

Применение твердофазной экстракции для совместного извлечения золпидема и его метаболитов из мочи

© Крылова¹⁺ Елена Анатольевна, Катаев¹ Сергей Сергеевич,
Дворская^{2*} Оксана Николаевна и Хомов³ Юрий Александрович

¹ Судебно-химическое отделение. ГКУЗОТ «Пермское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы». Ул. Старцева, 61. г. Пермь, 614077. Пермский край. Россия.

Тел.: (342) 210-67-83. E-mail: forenschemist@narod.ru

² Кафедра токсикологической химии. Пермская государственная фармацевтическая академия Министерства здравоохранения Российской Федерации. Ул. Полевая, 2. г. Пермь, 614990. Пермский край. Россия. Тел.: (342) 282-58-64. E-mail: dvoksnik@gmail.ru

³ Кафедра фармацевтической химии ФДПО и ФЗО. Пермская государственная фармацевтическая академия Министерства здравоохранения Российской Федерации. Ул. Полевая, 2. г. Пермь, 614990. Пермский край. Россия. Тел.: (342) 233-51-10. E-mail: homov@pfa.ru

*Ведущий направление; +Поддерживающий переписку

Ключевые слова: золпидем, твердофазная экстракция, моделирование Бокса-Бенкена, газовая хроматография – масс-спектрометрия.

Аннотация

Описано применение метода твердофазной экстракции (ТФЭ) для совместного извлечения из мочи золпидема и его метаболитов, различающихся по физико-химическим свойствам, с целью их дальнейшего определения методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии (ГХ-МС). Проведена оптимизация этапов ТФЭ с помощью моделирования Бокса-Бенкена, при этом исследовано влияние на эффективность экстракции таких факторов как pH буферного раствора, растворов, применяемых для промывки сорбента, объема элюента и его состава. Использование оптимизированной методики позволяет извлечь из мочи гидрофильные метаболиты золпидема. Пределы обнаружения и количественного определения золпидема в моче составили 13.2 нг/мл и 40 нг/мл, соответственно. Доказана прецизионность методики по показателям повторяемости (коэффициент вариации составил 2.6-5.7%; $n = 9$) и промежуточной прецизионности (коэффициент вариации – 5.8-11.4%; $n = 15$) на трех уровнях концентраций золпидема – 50, 150 и 400 нг/мл. Выход золпидема из мочи составил 98.6-108.4%.

Введение

Золпидем – это снотворный препарат, представляющий собой производное имидазопиридина, широко применяемый во всем мире для эффективного лечения инсомнии [1-3].

Токсикологическое значение золпидема связано с его способностью вызывать привыкание и лекарственную зависимость (психическую и физическую) при длительном приеме (свыше 4 недель) [4, 5]. Золпидем не раз применялся лицами как с героиновой наркоманией в анамнезе, так и без нее для парентерального введения с целью получения эйфории [6]. В литературе представлено множество случаев применения препарата для осуществления преступных действий против личности с использованием таких свойств золпидема, как потенцированное фармакологическое действие при совместном приеме с алкоголем и быстрое наступление седации [7-9].

В РФ золпидем является контролируемым лекарственным средством: он внесен в Список сильнодействующих веществ согласно Постановлению Правительства №964 [10] от 29 декабря 2007 года. Золпидем находится под международным контролем и 15 июля 2002 г. включен в Список IV Конвенции психотропных веществ 1971 года, так как частота случаев развития зависимости и злоупотреблений препаратом сопоставима с таковой у 1,4-бензодиазепинов [11].

Проблемы определения золпидема в моче для судебно-химических и химико-токсикологических целей связаны со способностью золпидема активно подвергаться биотрансфор-

Полная исследовательская публикация _____ Крылова Е.А., Катаев С.С., Дворская О.Н. и Хомов Ю.А. магии в организме человека и экскретироваться в виде фармакологически неактивных метаболитов, при этом на долю нативного золпидема приходится менее 1% от принятой дозы [12].

Поэтому детектирование именно метаболитов золпидема имеет большое аналитическое значение. Метаболиты золпидема являются гидрофильными соединениями (LogP в системе октанол/вода – $-0.96-1.15$), а сам золпидем – липофильным веществом (LogP 3.85), поэтому совместное их извлечение из мочи классическим методом жидкость-жидкостной экстракции мало эффективно. Целью настоящего исследования явилось определение оптимальных условий экстракции золпидема совместно с его метаболитами из мочи с применением метода твердофазной экстракции (ТФЭ).

Для осуществления поставленной цели применяли моделирование Бокса-Бенкена, представляющее собой мультивариативный метод для подбора оптимальных значений исследуемых факторов. Методы математического планирования эксперимента в последнее время нашли применение не только в промышленных отраслях деятельности, но и для целей аналитической химии [13, 14]. Главными достоинствами такого подхода является значительное сокращение количества необходимых опытных исследований за счет составления статистической матрицы, позволяющей сгруппировать эксперимент в блоки. Это влечет за собой снижение финансовых затрат, а также времени, потраченного на выполнение необходимого объема экспериментальной работы.

Экспериментальная часть

Оборудование. Для ГХ-МС использовали газовый хроматограф *Agilent 7820*, масс-селективный детектор *Agilent 5975 Agilent*, США, колонка капиллярная *HP-5MS*, внутренний диаметр 0.25 мм, длина 30 м, толщина пленки 0.25 мкм.

Для ТФЭ применяли: систему с вакуумной камерой на 12 позиций (*Supelco*), насос низкого вакуума *AIR CADET*, США, картриджи *Sampli Q Evidex – 200 мг-3 мл Agilent*, США.

Для выполнения реакции дериватизации использовали термоблок ПЭ-4030, одноканальный испаритель ПЭ-2300, микровстряхиватель ПЭ-2 ОАО «Экрос», Россия.

Для выполнения работы также применялись полуавтоматические пипетки-дозаторы, позволяющие отбирать объемы жидкостей 4-40, 40-200 мкл и 0.2-1, 1-5 мл.

