

УДК 615.076

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ Z-ПРЕПАРАТОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ МЕТОДОМ УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

Г.П. Чепурная^{1*}, В.А. Карташов¹, Л.В. Чернова¹

Резюме. В настоящей работе описана методика и приведены экспериментальные данные по определению методом УФ-спектрофотометрии залеплона, золпидема и зопиклона (Z-препаратов), выделенных из ткани печени. Изолирование Z-препаратов проводили с помощью одного из амфифильных растворителей – ацетона, очистку от примесей – путём экстракции *n*-гексаном из кислой среды, для дополнительной очистки использовали метод ТСХ. Идентифицировали Z-препараты путём последовательного применения ТСХ-скрининга и УФ-спектрофотометрии. Для определения количественного содержания исследуемых веществ использовали УФ-спектрофотометрический метод. Установлены параметры и валидационные характеристики метода при исследовании как нативных Z-препаратов, так и выделенных из биологических объектов (линейность, специфичность, робастность, пределы обнаружения и определения).

Ключевые слова: УФ-спектрофотометрия, Z-препараты, валидация, ткань печени.

DEVELOPMENT OF THE TECHNIQUE FOR IDENTIFYING Z-PREPARATIONS IN BIOLOGICAL OBJECTS BY THE METHOD OF UV-SPECTROPHOTOMETRY

G.P. Chepurnaya^{1*}, V.A. Kartashov¹, L.V. Chernova¹

Abstract. In the given article, the technique is described and the experimental data for identifying Zaleplon, Zolpidem and Zopiclone (Z-preparations) by method of UV – spectrophotometry isolated from liver tissue are determined. The isolation of Z-preparations was carried out with one of amphiphilic solvents – acetone; purification of impurities – by *n*-hexane extraction from an acidic medium; TLC was used for additional purification. The Z-preparations were identified by the sequential application of TLC screening and UV-spectrophotometry. The UV-spectrophotometric method was used to determine the quantitative content of the analysis substances. The parameters and validation characteristics of the method were determined, both in the study of native Z-preparations and those isolated from biological objects (linearity, specificity, robustness, and detection limits).

Keywords: UV-spectrophotometry, Z-preparations, validation, liver tissue.

¹ – ФГБОУ ВО «Майкопский государственный технологический университет», медицинский институт, фармацевтический факультет, 385000, Россия, Республика Адыгея, г. Майкоп, ул. Советская, 197-а

¹ – Maykop State Technological University Pharmaceutical Faculty, Department of Pharmacy, 197-a, Sovetskaya str., Maykop, 385000, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: velichkogalina@yandex.ru,

Тел.: +7 (918) 258 45 04

ВВЕДЕНИЕ

Z-препараты (залеплон, золпидем и зопиклон) являются представителями снотворных лекарственных средств третьего поколения и применяются в медицине для лечения бессонницы. Несмотря на преимущества перед снотворными первого и второго поколения, исследуемые лекарственные вещества обладают токсичностью, описаны случаи смертельных и не смертельных отравлений изучаемыми препаратами (например, 1–3). Для установления факта отравления необходимо определение исследуемых веществ в биологических объектах. Для количественного определения и идентификации токсических веществ, выделенных из трупного материала, широко используется метод УФ-спектрофотометрии, который обла-

дает некоторыми преимуществами перед другими методами и особенно удобен при проведении рутинных анализов.

Целью настоящей работы является разработка УФ-спектрофотометрического метода анализа для количественного определения Z-препаратов, выделенных из ткани печени.

Для реализации поставленной цели необходимо было решить следующие задачи: провести исследование растворов стандартных образцов Z-препаратов методом УФ-спектрофотометрии; установить параметры и валидационные характеристики метода; выполнить эксперименты по экстрагированию из ткани печени исследуемых веществ и определить их параметры валидации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования:

- «Имован», таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 7,5 мг, производства «САНОФИ-АВЕНТИС ФРАНС», Франция, серия 2J56C, срок годности до 12.2015.
- «Ивадал», таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 10 мг, производства «САНОФИ-АВЕНТИС ФРАНС», Франция, серия 2T046, срок годности до 06.2016.
- «Анданте», капсулы 10 мг, твердые желатиновые капсулы размером № 2, производства ОАО «Гедеон Рихтер», Будапешт, Венгрия, серия T47608E, срок годности до 17.2019.

Остальные реактивы были аналитического качества:

- Диметилкетон (ацетон) (ч.д.а., 1 л, ГОСТ 2603-79).
- Гексан (х.ч., 1 л, ТУ 2631-003-05807999-98).
- Трихлорметан (хлороформ) (х.ч., 1,5 кг, ТУ 2631-066-44493179-01).
- Натрий сернокислый, безводный (ч.д.а., 1 кг, ОКП 26 2112 0832 09).
- Приготовление реактива Драгендорфа строго по ГФ XI, том 2, с 125.

Поставщик: ЗАО «Вектон», Санкт-Петербург, «Химреактивы» и «Техническая химия».

Лабораторная посуда и оборудование:

- Перемешивающее устройство LS-110 (ЛАБ-ПУ-01). Соответствует требованиям ГОСТ 12.2.003-91. ЗАО «Лабораторное оборудование и приборы», Санкт-Петербург, Россия.
- Центрифуга лабораторная медицинская ОПн-8, соответствует требованиям ТУ5.375-4261-76. ОАО «ТНК «ДАСТАН», Киргизия, Бишкек. ШХ2.779.040 ПС.
- Химическая посуда: флаконы, воронки, делительные воронки, мерные пипетки, химические стаканы.
- Наборы для тонкослойной хроматографии (пластинки марки Sorbfil, ПТСХ-П-В-УФ, ТУ 26-11-17-89, Краснодар, Россия).
- Шестиместная термостатирующая водяная баня LOIPLB-160 (LB-161), соответствует требованиям ГОСТ 12.2.003-91. ЗАО «Лабораторное оборудование и приборы», Санкт-Петербург, Россия.
- Облучатель хроматографический УФС-254/365, соответствует требованиям ТУ 4215-004-16943778-99. ООО «ИМИД», г. Краснодар, Россия.

