



С. Л. Загородній^{1,2}, С. О. Васюк¹

Кількісне визначення зопіклону у таблетках «Сонован» методом спектрофотометрії

¹Запорізький державний медичний університет,

²Науково-дослідний експертно-криміналістичний центр при ГУМВС України в Запорізькій області

Ключові слова:

спектрофотометрія, зопіклон, бромтимоловий синій, кількісне визначення.

Розробили нову спектрофотометричну методику кількісного визначення зопіклону на основі його взаємодії з бромтимоловим синім у середовищі ацетону й вимірюванні абсорбції продукту реакції у видимій ділянці спектра при довжині хвилі 400 нм. Методика, яку пропонуємо, застосована для кількісного визначення зопіклону у лікарській формі – таблетках «Сонован». Визначили основні валідаційні характеристики за Державною фармакопеею України. За експериментальними даними, методика може бути коректно відтворена та придатна для використання в лабораторіях Державної інспекції з контролю якості лікарських засобів, а також ВТК хіміко-фармацевтичних підприємств і криміналістичних лабораторіях.

Количественное определение зопиклона в таблетках «Сонован» методом спектрофотометрии

С. Л. Загородний, С. А. Васюк

Разработана новая спектрофотометрическая методика количественного определения зопиклона по реакции его взаимодействия с бромтимоловым синим в среде ацетона и измерении абсорбции продукта реакции в видимой области спектра при длине волны 400 нм. Предложенная методика применена для количественного определения зопиклона в лекарственной форме – таблетках «Сонован». Определены основные валидационные характеристики по Государственной фармакопее Украины. Согласно экспериментальным данным, методика может быть корректно воспроизведена и пригодна для использования в лабораториях Государственной инспекции по контролю качества лекарственных средств, а также ОТК химико-фармацевтических предприятий и криминалистических лабораториях.

Ключевые слова: спектрофотометрия, зопиклон, бромтимоловый синий, количественное определение.

Актуальные вопросы фармацевтической и медицинской науки и практики. – 2014. – № 2 (15). – С. 23–26

Quantitative determination of zopiclone tablets «Sonovan» by spectrophotometry

S. L. Zagorodniy, S. O. Vasyuk

Aim. A new spectrophotometric method of assay zopiclone based on its interaction with bromthymol blue in acetone solution and measuring the absorption of the reaction product in the visible spectrum at a wavelength of 400 nm.

Methods and results. The method used to quantify dimedrol in dosage forms - tablets «Sonovan». The basic characteristics validated by the State Pharmacopoeia of Ukraine.

Conclusion. According to the obtained experimental data, the technique can be correctly reproduced and is suitable for use in pharmaceutical and forensic analytical laboratories.

Key words: Spectrophotometry, Zopiclone, Bromothymol blue, Quantification.

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2014; № 2 (15): 23–26

Зопіклон (6-(5-хлор-2-піридиніл)-6,7-дигідро-7-оксо-5Н-пірроло[3,4-*b*]піразин-5-іловий естер 4-метил-1-піперазінкарбонової кислоти) – агоніст бензодіазепінових рецепторів, діє на центральні рецептори макромолекулярного ГАМК (гамма-аміномасляна кислота) бензодіазепін-хлоріонофорного комплексу і не діє на периферичні бензодіазепінові рецептори. Підвищує чутливість ГАМК-рецепторів до медіатора, що призводить до гальмування міжнейронної передачі в різних відділах центральної нервової системи. Скорочує період засинання, зменшує кількість нічних пробуджень, покращує якість сну, не змінює фазову структуру сну. Зопіклон ефективний при ситуативному безсонні, що пов'язане з психоємційним напруженням, зміною звичного ритму життя (наприклад, при госпіталізації), десинхронізом, у т.ч. при зміні часових поясів, позмінному режимі роботи. Сон настає протягом 20–30 хв після приймання і триває 6–8 год [1].

У фаховій літературі описані різні методи кількісного визначення зопіклону в лікарських формах; найбільш поширеними є хроматографічні методи аналізу, зокрема високоефективна рідинна [2–5] і газова хроматографія [6–8]. Деякі вчені рекомендують кількісно визначати зопіклон у всьому діапазоні рН методом полярографії, а низькі концентрації досліджуваної речовини – методом вольтамперометрії при рН=9 [9]. В основі описаного способу кількісного визначення зопіклону – метод капілярного електрофорезу [10].

