УДК 340.67:543:615.214

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРОЦЕССОВ БИОДЕГРАДАЦИИ НА ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗОЛПИДЕМА В МОЧЕ

Крылова Е.А., Хомов Ю.А.

ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия», Пермь, Россия (614000, г. Пермь, ул. Полевая, 2), hdu59@mail.ru

В результате проведенных исследований определены оптимальные условия анализа золпидема в моче со значительными гнилостными изменениями. Изолирование проведено прямой жидкостно-жидкостной экстракцией метиленхлоридом при pH 8. Разработаны способы детектирования и количественного определения золпидема в экстрактах из мочи с различными сроками и условиями хранения, с использованием тонкослойной хроматографии (ТСХ), УФ-спектрофотометрии. Показано, что использование ТСХ обеспечивает необходимые условия для последующего УФ-спектрофотометрического определения при всех исследованных сроках и условиях хранения. По результатам количественного определения золпидема в моче при различных сроках и условиях хранения выявлено, что золпидем сохраняется в незаконсервированной моче при замораживании проб (-18 °С) не менее 12 месяцев, при снижении концентрации вещества до 25%, что обеспечивает возможность проведения исследования при переэкспертизе.

Ключевые слова: золпидем, моча с различными сроками хранения, экстракция, ТСХ, УФ-спектрометрия.

THE INVESTIGATION OF THE INFLUENCE OF BIODEGRADATION PROCESSES ON DETERMINATION OF ZOLPIDEM IN URINE

Krylova E.A., Khomov Y.A.

Perm state pharmaceutical academy, Perm, Russia (614000, Perm, Polevaya street, 2), hdu59@mail.ru

The optimal conditions of the analysis of zolpidem in urine with significance putrid transformations were determined. The isolation was carried out by direct liquid-liquid extraction by methylenchloride at pH 8. The procedures of detection and quantitative determination of zolpidem in extracts from urine with different times and conditions of storage with the help of Thin Layer Chromatography (TLC) and Ultraviolet Spectrometry (US) were developed. It had been shown that the use of TLC provides necessary conditions for further UV-spectrometric determination at all studied times and conditions of storage. It was revealed from the results of quantitative determination of zolpidem in extracts from urine with different times and conditions of storage that zolpidem had been determined in native urine at freezing of samples (-18 °C) during not less than 12 month. It had been observed that reduction of concentration of the substance comprises up to a 25%. It raises the possibility of leading of the study in case of repeated examination.

Key words: zolpidem, urine with different times of storage, extraction, TLC, Ultraviolet Spectrometry.

Анализ биологических жидкостей (особенно мочи) имеет важное значение и широко применяется для диагностики отравлений и злоупотреблений наркотическими и другими лекарственными веществами.

При химико-токсикологических анализах и судебно-химических экспертизах не редки случаи исследования биологических жидкостей со значительными гнилостными изменениями (повторное исследование, перевозка объектов анализа). Анализ таких объектов затруднителен. Выделяющиеся продукты бактериального распада и энзиматических процессов увеличивают количество и состав балластных веществ, причём их характер зависит от сроков, условий и способов хранения. Так, мешающие концентрации птомаинов

(продуктов белкового распада) могут встречаться уже через пять дней, если объект был оставлен в тепле или же хранился при +4 °С. Присутствие этих веществ влияет на достоверность результатов анализа, ограничивает возможность точного количественного определения. Поэтому очистке токсических веществ, выделенных из мочи, особенно подвергшейся биодеградации, придаётся едва ли меньшее значение, чем изолированию. После изолирования чаще всего жидкость-жидкостной экстракции при различных значениях pH среды используется приём осаждения пептидов с последующим фильтрованием, что связано с потерями анализируемых веществ. Наиболее целесообразным следует считать для устранения фонового влияния балластных веществ использование ТСХ не только для очистки, но и для разделения и первичной идентификации токсических соединений [1; 4].

Целью исследования было выяснение влияния продуктов гнилостного разложения на определение золпидема в моче при различных сроках и условиях хранения от 5 дней до 12 месяцев (1 год является предельным сроком хранения объектов судебно-химического анализа) [2]. Данных об изучении влияния процессов биодеградации на определение золпидема в моче в доступной литературе нам встретить не удалось.