- Спектрофотометр СФ-2000, соответствует требованиям ГОСТ 15150-69. ЗАО «ОТК СПЕКТР», Санкт-Петербург, Россия.

Идентификация и количественное определение залеплон, золпидема и зопиклона методом УФ-спектрофотометрии

1. Для выполнения предстоящих экспериментов были приготовлены рабочие стандартные растворы исследуемых веществ (РСО). Для этого содержимое капсулы (залеплон) и по одной таблетке (золпидем и зопиклон), содержащие соответственно 10 мг, 10 мг и 7,5 мг действующих веществ, помещали в мерные колбы вместимостью 100 мл. В колбы добавляли по 50 мл этанола и встряхивали на перемешивающем устройстве со скоростью 100 об/мин в течение 6 ч, до полного распада таблеток. Объем растворов доводили этанолом до метки, перемешивали, фильтровали через сухой бумажный фильтр, отбрасывая первые 15 мл. Полученные растворы хранили во флаконах из темного стекла при температуре 5 °С.
2. Для УФ-спектрофотометрического анализа исследуемых веществ приготовленные этанольные растворы залеплон и золпидема разбавляли в два раза. Растворы залеплон, золпидема и зопиклона с концентрациями 5 мкг/мл, 5 мкг/мл и 7,5 мкг/мл спектрофотометрировали с помощью прибора СФ-2000, используя в качестве раствора сравнения этиловый спирт. Спектры абсорбции исследуемых веществ и некоторые параметры приведены на рисунке 1 и в таблице 1.

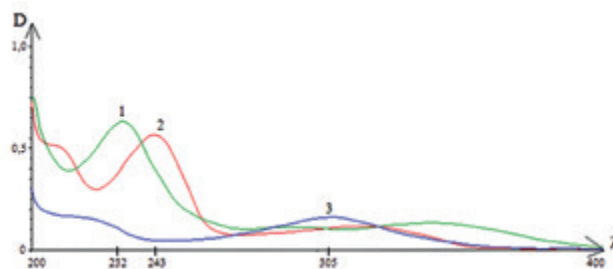


Рисунок 1. Спектры абсорбции залеплон (1), золпидема (2) и зопиклона (3)

Таблица 1.

Параметры УФ-спектрофотометрического анализа исследуемых веществ

Исследуемое вещество	Концентрация, С (мкг/мл)	Длина волны, $\lambda_{\max}$ (нм)	Оптическая плотность, D
Залеплон	5	232	0,632
Золпидем	5	243	0,564
Зопиклон	7,5	305	0,319

Определение валидационных характеристик при исследовании Z-средств методом УФ-спектрофотометрии

С целью установления линейности, пределов обнаружения и количественного определения исследуемых веществ были приготовлены этанольные растворы залеплона и золпидема с концентрациями 10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,625 мкг/мл и зопиклона с концентрациями 30,0; 15,0; 7,5; 3,75; 1,875 и 0,9375 мкг/мл. Полученные растворы спектрофотометрировали в трёх повторностях в диапазоне 200–400 нм. Спектры абсорбции растворов разных концентраций показаны на рисунках 2, 3, 4, а значения оптических плотностей, измеренные для каждого вещества при длинах волн максимального поглощения, представлены в таблице 2. Математическая (статистическая) обработка результатов и расчет валидационных характеристик проводились с использованием программ «Стат. обработка» и Microsoft Excel.

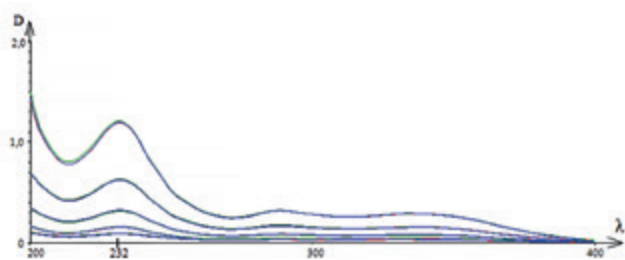


Рисунок 2. Спектры абсорбции раствора залеплона разных концентраций

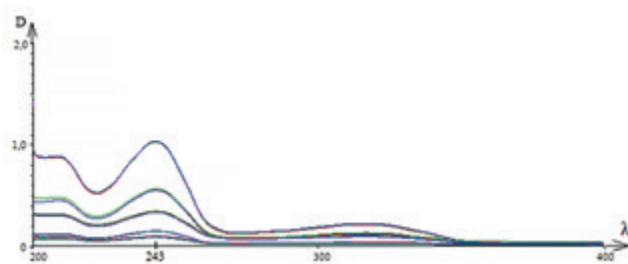


Рисунок 3. Спектры абсорбции раствора золпидема разных концентраций

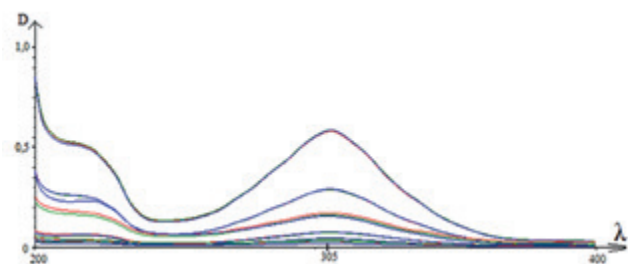


Рисунок 4. Спектры абсорбции раствора зопиклона разных концентраций

Используя полученные данные, были построены калибровочные графики (рисунки 5–7), из которых видно, что в диапазоне всех исследуемых концентраций залеплона, золпидема и зопиклона наблюдается линейная зависимость. Кроме того, по известной формуле (1) были рассчитаны удельные коэффициенты поглощения ($E_{1\text{ см}}^{1\%}$), значения которых соответственно равны: для залеплона – $1268 \pm 0,041$, золпидема – $1050 \pm 0,049$ и зопиклона – $439 \pm 0,115$.

