

УДК 340.67:543.51/.544.43:615.074

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ – МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ДЕРИВАТОВ МЕТАБОЛИТОВ ЗОЛПИДЕМА И ПРОДУКТА ЕГО ГИДРОЛИЗА

¹Крылова Е.А., ¹Катаев С.С., ²Хомов Ю.А.

¹ГКУЗОТ «Пермское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы»,
Пермь, e-mail: plash80@yandex.ru;

²ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства
здравоохранения Российской Федерации, Пермь, e-mail: hotov@pfa.ru

Получены и представлены аналитические данные по идентификации различных дериватов метаболитов золпидема и продукта его гидролиза методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии с ионизацией электронным ударом (GC-MS-EI). Предложенная методика предполагает малый расход биологического объекта (2 мл мочи), проведение ферментативного гидролиза для разрушения конъюгатов метаболитов золпидема, применение для изолирования аналитов твердофазной экстракции (ТФЭ), которая выполняется на обращённо-фазном сорбенте со свойствами сильного катионита. Для дериватизации использовались различные реакции: ацилирования, алкилирования, получения триметилсилильных эфиров, – это позволило получить летучие, термостабильные дериваты метаболитов золпидема и продукта его гидролиза, обладающих специфической масс-фрагментацией. Применённые аналитические подходы позволили описать газохроматографические и масс-спектральные характеристики различных дериватов метаболитов золпидема и продукта его гидролиза, что даёт возможность с высокой чувствительностью проводить их идентификацию в моче при выполнении химико-токсикологических и судебно-химических исследований.

Ключевые слова: метаболиты золпидема, продукт гидролиза золпидема, твердофазная экстракция, дериватизация, газовая хроматография – масс-спектрометрия

APPLICATION OF GAS CHROMATOGRAPHY MASS-SPECTROMETRY FOR DETERMINATION OF DIFFERENT DERIVATES OF ZOLPIDEM METABOLITES AND HYDROLYSIS PRODUCT

¹Krylova E.A., ¹Kataev S.S., ²Khomov Y.A.

¹Perm Kray Bureau of Forensic Medicine, Department of forensic chemistry,
Perm, e-mail: plash80@yandex.ru;

²Perm State Pharmaceutical academy, Perm, e-mail: perm@pfa.ru

Analytical data for identification of different derivatives of zolpidem metabolites and hydrolysis product by gas chromatography mass spectrometry with ionization by electron impact (GC-MS-EI) are received and described. Suggested method assumes a small expense of biological object (2 ml of urine), carrying out of enzyme hydrolysis for destruction of conjugates of zolpidem metabolites, usage of solid phase extraction (SPE) for isolation of analytes. SPE is performed on reversed phase sorbent with properties of strong cationite. Reactions of acylation, alkylation, silylation are used for derivatisation. It allowed to receive flying, thermostable derivatives of zolpidem metabolites and hydrolysis product with specific mass fragmentation. The applied analytical approaches allowed to describe gas chromatographic and mass spectral characteristics of different derivatives of zolpidem metabolites and hydrolysis product that gives the chance to carry out their identification in urine with high sensitivity during toxicological and forensic investigations.

Keywords: zolpidem metabolites, zolpidem hydrolysis product, solid-phase extraction (SPE), derivatisation, gas chromatography mass spectrometry

Золпидем – это небензодиазепиновый снотворный препарат, химическое название – N,N,6-триметил-2-(4-метилфенил)имидазо[1,2-a]пиридин-3-ацетамид. Золпидем быстро всасывается в тонком кишечнике, имеет короткий период полувыведения (0,7–3,5 ч) [2], метаболизируется до фармакологически неактивных метаболитов и экскретируется в неизменном виде менее чем на 1% [1, 4]. Поэтому очевидна необходимость определения именно метаболитов для эффективного выявления факта приема золпидема при проведении химико-токсикологического анализа (ХТА).