Материалы. Золпидема тартрат (порошок-субстанция, Испания, НД 42-13447-05), мелипрамин (ампулы, с содержанием имипрамина гидрохлорида 12.5 мг/мл, EGIS PHARMACEUTICALS); реланиум (ампулы, 2 мл с содержанием диазепамы – 5 мг/мл, Polfa, Польша); бистриметилсилилтрифторацетамид (БСТФА), содержащий 1% триметилхлорсилана; β -глюкуронидаза, *Type HP-2, From Helix Pomatia, 101400 ЕД/мл Sigma-ALDRICH CHEMI*, Германия. Применяли буферные растворы: 1/15 М фосфатный буфер pH 6.0; 1/15 М фосфатный буфер pH 5.4; 1/15 М фосфатный буфер pH 4.8. Органические растворители: дихлорметан (х.ч.), пропанол-2 (х.ч.), 95% этанол (х.ч.), гексан (о.х.ч.), этилацетат (х.ч.), 99.6% метанол (х.ч.). Прочие реактивы: аммиака раствор концентрированный 25% (ГФ XII), уксусная кислота ледяная (ГФ XII), азот (о.с.ч.), гелий (о.с.ч.).

Исследовали образцы мочи, полученные от добровольцев после перорального приема разовой терапевтической дозы золпидема тартрата (10 мг). Пробы мочи до исследования хранились при +4°C.

Подготовка проб. Методика ТФЭ (до оптимизации). К пробе мочи объемом 2 мл прибавляли 20 мкл спиртового раствора внутреннего стандарта имипрамина гидрохлорида (0.025 мг/мл). 0.5 мл 1/15 М буфера фосфатного (pH 6.0), 0.1 мл β -глюкуронидазы, перемешивали, герметично укупоривали и экспонировали в течение 2 часов при 45 °С. Полученный гидролизат центрифугировали при 2000 об/мин в течение 5 минут. Центрифугат отделяли от осадка, прибавляли 2.5 мл 1/15 М буфера фосфатного (pH 6.0) и подвергали ТФЭ по схеме: кондиционирование сорбента проводили путем последовательного пропускания через картридж 2 мл 95% этанола и 2 мл 1/15 М фосфатного буфера (pH 6.0). Далее загружали образец со скоростью 1 мл/мин. Промывку осуществляли последовательно: 1 мл 1/15 М фосфатного буфера (pH 6.0) и 1 мл 10% этанола. Сушка патрона осуществлялась под вакуумом в течение 10-15 минут. Элюат I получали двукратным пропусканием через патрон смеси н-гексан–этилацетат (3:1) по 2 мл. Элюат II получали двукратным пропусканием через патрон смеси дихлорметан–изопропанол – 25% раствор аммиака (4:1:0.1) по 2 мл. Элюаты I отбрасывали, а элюат II испаряли в токе азота при 60 °С.

Методика ТФЭ (после оптимизации). К 2 мл мочи прибавляли 0.5 мл 1/15 М фосфатного буфера pH 6.0, 0.1 мл β -глюкуронидазы, перемешивали, герметично укупоривали и экспонировали в течение 2 часов при 45 °С. Полученный гидролизат центрифугировали при 2000 об/мин в течение 5 минут. Центрифугат отделяли от осадка, прибавляли 2.5 мл 1/15 М фосфатного буфера (pH 5.4) и

подвергали ТФЭ по схеме: кондиционирование сорбента осуществляли последовательным промыванием 2 мл 95% этанола и 2 мл 1/15 М фосфатного буфера pH 5.4. Загрузку анализируемого образца мочи осуществляли со скоростью 1.0 мл/мин, после чего промывали сорбент последовательным пропусканием через него растворов объемами по 1 мл: 1/15 М фосфатного буфера pH 5.4; 0.1 М раствора уксусной кислоты и 3 мл 50% раствора метанола в воде. Элюирование осуществляли в отдельный флакон со скоростью 1.0 мл/мин смесью дихлорметан–изопропанол – 25% раствор аммиака (2:1:0.1) дважды порциями по 2 мл. Элюат испаряли досуха в токе азота при 60 °С.

К полученному сухому остатку прибавляли 20 мкл диазепама (0.01 мг/мл) в качестве внешнего стандарта, растворитель удаляли испарением в токе азота при 60 °С. Далее образец подвергали дериватизации путем получения триметилсилильных эфиров гидрокси- и карбоксиметаболитов золпидема: к сухому остатку прибавляли 100 мкл БСТФА, содержащего 1% триметилхлорсилана, герметично закрывали, перемешивали на микровстряхивателе и нагревали при 80 °С в течение 60 минут в термоблоке. Вials охлаждали и 1 мкл вводили в инжектор хромато-масс-спектрометра.

Режим работы газового хроматографа с масс-селективным детектором. Скорость потока газа-носителя (гелий) через колонку 1.5 мл/мин, режим работы split/splitless (деление потока 15:1, с задержкой включения 1 мин после ввода пробы). Температура испарителя хроматографа и интерфейса детектора задавалась 300 и 280 °С. Температура колонки начальная 70 °С в течение 1 мин и прогрев до 230 °С со скоростью программирования 40 град/мин, затем прогрев до 300 °С со скоростью программирования 20 град/мин; выдержка при конечной температуре 2.5 мин. Регистрация масс-спектров проводилась в режиме селективного ионного мониторинга (SIM) по ионам с величинами m/z для золпидема, триметилсилильных эфиров его метаболитов, имипрамина (внутренний стандарт) и диазепама (внешний стандарт) – 235, 323, 337, 234, 256. Обработку хроматограмм с целью идентификации компонентов проб проводили с использованием программы *ChemStation G1701DA*.

Процедура оптимизации. Оптимизацию условий проведения ТФЭ выполняли с помощью математического планирования эксперимента применением 3-х факторного 3-х уровневого моделирования Бокса-Бенкена, который был реализован в два этапа. Обработку результатов проводили с помощью программы *STATISTICA 6.1*.

Результаты и их обсуждение

1. Оптимизация экспериментальных условий проведения ТФЭ золпидема и его метаболитов из мочи

Эффективность извлечения целевых компонентов из биологических жидкостей может зависеть от множества факторов, значимость которых трудно оценить из-за трудоемкости исследования и особенно, если учитывать возможные неизвестные взаимодействия этих факторов друг с другом.