Таблица 2.

Величины оптических плотностей (D) залеплона, золпидема и зопиклона в зависимости от концентрации (n=3, P=95%)

№ п/п	Концентрация, C (мкг/мл)	Залеплон		Золпидем		Зопиклон		
		Оптическая плотность, D	$\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$	Оптическая плотность, D	$\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$	Концентрация, C (мкг/мл)	Оптическая плотность, D	$\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$
1.	10	1,190	1,195±0,015	1,017	1,018±0,080	30	1,160	1,165±0,012
2.		1,202		1,016			1,170	
3.		1,194		1,022			1,166	
1.	5	0,625	0,625±0,007	0,531	0,535±0,010	15	0,577	0,577±0,004
2.		0,628		0,539			0,576	
3.		0,622		0,535			0,579	
1.	2,5	0,317	0,316±0,009	0,283	0,286±0,006	7,5	0,344	0,329±0,032
2.		0,312		0,285			0,324	
3.		0,319		0,288			0,320	
1.	1,25	0,152	0,154±0,005	0,140	0,139±0,005	3,75	0,150	0,150±0,006
2.		0,156		0,137			0,147	
3.		0,153		0,141			0,152	
1.	0,625	0,087	0,088±0,003	0,060	0,056±0,009	1,875	0,080	0,081±0,005
2.		0,089		0,053			0,079	
3.		0,087		0,057			0,083	
1.						0,9375	0,057	0,055±0,014
2.							0,060	
3.							0,049	

$$E_{1\text{ см}}^{1\%} = \frac{D}{\omega \cdot \ell}, \quad (1)$$

где ω – концентрация исследуемого вещества, %; D – оптическая плотность анализируемого раствора; ℓ – длина кюветы, см; $(E_{1\text{ см}}^{1\%})$, – удельный показатель поглощения.

Предел обнаружения (DL) и предел количественного определения (QL) вычисляли, используя формулы (2):

$$DL = \frac{3,3 \cdot SD}{b} \quad QL = \frac{10 \cdot SD}{b}, \quad (2)$$

где SD – стандартное отклонение; b – наклон калибровочной кривой.

Линейная зависимость наблюдается в пределах концентраций 0,625–10,0 мкг/мл для залеплона и золпидема, 0,9375–30,0 мкг/мл – для зопиклона. Коэффициент корреляции для залеплона (r) равен 0,9995, золпидема – 0,9982 и зопиклона – 0,9989. Пределы обнаружения и количественного определения УФ-спектрофотометрическим методом составляют: для залеплона – 0,203 мкг/мл и 0,614 мкг/мл; для золпидема – 0,693 мкг/мл и 2,100 мкг/мл; для зопиклона – 0,902 мкг/мл и 2,733 мкг/мл соответственно. Коэффициент корреляции исследуемых веществ составляет не менее 0,99.

Прецизионность методики количественного определения залеплона, золпидема и зопиклона оценивали путем воспроизведения методики на трех уровнях для каждого препарата в трех повторностях с последующим определением относительного стандартного отклонения. Оценку методики проводили на водных растворах стандартных веществ в течение одного дня и в разные дни. Результаты, представленные в таблицах 3–5, получены в одинаковых условиях в одной лаборатории (один и тот же исполнитель, одно и то же оборудование, один и тот же набор реактивов) в пределах короткого промежутка времени.

Таблица 3.

Результаты повторяемости методики количественного определения залеплона ($n=9$, $P=95\%$)

Номера опытов	Взято (мкг)	Оптическая плотность (D)	Найдено (мкг)	Найдено (%)
1.	10	1,300	9,94	99,38
2.		1,298	9,92	99,23
3.		1,310	10,02	100,15
4.	2,5	0,327	2,49	99,84
5.		0,326	2,48	99,54
6.		0,323	2,47	98,60
7.	0,625	0,082	0,626	100,16
8.		0,081	0,624	99,84
9.		0,080	0,623	99,68
$\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$				99,60 ± 0,386
SD				0,1635
RSD				0,39

Примечание: оптическая плотность стандартного раствора залеплона, содержащего 5 мкг/мл, равна 0,654.

Внутрилабораторную (промежуточную) прецизионность валидируемой методики оценивали в условиях работы одной лаборатории, в разные дни, разными исполнителями, на разном оборудовании (УФ-спектрофотометры СФ-2000 и ПЭ-3000). Результаты представлены в таблице 6.

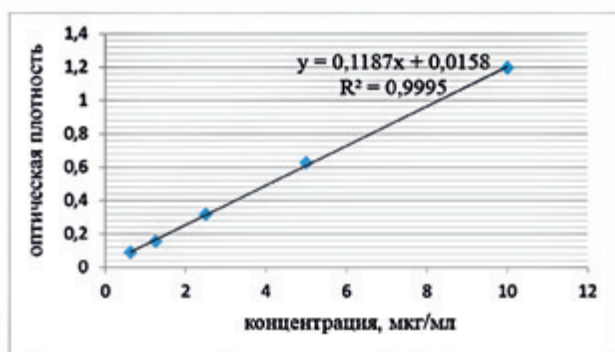


Рисунок 5. График линейной зависимости оптической плотности от концентрации раствора залеплона