Незважаючи на безумовні переваги, кожен із цих методів має ряд недоліків. Окремі з них є або недостатньо чутливими, або трудомісткими, або потребують дорогого устаткування.

Мета роботи

Розробка високочутливої, простої у виконанні і валідної спектрофотометричної методики визначення зопіклону в лікарських формах на основі реакції з бромтимоловим синім.

Матеріали і методи дослідження

Об'єкти дослідження – таблетки «Сонован» 7,5 мг («Pharmascience Inc.», Канада, серія № 7458042).

У роботі використали такі реагенти і розчинники: фармакопейний стандартний зразок зопіклону (ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», серія 1), бромтимоловий синій (Synex Pharma, Китай, партія 20081101), ацетон (Lab-Scan, Ірландія, партія 4164/11).

Аналітичне обладнання: спектрофотометр Specord 200, ваги електронні АВТ-120-5DM, ультразвукова баня ELMASONICE 60 Н.

Загальна методика визначення зопіклону. Аліквотну частину (0,2–0,3 мг) поміщали в мірну колбу на 10,00 мл, додавали 1,00 мл 0,125% розчину бромтимолового синього (БТС) в ацетоні і доводили ацетоном до позначки. Оптичну густину вимірювали щодо компенсаційного розчину, який не містить досліджуваної речовини, при довжині хвилі 400 нм. Як розчин порівняння використовували 0,025% розчин стандартного зразка зопіклону в ацетоні.

Визначення зопіклону в таблетках «Сонован». Точну наважку таблеткової маси, еквівалентну 4,5–8,0 мг зопіклону, переносили в мірну колбу на 25,00 мл, доводили ацетоном до позначки і перемішували на ультразвуковій бані при кімнатній температурі протягом 5 хв. Після цього розчин фільтрували, відкидаючи перші порції фільтрату. З наступних порцій фільтрату брали 1,00 мл розчину, переносили в мірну колбу на 10,00 мл й аналізували за загальною методикою. Паралельно проводили реакцію з 1,00 мл 0,025% розчину стандартного зразка зопіклону. Вміст речовини, що діє, розраховували за загальноприйнятою формулою.

Результати та їх обговорення

Аналітичне застосування сульфоталеїнових барвників відоме для кількісного визначення препаратів різних фармакологічних і хімічних груп. Це зумовлено здатністю кислотних форм реагентів утворювати комплекси з переносом заряду з речовинами, що містять у структурі основний атом азоту.

На підготовчому етапі дослідження встановили: зопіклон, що має основний центр у молекулі, утворює забарвлений продукт за реакцією із сульфоталеїновими барвниками.

Виходячи з даних про розчинність зопіклону та сульфоталеїнових барвників, добирали розчинник для цієї реакції. Експериментально встановили: найбільш доцільним є використання як розчинника ацетону, а як реагенту – бромкрезолового зеленого.

Імовірно, в результаті реакції між зопіклоном, що має надлишок електронної густини на атомі азоту, та БТС, який є донором протонів, утворюється комплекс із переносом заряду. Про це свідчить поява нової смуги поглинання при 400 нм, яка відсутня на спектрі реагенту (рис. 1).

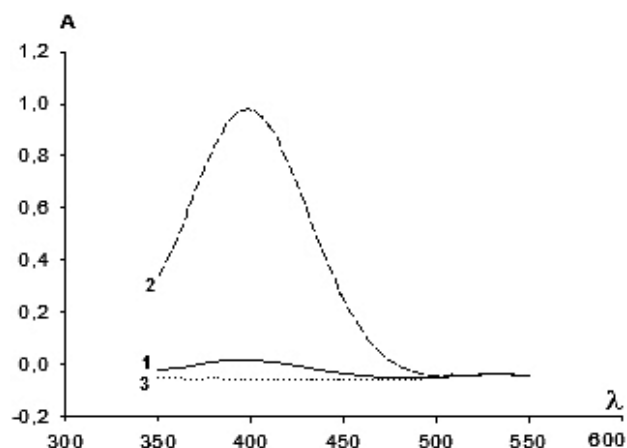


Рис. 1. Спектр поглинання БТС (1), продукту реакції зопіклону із БТС (2), зопіклону (3).