Применение математических методов планирования эксперимента позволяет составить модель изучаемого процесса, отражающую влияние на целевую функцию каждого изучаемого фактора и оценить эффекты существующих взаимодействий.

В рамках настоящей работы для получения наибольшей интенсивности регистрируемых аналитических сигналов золпидема и триметилсилильных эфиров его метаболитов была проведена оценка влияния шести факторов: концентрации фосфатного буферного раствора, уксусной кислоты и метанола, применяемых для промывки сорбента, объема элюента и его состава.

Исследование проводили после составления матрицы эксперимента, включающей различные сочетания варьируемых факторов с их величинами в натуральном и кодированном виде с учетом необходимого количества опытов (табл. 1).

Аналитический сигнал исследуемых веществ оценивали по величине отношения площади пика аналита к площади пика внешнего стандарта. Полученные значения аналитических сигналов золпидема и ТМС-производных его метаболитов представлены в табл. 2.

По полученным данным были рассчитаны полиномиальные модели второго порядка для каждого идентифицированного компонента (золпидема и ТМС-производных его метаболитов) (табл. 3).

В полученных уравнениях присутствуют линейные (главные) эффекты – x_1 , x_2 и x_3 . Члены второго порядка $\beta_{12}x_1x_2$, $\beta_{13}x_1x_3$ и $\beta_{23}x_2x_3$ учитывают эффекты взаимодействия, то есть дополнительные к линейным эффекты совместного действия факторов x_1 , x_2 , x_3 на величину y , а члены $\beta_{11}x_1^2$, $\beta_{22}x_2^2$ и $\beta_{33}x_3^2$ – квадраты независимых факторов) – нелинейность изменения функции отклика y при изменении величины фактора.

Табл. 1. Матрица исследования для плана Бокса-Бенкена с реальными и кодированными величинами

Первый этап			
Опыт	pH 1/15M фосфатного буфера (pH)	Концентрация УК ($C_{УК}$), моль/л	Объем элюента ($V_{э}$), мл
1	4.8 (-1)	0 (-1)	2 (0)
2	6.0 (+1)	0 (-1)	2 (0)
3	4.8 (-1)	0.1 (+1)	2 (0)
4	6.0 (+1)	0.1 (+1)	2 (0)
5	4.8 (-1)	0.01 (0)	1 (-1)
6	6.0 (+1)	0.01 (0)	1 (-1)
7	4.8 (-1)	0.01 (0)	3 (+1)
8	6.0 (+1)	0.01 (0)	3 (+1)
9	5.4 (0)	0 (-1)	1 (-1)
10	5.4 (0)	0.1 (+1)	1 (-1)
11	5.4 (0)	0 (-1)	3 (+1)
12	5.4 (0)	0.1 (+1)	3 (+1)
13	5.4 (0)	0.01 (0)	2 (0)
14	5.4 (0)	0.01 (0)	2 (0)
15	5.4 (0)	0.01 (0)	2 (0)

Второй этап			
Опыт	Концентрация метанола (C_{MeOH}), %	Объем метанола (V_{MeOH}), мл	Соотношение компонентов элюента (El)
1	100 (+1)	1 (-1)	3:1:0.1 (0)
2	50 (0)	1 (-1)	2:1:0.1 (+1)
3	100 (+1)	2 (0)	2:1:0.1 (+1)
4	10 (-1)	1 (-1)	3:1:0.1 (0)
5	50 (0)	2 (0)	3:1:0.1 (0)
6	50 (0)	3 (+1)	2:1:0.1 (+1)
7	10 (-1)	2 (0)	2:1:0.1 (+1)
8	50 (0)	1 (-1)	4:1:0.1 (-1)
9	100 (+1)	3 (+1)	3:1:0.1 (0)
10	50 (0)	2 (0)	3:1:0.1 (0)
11	10 (-1)	2 (0)	4:1:0.1(-1)
12	50 (0)	2 (0)	3:1:0.1(0)
13	10 (-1)	3 (+1)	3:1:0.1 (0)
14	100 (+1)	2 (0)	4:1:0.1 (-1)
15	50 (0)	3 (+1)	4:1:0.1 (-1)

Табл. 2. Величины аналитических сигналов, полученных в эксперименте

Опыт	Первый этап				Второй этап				
	золпидем	6-ГМЗ	ГЗ	4 ² -КЗ	Аналиты ¹				
	золпидем	6-ГМЗ	ГЗ	4 ² -КЗ	золпидем	6-ГМЗ	ГЗ	4 ² -КЗ	6-КЗ
1	1.127	5.605	11.924	18.695	1.1155	1.837	5.9494	46.1167	1.8343
2	1.103	5.010	11.193	8.203	1.322	1.553	8.3818	51.27395	3.1806
3	1.060	5.205	12.154	6.241	1.297	1.592	8.7463	55.0259	2.6711
4	1.350	5.968	13.139	5.135	2.078	2.385	13.0591	66.6781	7.05825
5	1.006	5.425	11.740	0.342	1.806	2.413	13.85195	76.7716	6.47675
6	0.880	5.080	10.791	0.155	2.150	1.943	11.41785	91.022	5.8616
7	1.418	6.391	14.255	26.458	1.851	1.719	9.6581	72.929	5.96995
8	1.373	6.317	13.778	27.237	1.701	1.743	10.4548	37.8451	4.3449
9	1.107	5.628	11.918	12.941	1.645	1.615	9.29645	62.7862	3.75285
10	1.335	6.667	13.645	0.495	1.972	1.610	9.4113	62.5555	5.89795
11	1.280	5.523	12.509	30.149	1.868	1.6076	9.911	15.32	5.1203
12	1.264	5.630	12.575	26.832	2.143	1.4397	9.07305	56.0258	5.1645
13	1.232	6.030	12.459	5.622	1.846	1.3409	9.01195	47.7727	6.69265
14	1.081	5.325	10.149	6.526	1.335	1.32135	7.60655	43.76965	5.5806
15	1.144	5.681	12.518	4.083	1.765	1.4896	9.57065	43.04605	7.0986

