкладаючи їх перші та останні порції (близько 1,00 мл), і додають до них по 2,00 мл 1% розчину кислоти сульфатної в абсолютному етанолі. Одержані розчини ретельно перемішують та визначають їх оптичну густину на фотоелектроколориметрі КФК-2 (довжина ковети 20 мм, світлофільтр з λ<sub>ф</sub> = 540±10 мм). Як розчин порівняння використовують хлороформ.

За стриманими даними будують градувальний графік залежності оптичної густини розчину від вмісту зопіклону в пробі (С, мкг) та розраховують відповідне рівняння лінійної залежності оптичної густини розчинів від їх концентрації.

Зазначену кількість витяжок (V<sub>2</sub>) випаровують на водяній бані при температурі 80°C до сухого залишку. Сухий залишок після охолодження розчиняють в 10 мл 0,01 М розчину кислоти хлористоводневої (V<sub>3</sub>). В ділильну лійку вносять 5,00 мл ацетатного буферного розчину з рН = 4,6, 5,00 мл 0,02% розчину метилового оранжевого та 5,00 мл отриманого розчину або відповідного елюату – V<sub>4</sub> (при проведенні ТПХХ-очищення), до отриманого розчину додають 10,00 мл хлороформу. Далі виконують дослідження як зазначено вище.

Кількість зопіклону в пробі, що аналізується, (С, мкг) розраховують за допомогою градувального графіка або за відповідним рівнянням лінійної залежності оптичної густини розчину від його концентрації [2].

Кількість зопіклону в наважці біологічного матеріалу X (мкг / 10 г) розраховують за формулою:

$$X = \frac{C \cdot V_1 \cdot V_3}{V_2 \cdot V_4}$$

де: С – кількість зопіклону в пробі, що аналізується, мкг;

V<sub>1</sub> – об'єм хлороформної витяжки, що отримано із наважки біологічного матеріалу, мл;

V<sub>2</sub> – об'єм хлороформної витяжки, що взято для аналізу, мл;

V<sub>3</sub> – об'єм 0,01 М розчину кислоти хлористоводневої, що використано для розчинення сухого залишку (або об'єм отриманого елюату при виконанні ТПХХ-очищення), мл;

V<sub>4</sub> – об'єм розчину або отриманого елюату, що взято для аналізу, мл.



**Методика ідентифікації та кількісного визначення  
зопіклону методом ВЕРХ**

Визначення проводять на хроматографі "Міліхром А-02" (ЗАТ «ЕкоНова», Новосибірськ). Обробку хроматограм проводять за допомогою програми "Аналітика - Chrom", розробленої НВФ "Аналітика" (м. Харків).

У роботі використовують колонку Ø2 × 75 мм, упаковану оберненою фазою ProntoSIL – 120 – 5 – C18 AQ («Bischoff Analysetechnik und Geräte GmbH», Германия), що має ефективність не менше 5000 теоретичних тарілок.

Елюювання – градієнтне, виконують 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 виконують 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 контролюють шляхом хроматографування спеціального контрольного багатокомпонентного розчину [1].

Визначення зопіклону можна проводити як за незмінним препаратом, так і за продуктом його гідролізу в лужному середовищі – 2-аміно-5-хлорпіридином, що утворюється також при лужному гідролізі метаболітів зопіклону. Попередні дослідження свідчать, що процес лужного гідролізу відбувається кількісно.

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

(розчин 6 та 7 відповідно, концентрація 10 та 20 мкг/мл). У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносять 10,00 мл розчину 6 та доводять об'єм розчину до позначки розчинником (розчин 8, концентрація 1 мкг/мл).

Розчини зопіклону та 2-аміно-5-хлорпіридину, та 3, 4, 5, 6 і 8 хроматографують за вищезазначених умов; об'єм проби становить 2 мкл.

За отриманими даними будують градувальні графіки та розраховують рівняння лінійної залежності площі піку від концентрації речовини 1 та 2 відповідно.

Для прямого визначення зопіклону 1,00 мл зазначеного елюату (V<sub>4</sub>) змішують з 1,00 мл води очищеної та хроматографують за вищезазначених умов; об'єм проби становить 2 мкл.

Для визначення зопіклону за 2-аміно-5-хлорпіридином в мірну колбу місткістю 25,0 мл (V<sub>5</sub>) вносять 5,00 мл зазначеного елюату (V<sub>4</sub>) та додають 1 мл 10% розчину гідроксиду натрію, через 2 хв доводять об'єм розчину до позначки сумішшю 0,01 М розчину кислоти хлористоводневої та води (1:1). Хроматографування отриманого розчину проводять у вищезазначених умовах; об'єм проби становить 2 мкл.

Ідентифікацію зопіклону проводять за основними хроматографічними параметрами зопіклону та 2-аміно-5-хлорпіридину – абсолютними часом та об'ємом утримування і спектральними характеристиками R (табл. 2).

Таблиця 2

**Основні хроматографічні параметри зопіклону  
при визначенні методом ВЕРХ**

Речовина	t <sub>R</sub>	V <sub>R</sub>	R (S <sub>x</sub> / S <sub>210</sub> )										
			210нм	220нм	230нм	240нм	250нм	260нм	280нм	300нм			
Зопіклон	13,738	1373,8	1,0000	0,9837	0,6383	0,2167	0,2058	0,2801	0,6231	1,0756			
2-Аміно-5-хлорпіридин	7,065	706,5	1,0000	0,2829	0,6686	1,0426	0,3489	0,0298	0,1068	0,3254			

Методики дозволяють виявити до 2 нг зопіклону в пробі.