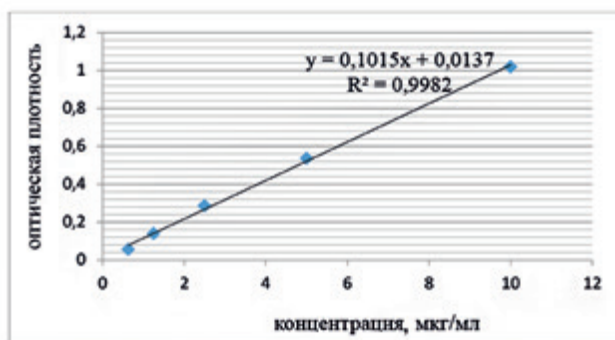


Рисунок 6. График линейной зависимости оптической плотности от концентрации раствора золпидема

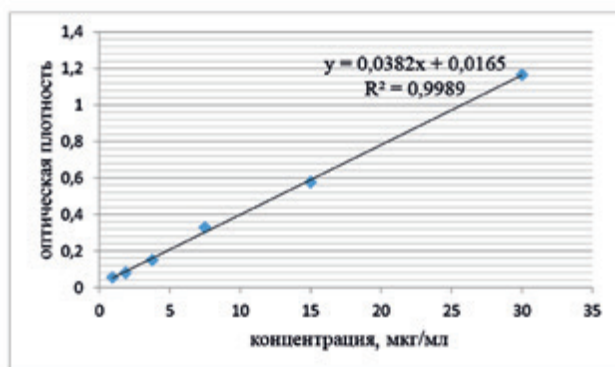


Рисунок 7. График линейной зависимости оптической плотности от концентрации раствора зопиклона

Таблица 4.

Результаты повторяемости методики количественного определения золпидема (n=9, P=95%)

Номера опытов	Взято (мкг)	Оптическая плотность, D	Найдено (мкг)	Найдено (%)
1.	10	1,208	10,02	100,2
2.		1,199	9,94	99,40
3.		1,205	9,99	99,90
4.	2,5	0,299	2,48	99,10
5.		0,301	2,49	99,70
6.		0,298	2,47	98,70
7.	0,625	0,076	0,625	100,00
8.		0,075	0,623	99,68
9.		0,076	0,626	100,16
$\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$				99,64±0,389
SD				0,1650
RSD				0,39

Примечание: оптическая плотность стандартного раствора золпидема, содержащего 5 мкг/мл, равна 0,603.

Таблица 5.

Результаты повторяемости методики количественного определения зопиклона (n=9, P=95%)

Номера опытов	Взято (мкг)	Оптическая плотность, D	Найдено (мкг)	Найдено (%)
1.	30	1,175	29,97	99,90
2.		1,176	30,00	100,00
3.		1,178	30,05	100,17
4.	7,5	0,294	7,50	100,00
5.		0,293	7,47	99,60
6.		0,293	7,47	99,60
7.	1,875	0,074	1,877	100,11
8.		0,073	1,874	99,95
9.		0,073	1,873	99,89
$\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$				99,91±0,157
SD				0,0665
RSD				0,16

Примечание: оптическая плотность стандартного раствора зопиклона, содержащего 15 мкг/мл, равна 0,588.

Полученные результаты (таблицы 5, 6), показали, что отклонение средних величин в единицах оптической плотности и концентрации не превышает 0,5%, что говорит о внутрилабораторной прецизионности методики.

Правильность методики характеризуется отклонением среднего результата определений, выполненных с ее использованием, от значения, принимаемого за истинное. Для оценки правильности методики количественного определения использовали средние результаты, полученные нами и представленные в таблицах 3–6. Среднее значение коэффициента открываемости (R) для залеплона составляет 99,59±0,419, золпидема – 99,58±0,389 и зопиклона – 99,94±0,200, т.е. полученные значения R не выходят за пределы 100±2%.

Таблица 6.

Результаты внутрилабораторной прецизионности методики (n=6, P=95%)

Дни опытов	Взято (мкг)	Оптическая плотность, D	Найдено (мкг)	Найдено (%)
Залеплон				
День 1	10	1,300	9,94	99,38
		1,298	9,92	99,23
		1,310	10,02	100,15
День 2	10	1,299	9,93	99,30
		1,305	9,98	99,80
		1,308	10,00	100,00
$\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$		1,303±0,005	9,97±0,043	99,64±0,411
SD		0,0021	0,0166	0,1598
RSD		0,38	0,43	0,41
Золпидем				
День 1	10	1,208	10,02	100,2
		1,206	10,00	100,0
		1,205	9,99	99,90
День 2	10	1,202	9,97	99,70
		1,207	10,01	100,1
		1,209	10,02	100,2
$\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$		1,206±0,003	10,00±0,020	100,02±0,204
SD		0,0010	0,0079	0,0792
RSD		0,25	0,20	0,20
Зопиклон				
День 1	30	1,175	29,97	99,90
		1,174	29,95	99,83
		1,175	29,97	99,90
День 2	30	1,175	29,97	99,90
		1,176	30,00	100,00
		1,178	30,05	100,17
$\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$		1,175±0,002	29,99±0,037	99,95±0,127
SD		0,0006	0,0145	0,0493
RSD		0,17	0,12	0,13

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение исследуемых веществ в ткани печени

Для изолирования залеплона, золпидема и зопиклона из ткани печени и других биологических объектов мы применили один из амфифильных растворителей – ацетон, который является универсальным и обладает высокой экстрагирующей способностью. В работе В.А. Карташова [4] это было теоретически обосновано и подтверждено на большом экспериментальном материале в модельных опытах, исследованиях на животных, экспертном материале. Учитывая высокую эффективность ацетона, ряд авторов [5–8 и др.] использовали его в качестве экстрагента для изо-

лирования из биологического материала токсических веществ разных химических и фармакологических групп.