¹ 6-ГМЗ – 6-(гидроксиметил)-золпидем; ГЗ – гидроксизолпидем (ОН-группа в положении 7 или 8 имидазопиридинового цикла; 4²-КЗ – 4²-(карбоксии)-золпидем); 6-КЗ – 6-(карбоксии)-золпидем

Табл. 3. Уравнения регрессии, полученные для построения поверхностей отклика

Уравнение регрессии ² в общем виде:	
Аналит	$AC = \beta_0 + \beta_1 pH + \beta_2 C_{VK} + \beta_3 V\text{э} + \beta_{11}(pH)^2 + \beta_{22}(C_{VK})^2 + \beta_{33}(V\text{э})^2 + \beta_{12}(pH)(C_{VK}) + \beta_{13}(pH)(V\text{э}) + \beta_{23}(C_{VK})(V\text{э})$
Первый этап	
золпидем	$AC = 1.1527 + 0.0119(pH) + 0.0491(C_{VK}) + 0.1259(V\text{э}) - 0.035(pH)^2 + 0.0423(C_{VK})^2 +$ $\pm 0.0879 \pm 0.0538 \pm 0.0538 \pm 0.0538 \pm 0.0793 \pm 0.0793$ $+ 0.0514(V\text{э})^2 + 0.0785(pH)(C_{VK}) + 0.0204(pH)(V\text{э}) - 0.0608(C_{VK})(V\text{э})$ $\pm 0.0793 \pm 0.0762 \pm 0.0762 \pm 0.0762$
6-ГМЗ	$AC = 5.6783 - 0.0315(pH) + 0.2131(C_{VK}) + 0.1325(V\text{э}) - 0.1451(pH)^2 - 0.0863(C_{VK})^2 +$ $\pm 0.34 \pm 0.2082 \pm 0.2082 \pm 0.2082 \pm 0.3065 \pm 0.3065$ $+ 0.2698(V\text{э})^2 + 0.3392(pH)(C_{VK}) + 0.0676(pH)(V\text{э}) - 0.2329(C_{VK})(V\text{э})$ $\pm 0.3065 \pm 0.2945 \pm 0.2945 \pm 0.2945$
ГЗ	$AC = 11.7088 - 0.1463(pH) + 0.4959(C_{VK}) + 0.6279(V\text{э}) + 0.1863(pH)^2 + 0.2072(C_{VK})^2 +$ $\pm 0.7524 \pm 0.4608 \pm 0.4608 \pm 0.4608 \pm 0.6782 \pm 0.6782$ $+ 0.7458(V\text{э})^2 + 0.4289(pH)(C_{VK}) + 0.1178(pH)(V\text{э}) - 0.4152(C_{VK})(V\text{э})$ $\pm 0.6782 \pm 0.6516 \pm 0.6516 \pm 0.6516$
4'-КЗ	$AC = 5.41 - 1.3758(pH) - 3.9107(C_{VK}) + 12.0928(V\text{э}) + 0.0511(pH)^2 + 4.1073(C_{VK})^2 +$ $\pm 1.4895 \pm 0.9121 \pm 0.9121 \pm 0.9121 \pm 1.3426 \pm 1.3426$ $+ 8.0869(V\text{э})^2 + 2.3465(pH)(C_{VK}) + 0.2418(pH)(V\text{э}) + 2.2823(C_{VK})(V\text{э})$ $\pm 1.3426 \pm 1.2899 \pm 1.2899 \pm 1.2899$
Второй этап	
золпидем	$AC = 1.9735 - 0.2812(C_{MeOH}) + 0.1487(V_{MeOH}) - 0.0062(El) - 0.2246(C_{MeOH})^2 - 0.0782(V_{MeOH})^2 -$ $\pm 0.0825 \pm 0.0505 \pm 0.0505 \pm 0.0505 \pm 0.0744 \pm 0.0744$ $- 0.1612(El)^2 + 0.1907(C_{MeOH})(V_{MeOH}) - 0.0052(C_{MeOH})(El) - 0.1909(V_{MeOH})(El)$ $\pm 0.0744 \pm 0.0714 \pm 0.0714 \pm 0.0714$
6-ГМЗ	$AC = 1.8208 - 0.0859(C_{MeOH}) - 0.1412(V_{MeOH}) + 0.0806(El) - 0.0743(C_{MeOH})^2 + 0.0481(V_{MeOH})^2 -$ $\pm 0.2295 \pm 0.1405 \pm 0.1405 \pm 0.1405 \pm 0.2068 \pm 0.2068$ $- 0.1866(El)^2 + 0.2057(C_{MeOH})(V_{MeOH}) + 0.0398(C_{MeOH})(El) + 0.1609(V_{MeOH})(El)$ $\pm 0.2068 \pm 0.1987 \pm 0.1987 \pm 0.1987$
ГЗ	$AC = 10.7788 - 1.2552(C_{MeOH}) + 0.1815(V_{MeOH}) + 0.0826(El) - 1.2127(C_{MeOH})^2 - 0.2367(V_{MeOH})^2 -$ $\pm 1.0653 \pm 0.6524 \pm 0.6524 \pm 0.6524 \pm 0.9603 \pm 0.9603$ $- 0.5856(El)^2 + 1.8486(C_{MeOH})(V_{MeOH}) + 0.3482(C_{MeOH})(El) + 0.9801(V_{MeOH})(El)$ $\pm 0.9603 \pm 0.9226 \pm 0.9226 \pm 0.9226$
6-КЗ	$AC = 5.8464 - 1.3753(C_{MeOH}) + 0.8735(V_{MeOH}) - 0.5576(El) - 0.6489(C_{MeOH})^2 - 0.363(V_{MeOH})^2 -$ $\pm 0.6485 \pm 0.3971 \pm 0.3971 \pm 0.3971 \pm 0.5845 \pm 0.5845$ $- 0.362(El)^2 + 0.571(C_{MeOH})(V_{MeOH}) - 0.9398(C_{MeOH})(El) - 0.0182(V_{MeOH})(El)$ $\pm 0.5845 \pm 0.5616 \pm 0.5616 \pm 0.5616$
4'-КЗ	$AC = 65.1176 + 0.6248(C_{MeOH}) + 5.3391(V_{MeOH}) + 16.2838(El) - 9.1574(C_{MeOH})^2 - 0.1218(V_{MeOH})^2 -$ $\pm 6.0149 \pm 3.6833 \pm 3.6833 \pm 3.6833 \pm 5.4217 \pm 5.4217$ $- 9.1991(El)^2 + 8.8937(C_{MeOH})(V_{MeOH}) - 11.5882(C_{MeOH})(El) + 8.6368(V_{MeOH})(El)$ $\pm 5.4217 \pm 5.209 \pm 5.209 \pm 5.209$

При этом сила влияния фактора (условия ТФЭ) на исследуемый показатель (АС) оценивается соответствующим коэффициентом β уравнения регрессии.