Отже, БТС реагує із зопіклоном в ацетоновому середовищі з утворенням забарвленого продукту жовтого кольору з максимумом світлопоглинання при 400 нм.

Оптимальну кількість реагенту обрали на основі максимального виходу продукту реакції. Температурний і часовий режими у цьому випадку не потребували корекції – реакція перебігає швидко і при кімнатній температурі.

Розраховане значення молярного коефіцієнта $1,82 \times 10^4$ свідчить про високу чутливість реакції.

Для визначення співвідношення стехіометричних коефіцієнтів між зопіклоном і БТС використовували метод молярних відношень (метод «насичення») і метод ізомолярних серій [11].

Зопіклон взаємодіє з БТС у співвідношенні 1:1 (рис. 2, 3).

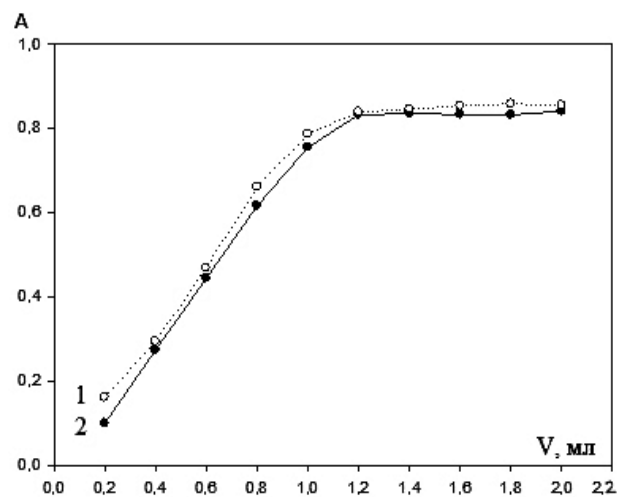


Рис. 2. Криві насичення БТС при постійній концентрації зопіклону (1) і зопіклону при постійній концентрації БТС (2).

Валідація аналітичної методики. За вимогами ДФУ провели процедуру валідації для розробленої методики. Основні валідаційні характеристики (лінійність, прецизійність, правильність і робастність) встановили за стандартизованою процедурою валідації методом стандарту [11].

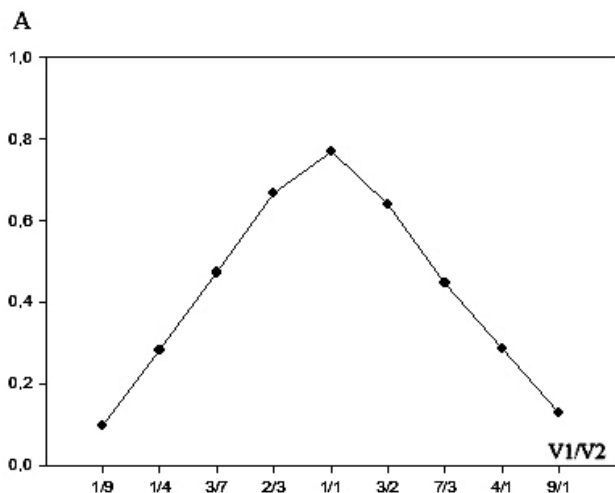


Рис. 3. Залежність величини оптичної густини від складу ізомлярного розчину (V₁ – 0,0005 М розчин БТС, V₂ – 0,0005 М розчин зопіклону).

Лінійна залежність. Лінійність визначали у межах концентрацій, що відповідають 80–120% від номінального вмісту таблеток.

Основні показники лінійної залежності наведено у таблиці 1, з якої видно, що лінійність методики підтверджується в усьому діапазоні концентрацій.

Таблиця 1

Основні параметри лінійної залежності

Величина	Значення	Критерії	Висновок
$b \pm (s_b)$	0,5031 ± (0,0132)	–	–
$a \pm (s_a)$	-0,0472 ± (0,0334)	$a \leq \Delta a = t(95\%; 3) \cdot S_a = 0,0014$	відповідає
$s_{x,0}(\%)$	0,835	$\leq \Delta_{As}(\%) / t(95\%; 3) = 1,360$	відповідає
r	0,9990	$\geq 0,9963$	відповідає

Прецизійність методики визначали для кожної лікарської форми на рівні збіжності. Для цього в кожному випадку проводили 9 паралельних визначень (3 наважки, 3 повтори), а за результатами розраховували валідаційні характеристики (табл. 2). Визначили, що в усіх випадках однібічний довірчий інтервал Δ_x не перевищує максимально допустимі невизначеність аналізу, тому методика є точною на рівні збіжності.