Для определения Z-препаратов в ткани печени мы использовали разработанную нами методику, описанную в работах [9–11].

Данные спектрофотометрического анализа исследуемых веществ, выделенных из образцов трупной печени, приведены на рисунках 8–10 и в таблицах 7–9.

Полученные данные показали, что залеплон и золпидем экстрагируются из ткани печени за две ступени и определяются УФ-спектрофотометрическим методом в среднем в количестве 45%, 76% и 48%, соответственно.

Установление линейности, пределов обнаружения и определения Z-препаратов, выделенных из ткани печени

Для установления минимального количества залеплона и других Z-препаратов, которые могут быть выделены из ткани трупной печени по вышеизложен-

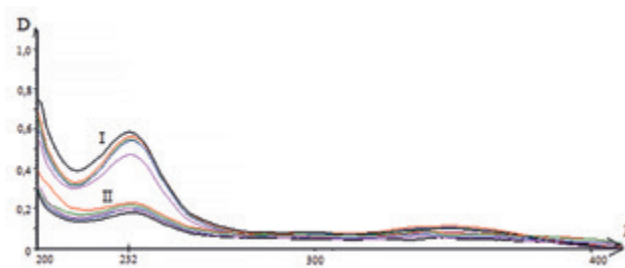


Рисунок 8. Спектр абсорбции залеплона, выделенного из ткани печени:

I, II – ступени экстракции

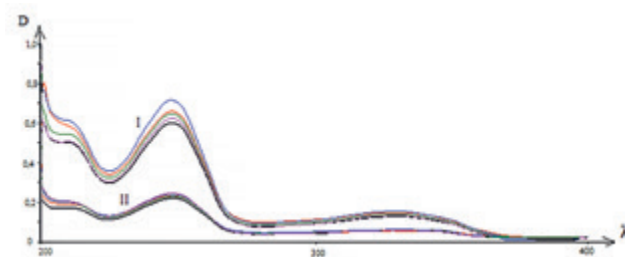


Рисунок 9. Спектр абсорбции золпидема, выделенного из ткани печени:

I, II – ступени экстракции

Таблица 7.

Выход залеплона при экстрагировании из ткани печени (n=5, P=95%)

Номера опытов	1 ступень			2 ступень			Сумма по ступеням	
	Оптическая плотность, D ¹	Выход (мкг)	Выход (%)	Оптическая плотность, D ¹	Выход (мкг)	Выход (%)	Выход (мкг)	Выход (%)
1.	0,514	68,4	34,20	0,210	27,9	13,95	96,3	48,15
2.	0,500	66,5	33,26	0,199	26,5	13,20	93,0	46,46
3.	0,495	65,8	32,93	0,183	24,3	12,19	90,1	45,12
4.	0,533	70,9	35,42	0,166	22,1	11,02	93,0	46,44
5.	0,431	57,3	28,62	0,181	24,1	12,01	81,4	40,63
$\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$	0,495±0,048	65,8±6,39	32,89±3,20	0,188±0,021	25,0±2,81	12,47±1,41	90,8±7,05	45,31±3,69

Примечания: 1 – сухие остатки растворяли в 15,0 мл этанола; 2 – оптическая плотность рабочего стандартного раствора залеплона, содержащего 5 мкг/мл, равна 0,564.

Таблица 8.

Выход золпидема при экстрагировании из ткани печени (n=5, P= 95%)

Номера опытов	1 ступень			2 ступень			Сумма по ступеням		
	Оптическая плотность, D ¹	Выход (мкг)	Выход (%)	Оптическая плотность, D ¹	Выход (мкг)	Выход (%)	Выход (мкг)	Выход (%)	Выход (%) ²
1.	0,772	83,01	41,49	0,382	41,08	20,50	124,09	61,99	76,87
2.	0,758	83,51	40,72	0,375	40,32	20,13	123,83	60,85	75,45
3.	0,852	91,61	45,78	0,385	41,40	20,69	133,01	66,47	82,43
4.	0,695	74,73	37,34	0,362	38,92	19,43	113,65	56,77	70,39
5.	0,704	75,70	37,85	0,417	44,84	22,43	120,54	60,28	74,75
$\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$	0,756±0,06	81,71±8,52	40,64±3,22	0,384±0,02	41,31±2,72	20,64±1,06	123,02±8,69	61,28±3,33	75,98±4,14

Примечания: 1 – сухие остатки растворяли в 10 мл этанола; 2 – в пересчете на основание – молекулярная масса золпидема тартрата – 764,88, основания – 616,88; 3 – оптическая плотность рабочего стандартного раствора золпидема, содержащего 5 мкг/мл, равна 465.

Таблица 9.

Выход зопиклона при экстрагировании из ткани печени (n=5, P=95%)

Номера опытов	1 ступень			2 ступень			Сумма по ступеням	
	Оптическая плотность, D ¹	Выход (мкг)	Выход (%)	Оптическая плотность, D ¹	Выход (мкг)	Выход (%)	Выход (мкг)	Выход (%)
1.	0,402	102,55	34,18	0,157	40,05	13,35	142,60	47,53
2.	0,415	105,87	35,29	0,146	37,24	12,41	143,11	47,70
3.	0,405	103,32	34,44	0,197	50,26	16,75	153,58	51,20
4.	0,412	105,10	35,03	0,164	41,84	13,95	119,05	48,97
5.	0,408	104,08	34,69	0,143	36,48	12,16	140,56	46,87
$\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$	0,408 $\pm$ 0,006	104,18 $\pm$ 1,66	34,73 $\pm$ 0,55	0,161 $\pm$ 0,027	41,17 $\pm$ 6,86	13,72 $\pm$ 2,29	139,78 $\pm$ 15,72	48,45 $\pm$ 2,14

Примечания: 1 – сухие остатки растворяли в 10 мл этанола; 2 – оптическая плотность рабочего стандартного раствора зопиклона, содержащего 15 мкг/мл, равна 0,588.