По коэффициенту регрессии при кодированной переменной можно оценить сравнительное влияние каждого параметра на величину АС. Исходя из этих данных, наиболее ощутимое влияние на АС золпидема, ГЗ и 4'-КЗ (первый этап) оказывает член регрессии $V\text{э}$ ($V\text{э}$ – объем элюента), коэффициенты регрессии (линейные и квадратичные) которого являются наибольшими среди других коэффициентов в соответствующих уравнениях.

На величину АС 6-ГМЗ наибольшее влияние оказывает взаимодействие факторов рН и концентрации уксусной кислоты, но стандартная ошибка коэффициента корреляции при члене $(pH)(C_{VK})$ указывает, что это влияние статистически не значимо.

Из полученных на втором этапе исследований уравнений видно, что наибольшее влияние на эффективность экстракции золпидема и его 6-(карбокси)-метаболита оказывает концентрация метанола (по модулю коэффициенты регрессии максимальны при соответствующих членах данных квадратичных полиномов), но знак «-» свидетельствует о том, что этот фактор только на кодированном уровне -1 (10% раствор метанола) приводит к наибольшему значению АС.

² под коэффициентами регрессии указаны их стандартные ошибки

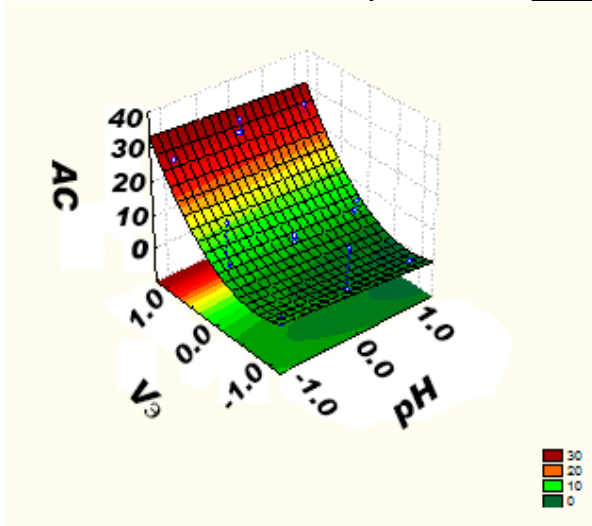


Рис. 1. Поверхность отклика для факторов рН и объема элюента (4'-карбоксизолпидем)

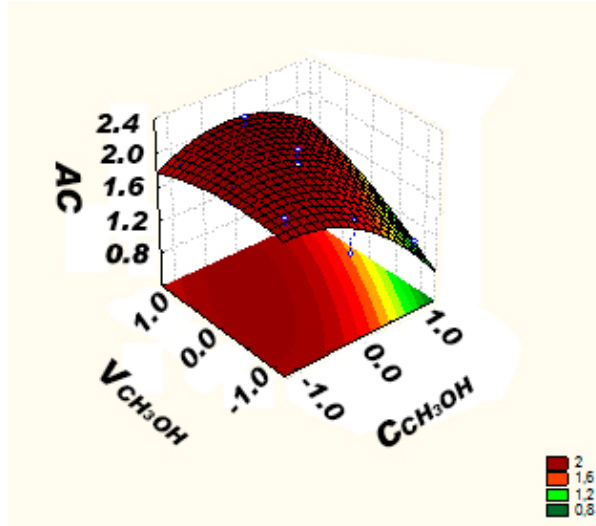


Рис. 2. Поверхность отклика для факторов объема и концентрации метанола (золпидем)

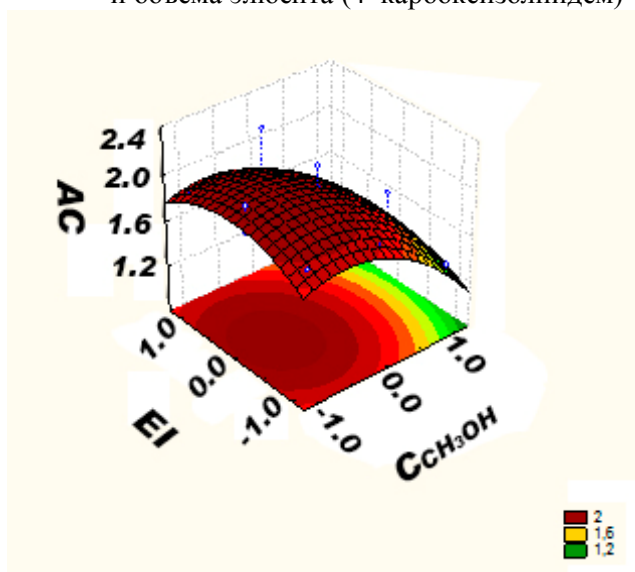


Рис. 3. Поверхность отклика для факторов концентрации метанола и состава элюента (золпидем)