Правильність визначали методом добавок. Для цього до розчину мінімальної наважки лікарських засобів тричі додавали 3 різні порції розчину робочого стандартного зразка зопіклону. Так отримували по 3 розчини трьох

концентрацій зопіклону, що лежать у межах підпорядкування основному закону Бера. Далі вимірювали оптичну густину отриманих розчинів. Результати визначень можна вважати правильними, оскільки систематична похибка статистично не відрізняється від нуля, тобто справжнє значення величини не виходить за межі встановленого довірчого інтервалу (табл. 3).

Таблиця 2

Визначення збіжності результатів кількісного визначення (n=9, p=0,95)

Вміст	Метрологічні характеристики			
	\bar{X}	S	RSD	$\Delta_{x,r} \leq \Delta_{As}(\%)$
7,5 мг	7,5 мг	$2,69 \cdot 10^{-2}$	0,36	$0,67 < 3,20$

Таблиця 3

Визначення правильності методики із застосуванням методу добавок

Величина	\bar{Z}	RSD	Δ_z	$ \bar{Z} - 100 \leq \Delta_x / \sqrt{n}$
Значення	100,2	1,32	2,45	$0,2 < 0,81$

Робасність методики визначали на стадії розробки. Для цього визначали стабільність аналітичних розчинів у часі та вплив кількості доданих реагентів на результати визначення. Встановили, що забарвлені розчини, які досліджували, стійкі не менше ніж 30 хв, а коливання кількості доданого реагенту в межах $\pm 10\%$ не впливає на величину оптичної густини.

Висновки

1. Вивчили умови фотометричних реакцій сульфопталейнових барвників із зопіклоном, обрали БТС в ацетоновому середовищі як оптимальний реагент для кількісного визначення зопіклону у таблетках «Сонован» і розрахували аналітичні показники чутливості реакції.

2. Запропонували точну, економічну та швидку спектрофотометричну методику кількісного визначення зопіклону у таблетках «Сонован» за реакцією з БТС.

3. Доведено, що розроблена методика кількісного визначення зопіклону в таблетках «Сонован» за такими характеристиками, як лінійність, прецизійність, правильність і робасність є валідною і може використовуватись у фармацевтичних і криміналістичних аналітичних лабораторіях.

Список літератури

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства : в 2 т. / М.Д. Машковский. – М., 2012. – Т. 1. – 32 с.
2. Hsua R. Direct quantitative analysis of benzodiazepines, metabolites, and analogs in diluted human urine by rapid resolution liquid chromatography–tandem mass spectrometry / R. Hsua, Sh.-A. Chanb, Sh.-L. Lina // Journal of Food and Drug Analysis. – 2013. – Vol. 21. – № 4. – P. 376–383.
3. Nielsen M.K.K. Pre-analytical and analytical variation of drug determination in segmented hair using ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry / M.K.K. Nielsen, S.S. Johansen, K. Linnet // Forensic Science International. – 2014. – Vol. 234. – P. 16–21.
4. Rapid and quantitative screening method for 43 benzodiazepines and their metabolites, zolpidem and zopiclone in human plasma

- by liquid chromatography/mass spectrometry with a small particle column / [T. Ishida, K. Kudo, M. Hayashida, N. Ikeda] // J. of Chromatography B. – 2009. – Vol. 877. – № 25. – P. 2652–2657.
5. A fast liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determining benzodiazepines and analogues in urine. Validation and application to real cases of forensic interest / [A. Salomone, E. Gerace, P. Brizio, M.C. Gennaro, M. Vincenti] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2011. – Vol. 56. – № 3. – P. 582–591.
6. Adamowicz P. Simultaneous screening for and determination of 128 date-rape drugs in urine by gas chromatography–electron ionization–mass spectrometry / P. Adamowicz, M. Kała // Forensic Science International. – 2010. – Vol. 198. – № 1–3. – P. 39–45.