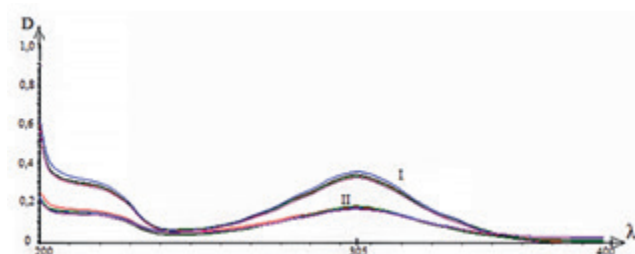


Рисунок 10. Спектры абсорбции зопиклона, выделенного из ткани печени:

I, II – ступени экстракции

ной методике, и определения валидационных характеристик были выполнены эксперименты, описанные ниже.

Экстрагирование залеплона и золпидема из 5,0 г измельченной ткани печени, содержащей по 100; 50; 25; 10; 5 мкг, а в случае зопиклона – 300; 150; 75; 30 мкг проводили, выполняя по 5 параллельных определений и одному холостому для каждой указанной концентрации. Были выполнены две серии опытов, отличающиеся тем, что в первой серии исследуемые вещества детектировали на хроматограммах по флуоресценции и элюировали этанолом, а во второй серии – обнаружение залеплона и золпидема проводили путем обработки реактивом Драгендорфа и элюировали их путем экстракции хлороформом из щелочной среды. Результаты проведенных экспериментов представлены на рисунках 11–13 и в таблицах 10–12. При исследовании залеплона, содержащегося в количестве 5 мкг в образце, он обнаруживался на хроматограмме, но не был количественно определен спектрофотометрическим методом.

Полученные в результате проведенных экспериментов данные использованы нами для установления линейности, пределов обнаружения и определе-

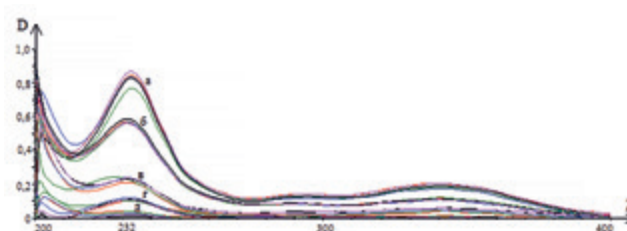


Рисунок 11. Спектры абсорбции залеплона, выделенного из 5,0 г ткани печени, содержащей 100 мкг (а), 50 мкг (б), 25 мкг (в), 10 мкг (г) и 5 мкг (д); 2 серия опытов

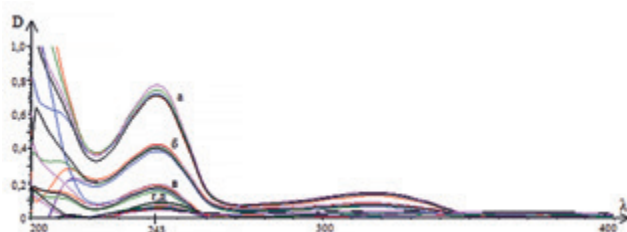


Рисунок 12. Спектры абсорбции золпидема, выделенного из 5,0 г ткани печени, содержащей 100 мкг (а), 50 мкг (б), 25 мкг (в), 10 мкг (г) и 5 мкг (д); 2 серия опытов

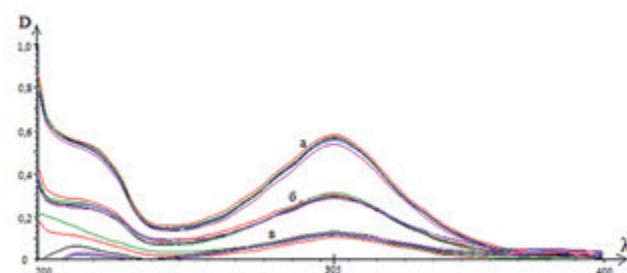


Рисунок 13. Спектры абсорбции зопиклона, выделенного из ткани печени, содержащей 150 мкг (а), 75 мкг (б) и 30 мкг (в) в пробе; 1 серия опытов

Таблица 10.

Данные по экстрагированию из ткани печени разных количеств залеplона (n=5, P=95%)

Количество залеplона в 5 г печени (мкг)	1 серия опытов			2 серия опытов		
	Оптическая плотность, D	Выход (мкг)	Выход (%)	Оптическая плотность, D	Выход (мкг)	Выход (%)
100 ¹	0,528	48,37	48,37	0,475	43,50	43,50
	0,490	44,89	44,89	0,432	39,56	39,56
	0,526	48,19	48,19	0,466	42,63	42,63
	0,522	47,78	47,78	0,487	43,77	43,77
	0,541	49,51	49,51	0,489	44,78	44,78
$\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$	0,521±0,024	47,75±2,14	47,75±2,14	0,468±0,054	42,85±2,48	42,85±2,48
50	0,570	26,10	52,20	0,491	22,48	44,96
	0,564	25,82	51,64	0,518	23,72	47,44
	0,566	25,92	51,84	0,496	22,71	45,42
	0,585	26,79	53,58	0,513	23,49	46,98
	0,560	25,64	51,28	0,504	23,08	46,16
$\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$	0,569±0,012	26,05±0,55	52,11±1,10	0,504±0,014	23,10±0,64	46,19±1,29
25	0,211	9,66	38,64	0,229	10,49	41,96
	0,230	10,53	42,12	0,211	9,66	38,64
	0,237	10,85	43,40	0,220	10,07	40,28
	0,231	10,58	42,32	0,214	9,80	39,20
	0,236	10,81	43,24	0,224	10,26	41,04
$\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$	0,229±0,013	10,49±0,60	41,94±2,40	0,220±0,009	10,06±0,42	40,22±1,67
10	0,103	4,72	47,20	0,114	5,22	52,20
	0,102	4,67	46,70	0,105	4,81	48,08
	0,120	5,49	54,95	0,110	5,04	50,40
	0,110	5,04	50,40	0,107	4,90	49,00
	0,107	4,90	49,00	0,109	5,00	50,00
$\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$	0,108±0,009	4,96±0,41	49,65±4,11	0,109±0,004	4,99±0,19	49,94±1,93
5	0,040	1,83	36,60	–	–	–
	0,036	1,65	32,97	–	–	–
	0,026	1,19	23,80	–	–	–
	0,011	0,50	10,00	–	–	–
	0,020	0,92	18,40	–	–	–
$\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$	0,027±0,014	1,22±0,67	24,35±13,42	–	–	–
$\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$			47,86±6,89			44,80±6,69