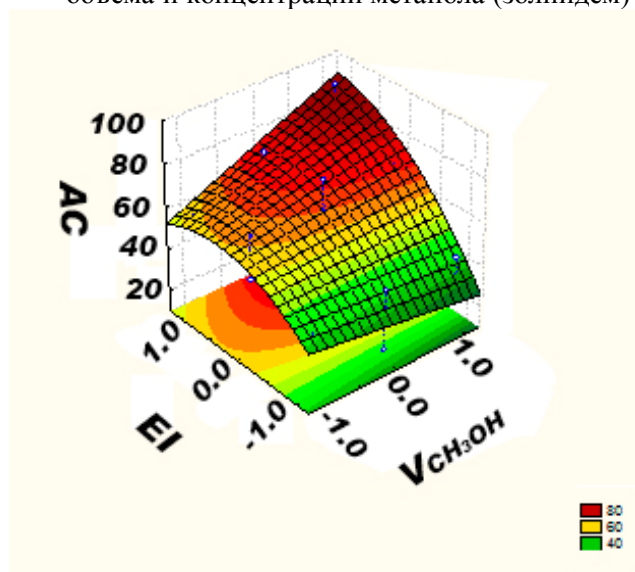


Рис. 4. Поверхность отклика для факторов объема метанола и состава элюента (4'-карбоксизолпидем)

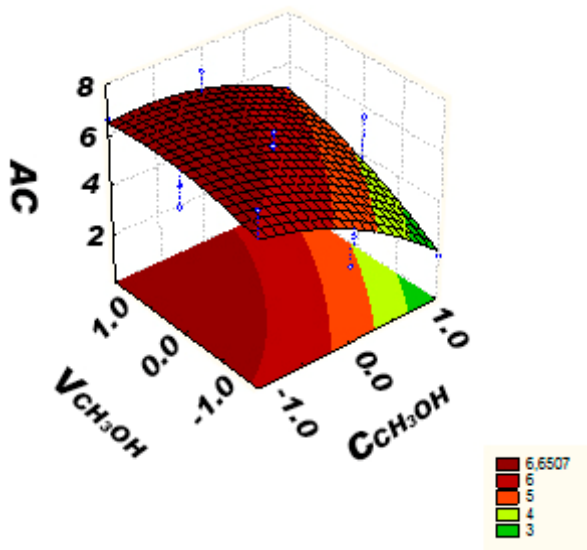


Рис. 5. Поверхность отклика для объема и концентрации метанола (6-карбоксизолпидем)

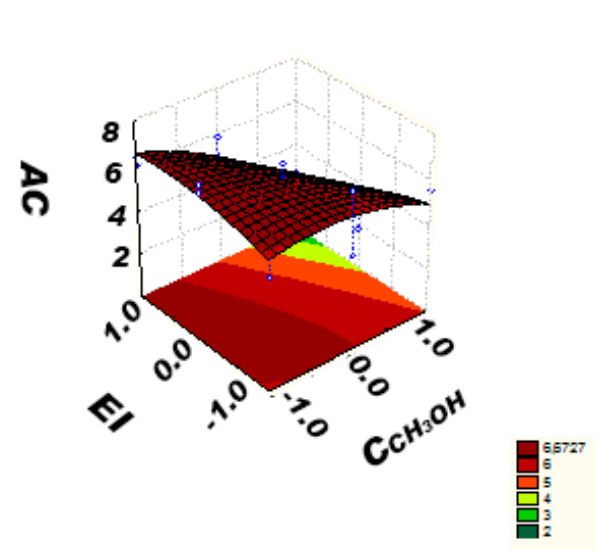


Рис. 6. Поверхность отклика для концентрации метанола и состава элюента (6-карбоксизолпидем)

В уравнениях, полученных для 6-ГМЗ и ГЗ, значения коэффициентов регрессии статистически незначимы, на что указывают их соответствующие стандартные ошибки. А на эффективность экстракции 4'-КЗ значимое влияние оказывает сила элюента.

Для оценки адекватности полученных моделей регрессии второго порядка использовали результаты дисперсионного анализа (ANOVA). На первом этапе исследований было установлено, что данная модель является адекватной только для 4'-карбоксиволпидема.

Только для этого метаболита выявлена статистически значимая зависимость его аналитического сигнала от изменяемых факторов при проведении ТФЭ, и этим ведущим фактором является объем используемого элюента (сумма площадей квадратов, обусловленная регрессией переменной V_{Σ} (SS_R) составляет 98% от полной суммы квадратов SS_T).

Воздействие факторов pH , C_{VK} и V_{Σ} на эффективность экстракции гидроксиметаболитов и золпидема при ТФЭ наблюдается значительно в меньшей степени ($SS_R/SS_T = 48.2-64.4\%$). На втором этапе была доказана адекватность полученных моделей для золпидема и его карбоксиволпидема ($SS_R/SS_T = 83.0-91.3\%$) в оценке влияния концентрации и объема метанола для промывки сорбента и состава элюента. Для гидроксиметаболитов эти факторы оказались незначимыми ($SS_R/SS_T = 47.3-68.7\%$), то есть полученные для них модели недостаточно статистически надежно описывают реальный процесс.

Наглядно полученные значимые результаты представлены на рис. 1-6, где приводятся поверхности отклика, построенные на основе рассчитанных уравнений регрессии. Эти поверхности позволяют оценить взаимодействие двух различных факторов, которые влияют на величину аналитического сигнала, при фиксированной величине третьего фактора.

В результате анализа построенных поверхностей отклика были сформулированы параметры искомой оптимизации:

- Кондиционирование сорбента патрона: 1/15М фосфатный буфер в диапазоне рН от 4.8 до 6.0;
- Промывка сорбента после загрузки образца:
 - 1/15М фосфатный буфер в диапазоне рН от 4.8 до 6.0;
 - 0.01-0.1 М уксусной кислоты;
 - 3 мл 50% раствора метанола (данная манипуляция заменяет два этапа в исходной методике, включающих промывку 10% этанолом и смесью этилацетат-*n*-гексан (1:3)).
- Элюирование смесью дихлорметан–2-пропанол–25% аммиак (2:1:0.1) 2 раза по 2 мл (вместо элюирования смесью дихлорметан–2-пропанол–25% аммиак (4:1:0.1) 2 раза по 3 мл, таким образом, увеличение силы элюента позволило сократить его объем).

2. Валидация методики

Построение калибровочного графика (для золпидема). Калибровочные стандарты были получены добавлением к 2 мл «холостой» пробы мочи этанольных растворов, содержащих по 50; 100; 200; 500 и 1000 нг золпидема, и имиπραмина гидрохлорида в качестве внутреннего стандарта в количестве 500 нг. Исследовались по две пробы для каждой концентрации.