7. Stability tests of zopiclone in whole blood / [G.H. Nilsson, F.C. Kugelberg, R. Kronstrand, J. Ahlner] // *Forensic Science International*. – 2010. – Vol. 200. – № 1–3. – P. 130–135.
 8. Development and validation of an EI–GC–MS method for the determination of benzodiazepine drugs and their metabolites in blood: Applications in clinical and forensic toxicology / [I.I. Papoutsis, S.A. Athanaselis, P.D. Nikolaou, C.M. Pistos, C.A. Spiliopoulou, C.P. Maravelias] // *J. of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. – 2010. – Vol. 52. – № 4. – P. 609–614.
 9. Electrochemical behavior of zopiclone / [J.-C. Viré, H. Zhang, G. Quarin et al.] // *Talanta*. – 1993. – Vol. 40. – № 3. – P. 313–323.
 10. Szökő É. Analysis of biological samples by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection / É. Szökő, T. Tábi // *J. of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. – 2010. – Vol. 53. – № 5. – P. 1180–1192.
 11. Державна Фармакопея України. – 1-е вид. – Харків : Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – Доп. 2. – 620 с.
- References**
1. Mashkovskij, M. D. (2012) *Lekarstvennie sredstva [The medicaments]*. Moscow : Novaia volna. [in Russian].
 2. Hsua, R., Chanb, S., Lina, S., Lina, T., Chuc, W., Fuh, M. (2013). Direct quantitative analysis of benzodiazepines, metabolites, and analogs in diluted human urine by rapid resolution liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Food and Drug Analysis*, 21(4), 376–383. doi: 10.1016/j.jfda.2013.08.005. ISSN: 1021-9498.
 3. Nielsen, M. K. K., Johansen, S. S., Linnet, K. (2014). Pre-analytical and analytical variation of drug determination in segmented hair using ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Forensic Science International*, 234, 16–21. doi: 10.1016/j.forsciint.2013.10.029.
 4. Ishida, T., Kudo, K., Hayashida, M., Ikeda, N. (2009). Rapid and quantitative screening method for 43 benzodiazepines and their metabolites, zolpidem and zopiclone in human plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with a small particle column. *J. of Chromatography B*. 877(25), 2652–2657. doi: 10.1016/j.jchromb.2009.05.008.
 5. Salomone, A., Gerace, E., Brizio, P., Gennaro, M. C., Vincenti, M. (2011). A fast liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determining benzodiazepines and analogues in urine. Validation and application to real cases of forensic interest. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56(3), 582–591. doi: 10.1016/j.jpba.2011.06.007. doi: 10.1016/j.forsciint.2010.02.012.
 6. Adamowicz, P., Kała, M. (2010). Simultaneous screening for and determination of 128 date-rape drugs in urine by gas chromatography–electron ionization–mass spectrometry. *Forensic Science International*, 198(1–3), 39–45. doi: 10.1016/j.forsciint.2010.02.012.
 7. Nilsson, G. H., Kugelberg, F. C., Kronstrand, R., Ahlner, J. (2010). Stability tests of zopiclone in whole blood. *Forensic Science International*, 200(1–3), 130–135. doi: 10.1016/j.forsciint.2010.04.001.
 8. Papoutsis, I. I., Athanaselis, S. A., Nikolaou, P. D., Pistos, C. M., Spiliopoulou, C. A., Maravelias, C. P. (2010). Development and validation of an EI–GC–MS method for the determination of benzodiazepine drugs and their metabolites in blood: Applications in clinical and forensic toxicology. *J. of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 52(4), 609–614. doi: 10.1016/j.jpba.2010.01.027.
 9. Viré, J. C., Zhang, H., Quarin, G. (1993). Electrochemical behavior of zopiclone. *Talanta*, 40(3), 313–323.
 10. Szökő, É., Tábi, T. (2010). Analysis of biological samples by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection. *J. of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 53(5), 1180–1192. doi: 10.1016/j.jpba.2010.07.045.
 11. (2008). *Derzhavna Farmakopeia Ukrainy [State Pharmacopoeia of Ukraine]* Kharkov: Naukovo-ekspertnii farmakopeinii centr. [in Ukrainian].

Відомості про авторів:

Загородній С.Л., заочний аспірант каф. аналітичної хімії, Запорізький державний медичний університет, експерт науково-дослідного експертно-криміналістичного центру при ГУМВС України в Запорізькій області, E-mail: zsvjat@gmail.com.

Васюк С.О., д. фарм. н., професор, зав. каф. аналітичної хімії, Запорізький державний медичний університет.

Надійшла в редакцію 30.04.2014 р.