## ВИСНОВКИ

Застосування запропонованих методик дозволить ефективно, експресно та специфічно ідентифікувати і кількісно визначити зопіклон у витяжках із об'єктів біологічного походження у випадках гострих та смертельних отруєнь.

Запропоновані методики ідентифікації та кількісного визначення не дозволяють виявити зопіклон при прийомі середньої терапевтичної дози.

Крім того, проведенню аналізу не заважає наявність в біологічному матеріалі інших лікарських засобів.

Експерт може дозволити собі обрати методику кількісного визначення зопіклону залежно від наявності у нього відповідного обладнання та мети дослідження.

При прямому визначенні концентрацію зопіклону в розчині ( $C_1$ , мкг / мл) розраховують за допомогою градуального графіка (1) або за відповідним рівнянням лінійної залежності оптичної густини розчину від його концентрації [5].

Концентрацію зопіклону в розчині ( $C_2$ , мкг / мл) при визначенні за 2-аміно-5-хлорпіридином розраховують за допомогою рівняння прямої (2) та коефіцієнта перерахунку 2-аміно-5-хлорпіридину на зопіклон, що дорівнює 3,024 (М. м. зопіклону / М. м. 2-аміно-5-хлорпіридину).

Кількість зопіклону в наважці біологічного матеріалу  $X_1$  та  $X_2$  (мкг / 10 г) розраховують за формулами:

$$X_1 = \frac{C_1 \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot 2}{V_2 \cdot V_4},$$

де:  $C_1$  – концентрація зопіклону в розчині, що аналізується, мкг / мл;

$V_1$  – об'єм хлороформної витяжки, що отримано із наважки біологічного матеріалу, мл;

$V_2$  – об'єм хлороформної витяжки, що взято для аналізу, мл;

$V_3$  – об'єм отриманого елюату, мл;

$V_4$  – об'єм отриманого елюату, що взято для аналізу, мл;

2 – коефіцієнт розведення.

$$X_2 = \frac{C_2 \cdot K \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot V_5}{V_2 \cdot V_4},$$

де:  $C_2$  – концентрація зопіклону в розчині, що аналізується, мкг / мл;

$K$  – коефіцієнт перерахунку 2-аміно-5-хлорпіридину на зопіклон, що дорівнює 3,024;

$V_1$  – об'єм хлороформної витяжки, що отримано із наважки біологічного матеріалу, мл;

$V_2$  – об'єм хлороформної витяжки, що взято для аналізу, мл;

$V_3$  – об'єм отриманого елюату, мл;

$V_4$  – об'єм отриманого елюату, що взято для аналізу, мл;

$V_5$  – об'єм суміші елюат – розчинник, що аналізується, мл.

За необхідності об'єм проби може бути збільшений до 100 мкл.

Виявити зопіклон при прийомі середньої терапевтичної дози за допомогою запропонованих методик ідентифікації та кількісного визначення не можливо.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Барам Г.И., Рейхарт Д.В., Гольдберг Е.Д. и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2003. – Т. 135. – №1. – С. 75-79.
2. Болотов В.В., Клименко Л.Ю. // Вісник фармації. – 2004. – №4 (40). – С. 15-19.
3. Болотов В.В., Клименко Л.Ю. // Журнал органічної та фармацевтичної хімії. – 2005. – Т. 3. – Вип. 1 (9). – С. 65-69.
4. Болотов В.В., Клименко Л.Ю., Іванчук І.М. // Вісник фармації. – 2005. – №2 (42). – С. 7-11.
5. Болотов В.В., Клименко Л.Ю. // Журнал органічної та фармацевтичної хімії. – 2005. – Т. 3. – Вип. 4 (12). – С. 77-81.
6. Крамаренко В.Ф. Токсикологическая химия. – К.: Вища школа, 1989. – 429 с.
7. Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals body fluids and postmortem material. – London: The Pharm. Press, 1986. – 1200 p.

## ЗМІСТ

Вступ .....	3
I. Методики ізольовання зопіклону із біологічного матеріалу .....	4
Методика ізольовання зопіклону хлороформом.....	4
Методика ізольовання зопіклону із крові .....	5
Методика ізольовання зопіклону із сечі.....	5
II. Методики ідентифікації та кількісного визначення зопіклону .....	7
Методика ідентифікації зопіклону методом ТПХ.....	7
Методика ТПХ-очищення витяжок із біологічного матеріалу .....	10
УФ-спектрофотометрична методика кількісного визначення зопіклону .....	11
Екстракційно-фотометрична методика кількісного визначення зопіклону .....	12
Методика ідентифікації та кількісного визначення зопіклону методом ВЕРХ .....	14
Висновки .....	17
Література .....	18

*Наукове видання*

# **ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ НА ЗОПІКЛОН МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ**

Відповідальний за випуск *О.М. Коменко*

Підписано до друку 02.02.2007. Формат 60x84 <sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Папір офсетний.  
Гарнітура Times ET. Друк ризо. Умов. друк. арк. 1,25.  
Обл.-вид. арк. 1,75. Тираж 500 прим.

Видавництво Національного фармацевтичного університету.  
Україна, 61002, Харків, вул. Пушкінська, 53.  
Свідчення серії ДК № 33 від 04.04.2000.

Віддруковано з оригінал-макету на ЛП "Петрова".  
Україна, 61144, Харків, вул. Гвардійців Широнінців, 79в, к. 137.