Калибровочная прямая, демонстрирующая зависимость отношения площадей пиков ионных фрагментов с величинами m/z 235 и 234 к концентрациям золпидема, представлена на рис. 7. График линеен в интервале 0.025-0.5 мг/л, то есть во всем диапазоне выбранных концентраций. Полученный график описывается уравнением (1), коэффициент r^2 составляет 0.998.

$$y = 0.01777x - 0.2661 \quad (1)$$

Метрологическая характеристика методики. Результаты количественного определения золпидема в модельных образцах мочи методом ГХ/МС представлены в табл. 4, где μ – принятое опорное значение концентрации золпидема; f – число степеней свободы; s^2 – дисперсия; s – стандартное отклонение; $s_x, \%$ – относительное стандартное отклонение среднего результата (коэффициент вариации); $t(P, f)$ (табл.) – табличный критерий Стьюдента при заданном уровне вероятности P и числу степеней свободы f ; Δx – полуширина доверительного интервала среднего значения; $\varepsilon, \%$ – относительная ошибка (погрешность) среднего результата; $t_{выч}$ – вычисленный критерий Стьюдента; δ – систематическая ошибка [15].

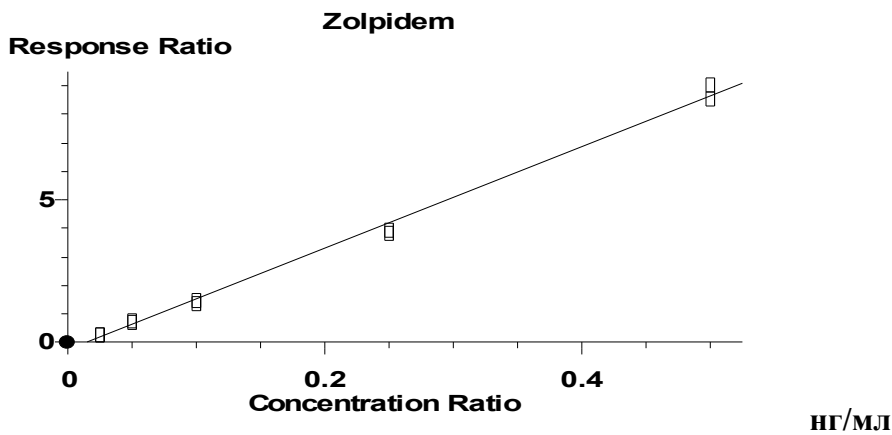


Рис. 7. Калибровочный график для количественного определения золпидема в моче по оптимизированной методике

Табл. 4. Метрологическая оценка методики количественного определения золпидема в моче ($n = 15, P = 95\%$)

μ , нг/мл	f	\bar{x}	s^2	s	$s_x, \%$	$t(P, f)$ табл.	Δx	ε	$t_{выч}$	$\delta, \%$
50	14	57.99	11.492	3.390	5.8	2.15	1.88	3.24	9.13	15.98
150		154.07	310.36	17.617	11.4		6.35	0.89	–	
400		418.31	1284.7	35.842	8.6		19.90	4.78	1.98	–

В следствие того, что при проведенных исследованиях $|\mu - \bar{x}| > 0$ для каждого уровня концентраций золпидема, то необходимо было решить вопрос о наличии или отсутствии систематической ошибки, для этого вычисляли критерий Стьюдента по формуле:

$$t_{выч} = \frac{|\mu - \bar{x}| \cdot \sqrt{n}}{s} \tag{2}$$

Полученные значения $t_{выч}$ оценивали при $P = 95\%$ и $f = n - 1 = 14$, при этом, для образцов модельных образцов мочи с концентрацией 50 нг/мл реализовалось неравенство $t_{выч} > t_{табл}$.

Поэтому полученные результаты при этой концентрации отягощены систематической ошибкой, величину которой δ рассчитывали по формуле (3), результаты представлены в табл. 4.

$$\delta = \frac{|\bar{x} - \mu|}{\mu} \cdot 100\% \tag{3}$$

Эффективность экстракции золпидема по оптимизированной методике определяли на трех уровнях концентраций. Результаты представлены в табл. 5.

Табл. 5. Эффективность экстракции (R) золпидема из образцов модельной мочи

№ пробы	Эффективность экстракции золпидема, %		
	50 нг/мл	150 нг/мл	400 нг/мл
1.	113.7535	102.8031	92.46157
2.	106.0912	101.5633	99.02286
3.	105.9301	105.1942	95.00989
4.	102.1348	103.045	103.7205
5.	108.8268	102.3037	104.5171
6.	113.4479	102.0938	96.6602
$\bar{R}, \%$	108.36	102.83	98.57
s	4.58	1.27	4.81
$s_x, \%$	4.23	1.24	4.88

Пределы обнаружения (ПО) и количественного определения (ПКО). Для их определения строили калибровочный график по 6 уровням концентрации золпидема, предположительно близким к его ПО и ПКО, которые далее рассчитывали по формулам [16]:

$$ПО = 3.3 \times \frac{S}{b}; \tag{4}$$

$$ПКО = 10 \times \frac{S}{b}; \tag{5}$$

S – стандартное отклонение аналитического сигнала; *b* – коэффициент чувствительности, представляющий собой отношение аналитического сигнала к определяемой величине (тангенс угла наклона калибровочной прямой).

ПО золпидема в моче при использовании валидируемой методики составило 13 нг/мл, ПКО – 40 нг/мл.

3. Линейность

Характеристики линейности представлены в табл. 6.