С целью выяснения влияния продуктов биодеградации на доказательство золпидема были поставлены серии опытов по исследованию образцов мочи, после добавления 1 мг исследуемого вещества, которые подвергали хранению в склянках с завинчивающейся пробкой в холодильнике при +4 °С и в морозильной камере. Каждая серия сопровождалась постановкой контрольных проб (моча, не содержащая золпидема), подвергнутых хранению в тех же условиях.

Выделение экстрактивных веществ из контрольных проб и изолирование золпидема из затравленных проб проводили по методикам, разработанным ранее для исследования биологических жидкостей без гнилостных изменений, прямой дробной экстракцией метиленхлоридом при pH 8 с последующим хроматографическим выделением и исследованием элюатов в УФ-области спектра [3; 5].

Изолирование из мочи практически сводилось к двукратной экстракции 15 мл мочи метиленхлоридом из щелочного аммиачного раствора pH 8 порциями по 15 и 10 мл на электровстряхивателе по 10 минут. Извлечения фильтровали через мелкопористый стеклянный фильтр с безводным натрия сульфатом ~ 2 г, объем доводили до метки метиленхлоридом в мерной колбе на 25 мл. Аликвоту не менее 1/5 извлечения испаряли под током холодного воздуха до объема ~ 0,1 мл и количественно наносили в виде полоски на стартовую линию хроматографической пластинки Merck параллельно метчику – стандартному раствору золпидема в хлороформе 1 мг/мл из расчета ~ 15 мкг в пятне. Далее

хроматографировали в системе растворителей: толуол – ацетон – этанол – 25%-ный раствор аммиака 45 : 45 : 7,5 : 2,5.

Обнаружение золпидема на хроматограмме осуществляли УФ-детектированием, далее реактивом Драгендорфа. При экспонировании в УФ – 254 нм золпидем дает зоны темно-фиолетового цвета, при 365 нм наблюдается флуоресценция сиреневого цвета. Продукты разложения флуоресценции не дают. После обработки реактивом Драгендорфа в зонах расположения исследуемого соединения наблюдались пятна красновато-оранжевого цвета.

Исследования показали, что хроматографическая методика позволяет провести четкое разделение золпидема от его метаболитов и отделение их от соэкстрактивных веществ, способных обнаруживаться реактивом Драгендорфа.

Соэкстрактивные эндогенные вещества мочи, подвергшейся путрификации, находятся вне зоны расположения анализируемого вещества (Rf соэкстрактивных веществ 0,12-0,19) и не оказывают заметного влияния на обнаружение золпидема, давая дополнительные зоны окрашивания на стартовой линии при исследовании мочи только длительных сроков хранения (более 3 месяцев). Для количественной оценки проводили элюирование зоны золпидема с пластинки (после хроматографирования 1/2 части извлечения) 5 мл 0,1М раствора хлористоводородной кислоты и элюаты исследовали УФ-спектрофотометрически в 1 см кварцевых кюветах при 295 нм [6].

Данные, полученные при качественно и количественном определении контрольных проб мочи при различных сроках и условиях хранения, приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты качественного и количественного исследования контрольных проб мочи при различных сроках и условиях хранения

№	Сроки хранения, дней	Условия хранения	Кач. анализ при ХТС		D элюата из зон расположения золпидема при 295 нм
			УФ 365 нм, флуорес-ценция	р-в Драгендорфа (по Молдаверу), окрашивание	
1.	5	+4 °С	не набл.	не набл.	0,0009
		замораживание	не набл.	не набл.	0,0006
2.	60	+4 °С	не набл.	не набл.	0,0019
		замораживание	не набл.	не набл.	0,0004
3.	180	замораживание	не набл.	не набл.	0,0002
4.	300	замораживание	не набл.	не набл.	0,0002
5.	369	замораживание	не набл.	не набл.	0,0002

Как видно из данных таблицы 1, использование хроматографического приема очистки обеспечило необходимые условия для достоверного УФ-спектрофотометрического анализа. Таким образом, фон, создаваемый соэкстрактивными веществами после ТСХ, весьма незначителен, абсорбция практически равна нулю.

При исследовании элюатов проб мочи, содержащих золпидем (модельные опыты) в УФ-области, были получены характерные для золпидема спектры, абсолютно идентичные спектрам самого стандартного раствора золпидема.