Золпидем в своей структуре содержит амидную связь, которая способна гидролизоваться с образованием продукта гидролиза золпидема. Обнаружение этого продукта может иметь большое значение при анализе длительно хранившейся мочи, когда за счет разложения мочевины происходит увеличение pH образца и, как следствие – гидролиз золпидема, что приводит к значительному снижению концентрации нативного вещества [3], которое и так выводится в следовых количествах.

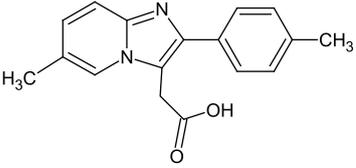
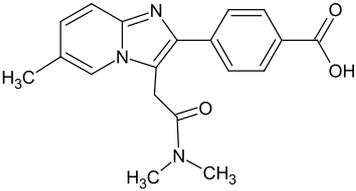
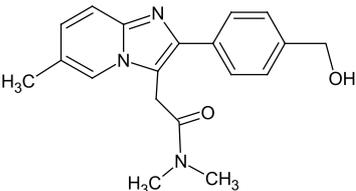
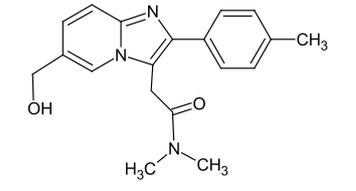
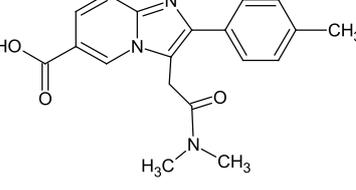
Сведения по анализу метаболитов золпидема в мировой научной литературе

единичны и представляют собой разрозненные и несистематизированные материалы. Метаболиты золпидема и продукт его гидролиза содержат в своей структуре

полярные функциональные группы (–ОН и –СООН), придающие анализам свойства труднолетучих в условиях газовой хроматографии (ГХ) веществ (табл. 1).

Таблица 1

Метаболиты золпидема, продукт его гидролиза и их некоторые физико-химические характеристики

Структурная формула	Название	pKa (-COOH)	LogP (цвиттер-ион)
	Продукт гидролиза золпидема (ЗГ)	6,46 ± 0,70 (3,85 ± 0,10)	2,82 ± 0,61 (0,32 ± 1,0)
	4'-(карбоксии)-золпидем (4'-К3)	5,02 ± 0,70 (3,23 ± 0,10)	1,46 ± 0,64 (1,01 ± 1,0)
	4'-(гидроксиметил)-золпидем (4'-ГМЗ)	4,96 ± 0,70	0,71 ± 0,64
	6-(гидроксиметил)-золпидем (6-ГМЗ)	5,15 ± 0,70	1,15 ± 0,64
	6-(карбоксии)-золпидем (6-К3)	5,62 ± 0,50 (2,30 ± 0,20)	1,54 ± 0,65 (-0,96 ± 1,0)

Поэтому для их исследования требуется получение летучих дериватов. В литературе описаны данные только о масс-фрагментации этильного деривата главного метаболита золпидема (4'-К3) [5], а также триметилсилильных производных 4'-ГМЗ, 6-ГМЗ, 4'-К3 и 6-К3 [6]. Данных о масс-спектрах различных производных продукта гидролиза золпидема в литературе не представлено.

Целью настоящей работы явилось изучение газохроматографических и масс-спектральных характеристик различных производных метаболитов золпидема и продукта его гидролиза после дериватизации с применением алкилирования метилйодидом, этанолом, изопропилийодидом, пентафторпропанолом, ацетилирования, получения триметилсилильных эфиров.