Примечания: 1 – сухие остатки растворяли в 10,0 мл этанола; 2 – оптическая плотность рабочего стандартного раствора залеplона, содержащего 10 мкг/мл, равна 1,092.

ния при исследовании разных количеств исследуемых веществ, выделенных из ткани печени по предлагаемой методике. Построены калибровочные графики, рассчитаны уравнения калибровочных кривых, из которых видно, что линейная зависимость величины оптической плотности от количества залеplона и золпидема наблюдается при их содержании 5–100 мкг, золпидема – в пределах 30–300 мкг в 5,0 г ткани печени (рисунки 13–15).

Рассчитаны пределы обнаружения исследуемых веществ, которые составляют для залеplона 3,3 мкг, золпидема – 0,79 мкг, золпидема – 3,4 мкг, а также пре-

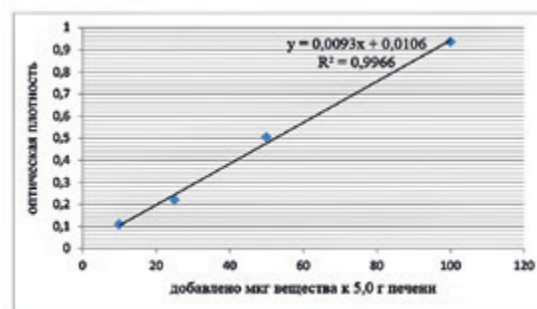


Рисунок 14. График линейной зависимости оптической плотности раствора от количества залеplона, добавленного к трупной печени

Таблица 11.

Данные по экстрагированию из ткани печени разных количеств золпидема (n=5, P=95%)

Количество залеплона в 5 г печени (мкг)	1 серия опытов			2 серия опытов		
	Оптическая плотность, D	Выход (мкг)	Выход (%) ²	Оптическая плотность, D	Выход (мкг)	Выход (%) ²
100 ¹	0,556	55,82	69,21	0,639	64,16	79,56
	0,584	58,63	72,70	0,663	66,57	82,55
	0,598	60,04	74,45	0,556	55,82	69,22
	0,589	59,14	73,33	0,623	62,55	77,56
	0,605	60,74	75,32	0,584	58,63	72,70
$\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$	0,586±0,02	58,87±2,35	73,02±2,92	0,613±0,053	61,55±5,36	76,32±6,65
50	0,620	31,12	77,18	0,590	29,62	73,37
	0,598	30,02	74,45	0,567	28,46	70,54
	0,559	28,06	69,59	0,670	33,63	83,48
	0,584	29,32	72,71	0,604	30,32	74,98
	0,613	30,77	76,31	0,626	31,43	78,02
$\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$	0,595±0,03	29,86±1,52	74,05±3,77	0,611±0,049	30,69±2,44	76,12±6,06
25	0,297	14,91	73,95	0,322	16,16	80,05
	0,277	13,91	68,99	0,295	14,81	73,46
	0,305	15,31	75,94	0,323	16,21	80,40
	0,299	15,01	74,45	0,300	15,06	74,70
	0,318	15,96	79,16	0,290	14,56	72,22
$\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$	0,299±0,02	15,02±0,92	74,50±4,59	0,306±0,019	15,36±0,96	76,19±4,77
10	0,122	6,12	75,89	0,123	6,17	76,51
	0,125	6,28	77,87	0,120	6,02	74,65
	0,124	6,22	77,13	0,125	6,28	77,87
	0,123	6,17	76,51	0,122	6,12	75,89
	0,127	6,38	79,11	0,139	6,98	86,55
$\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$	0,124±0,01	6,23±0,13	77,30±1,55	0,123±0,012	6,31±0,48	78,29±5,92
5	0,059	2,96	73,41	0,062	3,11	77,13
	0,071	3,56	88,29	0,060	3,01	74,65
	0,064	3,21	79,61	0,052	2,61	64,73
	0,063	3,16	78,37	0,071	3,56	88,29
	0,053	2,66	65,97	0,066	3,31	82,09
$\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$	0,062±0,01	3,11±0,41	77,13±10,23	0,062±0,001	3,12±0,44	77,38±10,92
$\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$			75,51±2,00			76,86±1,18

Примечания: 1 – сухие остатки растворяли в 10,0 мл этанола; 2 – в пересчете на основание; 3 – оптическая плотность рабочего стандартного раствора золпидема, содержащего 10 мкг/мл, равна 0,996.

дела количественного определения, равные соответственно 9,8 мкг, 2,3 мкг, 10,2 мкг при исследовании 5,0 г ткани печени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных экспериментов разработан УФ-спектрофотометрический метод

определения залеплона, золпидема и зопиклона. Установлены параметры и валидационные характеристики Z-препаратов при исследовании как стандартных растворов, так и веществ, выделенных из трупной печени. Полученные результаты позволяют рекомендовать метод УФ-СФМ для идентификации и количественного определения Z-препаратов в ткани печени по разработанной нами методике.