Результаты количественного определения золпидема в моче (после добавления к 15 мл объекта 1 мг исследуемого вещества во всех модельных опытах) при различных сроках и условиях хранения приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты количественного определения золпидема в моче при различных сроках и условиях хранения (n=3)

Сроки хранения, дней	Условия хранения	Метрологические характеристики				
		$\overline{X}$	S	$S_{\overline{X}}$	ε_α	E
5	+4 °С	90,34	0,61	0,35	1,51	1,67
	замора-живание	93,38	0,65	0,38	1,63	1,75
60	+4 °С	78,03	1,16	0,67	2,88	3,69
	замора-живание	86,29	2,25	1,30	5,59	6,48
180	замора-живание	75,83	2,62	1,51	6,50	8,57
300	замора-живание	51,70	1,48	0,85	3,66	7,08
369	замора-живание	25,77	0,52	0,30	1,29	5,00

Как видно из данных таблицы 2, золпидем сохраняется в незаконсервированной моче при замораживании проб не менее 12 месяцев. По мере хранения происходит снижение концентрации исследуемого вещества. При замораживании проб снижение концентрации вещества составляет до 26% в год. Хранение при +4 °С дает смещение pH среды объекта до 10–12, что может приводить к щелочному гидролизу и частичной деструкции определяемого вещества.

Выводы

1. Изучено влияние процессов биодеградации на обнаружение и определение золпидема в моче при различных сроках и условиях хранения.

2. Установлено, что при исследовании гнилостно изменённых объектов только использование тонкослойной хроматографии даёт возможность достичь необходимой степени чистоты вещества для получения достоверных результатов УФ-спектрофотометрического определения при всех исследованных сроках и условиях хранения мочи.

3. Показано, что золпидем сохраняется в незаконсервированной моче при замораживании проб в холодильной камере не менее 12 месяцев. Снижение концентрации вещества в этом случае составляет 25%. При хранении в условиях +4 °С наблюдается смещение pH среды до 10–12, что может приводить к щелочному гидролизу и более быстрой деструкции лабильного определяемого вещества.

Список литературы

1. Исследования по обнаружению золпидема при химико-токсикологических анализах / Ю.А. Хомов [и др.] // Вестник ПГФА. Научн.-практич. журнал. Пермь. – 2007. – № 2 – С. 187-190.
2. «Об утверждении инструкции по организации и производству экспертных исследований в бюро судебно-медицинской экспертизы». Приказ МЗ РФ от 24 апреля 2003 г. № 161.
3. Химико-токсикологический анализ золпидема / Ю.А. Хомов [и др.] // Вестник РУДН, сер. Медицина. – 2009. – № 4. – С. 469-473.
4. Хомов Ю.А. Варианты высокоэффективной тонкослойной хроматографии в анализе золпидема / Ю.А. Хомов, Н.В. Кокшарова, Е.И. Пантелеева // Новая технологическая платформа биомедицинских исследований (биология, здравоохранение, фармация) : мат. науч.-практ. конф. – Ростов н/Д : Изд-во ЮНЦ РАН, 2006. – С. 101.
5. Хомов Ю.А. Изолирование, обнаружение и количественное определение золпидема в биологических жидкостях / Ю.А. Хомов, Е.А. Крылова, Е.И. Егорова // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 2. – URL: www.science-education.ru/102-5868 (дата обращения: 28.03.2012).
6. Хомов Ю.А. Количественное определение золпидема в биологических жидкостях с применением метода УФ-спектрофотометрии / Ю.А. Хомов, Е.И. Егорова, Н.В. Кокшарова // Рос. науч.-практ. конф. ПГФА, в рамках 14-й Междунар. выставки «Медицина и здоровье» (13-15 ноября 2008 г., Пермь) : материалы… – Пермь, 2008. – С. 386-389.

Рецензенты:

Михалев А.И., д.фарм.н., профессор, зав. кафедрой биологической химии, ГБОУ ВПО «ПГФА» Минздравсоцразвития, г. Пермь.

Ярыгина Т.И., д.фарм.н., профессор кафедры фармацевтической химии очного факультета, ГБОУ ВПО «ПГФА» Минздравсоцразвития, г. Пермь.