Материалы и методы исследования

Золпидема тартрат (порошок-субстанция, Испания, НД 42-13447-05); β -глюкуронидаза (Type HP-2, From Helix Pomatia, 101400 ЕД/мл, Sigma-ALDRICH Inc.); 2,2,3,3,3-пентафторпропанол и 2,2,3,3,3-пентафторпропионовый ангидрид («ICN Biomedicals», США); бис-триметилсилил-трифторацетамид (BSTFA), содержащий 1% триметилхлорсилана (Sigma Chemical, Co; Sigma-ALDRICH CHEM, Germany); метилйодид (Вектон, Шосткинский завод химреактивов), изопропилийодид (Вектон, Шосткинский завод химреактивов). Все используемые прочие растворители и реактивы имели чистоту х.ч. Применялись картриджи для ТФЭ AccuBond II EVIDEX и SampliQ Evidex – 200 мг – 3 мл (Agilent, США). Оборудование: газовый хроматограф Agilent 6850, оснащенный капиллярной кварцевой колонкой HP-5MS длиной 30 м с внутренним диаметром 0,25 мм и толщиной пленки неподвижной фазы 0,25 мкм. Масс-селективный детектор Agilent 5973N (Agilent, США). Для твердофазной экстракции применяли: систему с вакуумной камерой (манифолд) на 12 позиций (Supelico), насос низкого вакуума (AIR CADET, США). Для выполнения реакции гидролиза и процедур дериватизации использовались термоблок ПЭ-4030 (ОАО «Экрос», Россия) и микроволновая печь Rolsen MS 1770 SA (Россия). При выполнении работы также применялись: микровстряхиватель ПЭ-2 (ОАО «Экрос», Россия), полуавтоматические пипетки-дозаторы, позволяющие отбирать объемы жидкостей 4–40, 40–200, 200–1000 мкл и 1–5 мл. Исследовали образцы мочи испытуемых лиц, полученные после перорального приема однократной терапевтической дозы золпидема тартрата (10 мг). Параллельно анализировали контрольные образцы мочи, собранные у тех же лиц до приема золпидема тартрата. Полученные образцы мочи хранились при -20°C , перед исследованиями мочу согревали до комнатной температуры.

Пробоподготовка образцов мочи: к 2 мл мочи прибавляют 0,5 мл 1/15 М фосфатного буфера pH 6,0, 0,1 мл β -глюкуронидазы (10140 ЕД), перемешивают, герметично укупуоривают и экспонируют в течение 2 часов при 45°C . Полученный гидролизат центрифугируют при 2000 об/мин в течение 5 минут. Центрифугат отделяют от осадка, прибавляют 2,5 мл 1/15 М фосфатного буфера (pH 5,4) и подвергают ТФЭ по схеме: кондиционирование сорбента осуществляют последовательным промыванием 2 мл 95% этанола и 2 мл 1/15 М фосфатного буфера pH 5,4. Загрузку анализируемого образца мочи осуществляют со скоростью 1,0 мл/мин, после чего промывают сорбент последовательным пропуском 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 осуществляют в отдельный флакон со скоростью 1,0 мл/мин смесью дихлорметан–2-пропанол–25% раствор аммиака (2:1:0,1) дважды порциями по 2 мл. Элюат испаряют досуха в токе азота при 60°C .

Дериватизация метаболитов золпидема и продукта его гидролиза

Алкилирование метилйодидом (метилирование). К сухому остатку в реакционной вiale прибавляли 20–25 мг прокаленного калия карбоната, 500 мкл безводного ацетона, 40 мкл йодистого метила и выдерживали в термоблоке в течение 45 ми-

нут при 60°C . После охлаждения вials вскрывали, 200 мкл ацетонового раствора испаряли досуха в токе азота при 60°C .

Алкилирование изопропилийодидом. К сухому остатку в реакционной вiale прибавляли 20–25 мг прокаленного калия карбоната, 500 мкл безводного ацетона, 40 мкл изопропилийодида и выдерживали в термоблоке в течение 45 минут при 60°C . После охлаждения вials вскрывали, 200 мкл ацетонового раствора испаряли досуха в токе азота при 60°C .

Алкилирование пентафторпропанолом. К сухому остатку в реакционной вiale прибавляли 25 мкл 2,2,3,3,3-пентафторпропанола и 75 мкл 2,2,3,3,3-пентафторпропионового ангидрида и далее реакционную смесь подвергали СВЧ-излучению мощностью 560 Вт в течение 5 мин. После охлаждения реагенты испаряли досуха в токе азота при 60°C . Сухой остаток растворяли в 200 мкл безводного этилацетата.