Табл. 6. Характеристики соблюдения линейности при количественном определении золпидема в моче

Объем выборки, n	5				
Концентрация модельного образца мочи, нг/мл	25	50	100	250	500
Величина аналитического сигнала	0.2923	0.7437	1.4240	3.8806	8.7666
Коэффициент корреляции, <i>r</i>	0.998				
Тангенс угла наклона прямой (наклон), <i>b</i>	0.01777				
Точка пересечения с осью ординат, <i>a</i>	- 0.2661				
Остаточная сумма квадратов отклонений	0.0482				

4. Правильность

Правильность аналитической методики количественного определения золпидема в моче доказывали на всем диапазоне ее применения. Определения проводились путем анализа модельных образцов мочи с добавками золпидема в концентрациях 50 нг/мл, 150 нг/мл и 400 нг/мл. Оценка проводилась путем расчета разности между средним и принятым опорным значением с учетом соответствующих доверительных интервалов среднего значения. Было определено, что найденные значения концентраций, принимаемые за истинные, лежат внутри доверительного интервала соответствующего среднего результата анализа, полученного экспериментально по данной методике.

Прецизионность (повторяемость и промежуточная прецизионность). Для подтверждения повторяемости (сходимости) были проанализированы 9 образцов модельной мочи в трех репликах для каждой концентрации. Пробоподготовка и анализ были проведены в один день, одними оператором и на одной и той же аппаратуре. Критерий приемлемости: коэффициент вариации должен быть не больше 15% [16, 17].

Данный показатель для всех исследований при анализе мочи составил 3.2-5.7%.

Для определения внутрилабораторной прецизионности по одному фактору (время) готовили и анализировали серии образцов в течение пяти дней. Каждый день исследовали по девять образцов модельной мочи с добавкой золпидема в трех концентрациях, каждую из которых повторяли по три раза. Коэффициент вариации на всех уровнях концентрации наблюдался в диапазоне 5.8-11.4%.

Выводы

1. Предложенная методика определения золпидема и его метаболитов в моче делает возможным проведение их совместного выделения и обнаружения с последующим количественным определением нативного вещества.
2. Проведена метрологическая и валидационная оценка описанной методики определения золпидема и его метаболитов в моче по показателям линейность, правильность, прецизионность (повторяемость и промежуточная прецизионность), что доказывает ее пригодность для практического использования.
3. Показано применение математического моделирования для разработки оптимальных условий экстракции золпидема совместно с его метаболитами. Данный подход является более

Полная исследовательская публикация _____ Крылова Е.А., Катаев С.С., Дворская О.Н. и Хомов Ю.А. эффективным, чем последовательный подбор необходимых условий, и может быть применен при разработке новых методик для химико-токсикологического и судебно-химического анализа.

Литература

- [1] Александровский Ю.А., Аведисова А.С. Ивадал – новейшее достижение в лечении нарушений сна. *Клиническая психофармакология*. **1999**. №1. С.30-33.
- [2] D.J. Frey [et al.]. Influence of zolpidem and sleep inertia on balance and cognition during nighttime awakening: a randomized placebo-controlled trial. *Journal of the American Geriatrics Society*. **2011**. Vol.59. №1. P.73-81.
- [3] R.J. Morlock., M. Tan, D.Y. Mitchell. Patient characteristics and patterns of drug use for sleep complaints in the United States: analysis of National Ambulatory Medical Survey data, 1997-2002. *Clinical Therapeutics*. **2006**. Vol.28. No.7. P.1044-1053.
- [4] Аведисова А.С. Гипнотики: от фенобарбитала к ивадалу. *Русский медицинский журнал*. **2002**. №2. С.60-65.
- [5] J. Damm, D. Eser, H.J. Moeller, R. Rupprecht. Severe dependency on zolpidem in a patient with multiple sclerosis suffering from paraspasticity. *The World Journal of Biological Psychiatry*. 2010. Vol.11. P.516-518.
- [6] A. Benyamina [et al.]. Intravenous zolpidem abuse: a case for serotonin depletion. *American Journal of Addictions*. **2007**. Vol.16. No.6. P.534.
- [7] M. Chèze [et al.]. A tendency for re-offending in drug-facilitated crime. *Forensic Science International*. **2010**. Vol.196. No.1-3. P.14-17.
- [8] C. Maravelias [et al.]. Drug-facilitated sexual assault provoked by the victim's religious beliefs: a case report. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*. **2009**. Vol.30. No.4. P.384-385.
- [9] B. Levine., S.C. Wu, J.E. Smialek. Zolpidem distribution in postmortem cases. *Journal of Forensic Science*. **1999**. Vol.44. No.2. P.369-371.
- [10] Об утверждении Списков сильнодействующих и ядовитых веществ для целей статьи 234 и других статей Уголовного Кодекса Российской Федерации, а также крупного размера сильнодействующих веществ для целей статьи 234 и других статей Уголовного Кодекса Российской Федерации: Постановление Правительства №964 от 29 декабря 2007 г. (ред. от 26.02.2013 г.) [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://base.consultant.ru/cons/cgi/online.cgi?req=doc;base=LAW;n=142881;dst=0;ts=4D442090D24C16529ED87FFE41BFE910;rnd=0.3912806428179476>
- [11] C. Victorri-Vigneau, E. Dailly, G. Veyrac, P. Jolliet. Evidence of zolpidem abuse and dependence: results of the French Centre for Evaluation and Information on Pharmacodependence (CEIP) network survey. *British Journal of Clinical Pharmacology*. **2007**. Vol.64. No.2. P.198-209.
- [12] Вышковский Г.Л. Регистр лекарственных средств России. РЛС. Энциклопедия лекарств. М.: РЛС. **2010**. Вып.18. С.331-334
- [13] M.A. Farajzadeh, M. Bahram, J.Å. Jönsson. Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography-diode array detection as an efficient and sensitive technique for determination of antioxidants. *Analytica Chimica Acta*. **2007**. Vol.591. P.69-79.
- [14] A.S. Souza [et al.]. Automatic on-line preconcentration system using a knotted reactor for the FAAS determination of lead in drinking water. *Journal of Hazardous Materials*. **2007**. Vol.141. P.540-545.
- [15] Государственная фармакопея Российской Федерации XII: официальное издание. М.: Издательство «Научный центр экспертизы средств медицинского применения». **2008**. Ч.1. 704с.
- [16] Руководство для предприятий фармацевтической промышленности: методические рекомендации. М.: Спорт и культура. **2007**. 192с.
- [17] Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. – U.S.A.: U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), 2001. – Режим доступа: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>.