Таблица 12.

Данные по экстрагированию из ткани печени разных количеств зопиклона (n=5, P=95%)

Количество зопиклона в 5 г печени (мкг)	Оптическая плотность, D	Выход (мкг)	Выход (%)
300 ¹	0,559	142,60	47,53
	0,561	143,11	47,70
	0,602	153,57	51,19
	0,576	146,94	48,98
	0,551	140,56	46,85
$\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$	0,570±0,025	145,36±6,39	48,45±2,13
150	0,579	73,85	49,23
	0,568	72,45	48,30
	0,555	70,79	47,19
	0,566	72,19	48,13
	0,536	68,37	45,57
$\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$	0,561±0,020	71,53±2,58	47,69±1,72
75	0,303	38,65	51,53
	0,310	39,54	52,72
	0,296	37,76	50,35
	0,291	37,12	49,49
	0,285	36,35	48,47
$\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$	0,297±0,012	37,88±1,56	50,51±2,08
30	0,104	13,27	44,23
	0,116	14,80	49,33
	0,114	14,54	48,47
	0,128	16,33	54,43
	0,121	15,43	51,43
$\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$	0,117±0,011	14,87±1,41	49,58±4,69
$\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$			49,06±1,98

Примечания: 1 – сухие остатки растворяли в 10,0 мл этанола; 2 – оптическая плотность рабочего стандартного раствора зопиклона, содержащего 15 мкг, равна 0,588.

ЛИТЕРАТУРА

1. P.J. Boniface, S.G.G. Russel. Two Cases of Fatal Zopiclone Overdose // J. Analyt. Toxicol. 1996. V. 20. P. 131–133.
2. A.W. Jonas, A. Holgrem. Concentrations of zolpidem and zopiclone in venous blood samples from impaired drivers compared with femoral blood forensic autopsies // Forensic Sci Intern. 2012. V. 222. № 1. P. 118–123.
3. М.Г. Мусина, В.В. Килин, А.А. Мингазов. Смертельное отравление залеплоном // Проблемы экспертизы в медицине. 2010. № 1(2). С. 45–46.
4. В.А. Карташов. Изучение вопросов экстракции лекарственных веществ из биологического материала: дис. ... д.фарм.н. – Барнаул. 1990. 316 с.

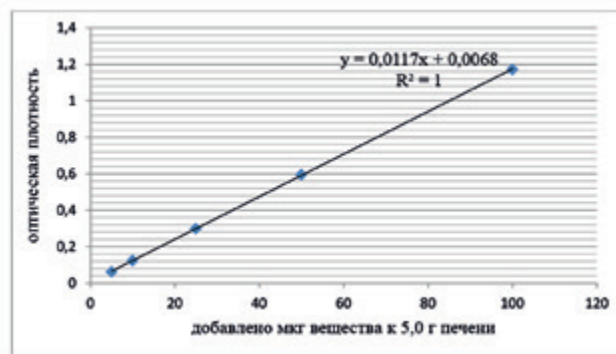


Рисунок 15. График линейной зависимости оптической плотности раствора от количества зопиклона, добавленного к трупной печени

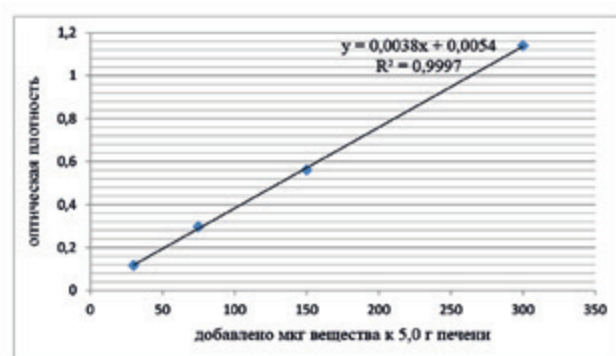


Рисунок 16. График линейной зависимости оптической плотности раствора от количества зопиклона, добавленного к трупной печени

5. Л.В. Чернова. Изолирование, обнаружение и определение хлорпротиксена, аминазина, амитриптилина и мелипрамина при исследовании биологического материала: дис. ... к.фарм.н. – Барнаул. 1990. 219 с.
6. Л.Е. Тимофеева. Химико-токсикологический анализ верапамила: автореферат дис. ... к.фарм.н. – Пермь. 1989. 23 с.
7. А.В. Кнауб. Обнаружение кодеина, кофеина, салициловой кислоты, фенацетина, фенобарбитала при комбинированном отравлении // Судеб.-мед. экспертиза. 1998. № 3. С. 95–96.
8. А.С. Ланчиков. Сравнительная оценка методов изолирования хлорзепада из печени трупа человека // Судеб.-мед. экспертиза. 1989. № 4. С. 47–48.
9. Г.П. Чепурная. Определение Z-препаратов в трупной крови // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2015. № 4(13). С. 140–145.
10. Г.П. Чепурная, В.А. Карташов, Л.В. Чернова. Изолирование и определение Z-препаратов в трупной ткани желудка и кишечника // Инновационные технологии в фармации: сб. науч. тр. – Иркутск. 2016. Вып. 3. С. 174–180.
11. Г.П. Чепурная, В.А. Карташов, Л.В. Чернова. Определение Z-препаратов в биологических объектах лабораторных животных // Университетская наука: взгляд в будущее: материалы междунар. науч.-практ. конф., посвященной 81-летию Курского государственного медицинского университета и 50-летию фарм. фак-та. – Курск. 2016. Т. 3. С. 127–132.