Ацетилирование. К сухому остатку в реакционной вiale прибавляли 40 мкл безводного пиридина и 60 мкл уксусного ангидрида; реакционную смесь подвергали СВЧ-излучению мощностью 560 Вт в течение 5 мин. После охлаждения реагенты испаряли досуха в токе азота при 60°C . Сухой остаток растворяли в 200 мкл безводного этилацетата.

Силилирование. К сухому остатку в реакционной вiale прибавляли 100 мкл бис-триметилсилил-трифторацетамида (БСТФА), содержащего 1% триметилхлорсилана, герметично укупуоривали и помещали в термоблок на 30 минут при 80°C . После охлаждения вials вскрывали и 1 мкл исследуемого раствора вводили в хромато-масс-спектрометр с использованием устройства для автоматического ввода проб.

Алкилирование этанолом проводили действием пентафторпропионового ангидрида при добавлении к образцу этанола; процедуру дериватизации осуществляли под действием СВЧ-излучения мощностью 560 Вт в течение 4 минут.

Газохроматографические и масс-спектральные условия: Режим работы ГХ/МС для проб в условиях скрининга: температура инжектора и интерфейса 250 и 280°C , температура колонки: начальная 70°C в течение 2 мин и прогрев до 280°C со скоростью программирования 20 град/мин; выдержка при температуре 280°C в течение 12 минут, затем прогрев до 300°C со скоростью программирования 20 град/мин; выдержка при конечной температуре 5 мин. Ввод без деления потока газа-носителя. Регистрация масс-спектров в режиме полного сканирования масс 45–450 а.е.

Результаты исследования и их обсуждение

Этап дериватизации сухих остатков после проведения ТФЭ из мочи необходим для дальнейшего определения методом ГХ полученных летучих производных метаболитов золпидема и продукта его гидролиза. Для определения гидроксиметаболитов золпидема возможно проведение ацетилирования, для карбоксиметаболитов и продукта гидролиза – алкилирования. Для всех метаболитов золпидема и продукта его гидролиза возможно получение их триметилсилильных эфиров.

В результате проведенных исследований стало возможным обнаружение метаболитов золпидема и продукта его гидролиза по полученным их газохроматографическим и масс-спектральным характеристикам, которые представлены в табл. 2.

Таблица 2

Газохроматографические и масс-спектральные характеристики производных метаболитов золпидема и продукта его гидролиза

Метаболит	Производное	t_R , мин	Характеристические ионы, m/z (интенсивность, %)
4'-ГМЗ	CH ₃ C(O)-	20,60	293 (100); 233 (53); 294 (19,7); 365 (17,8); 271 (19,7); 234 (13,1); 219 (12,2)
	(CH ₃) ₃ Si-	19,46	323 (100); 324 (27,3); 73 (19,3); 233 (17,6); 395 (15,5); 234 (8,3); 249 (8); 154 (6,1); 293 (5,7); 396 (5,7); 219 (4,9); 92 (4,7); 380 (3,8)
6-ГМЗ	CH ₃ C(O)-	19,41	293 (100); 294 (15,9); 365 (9,4); 234 (7,5); 72 (5,5); 233 (5,4); 251 (5,1); 249 (4,5); 219 (3,9)
	(CH ₃) ₃ Si-	18,39	323 (100); 324 (27,1); 73 (10,8); 395 (9,4); 325 (7); 234 (5,9); 219 (5,2); 233 (4,9); 72 (3,1); 218 (3,1); 396 (2,8)
4'-КЗ	CH ₃ -	20,00	279 (100); 219 (29,1); 280 (21,5); 220 (15); 351 (13,1); 92 (4,7); 72 (4,1); 65 (4,1)
	CF ₃ CF ₂ CH ₂ -	17,28	397 (100); 219 (23,3); 398 (22); 220 (12,5); 469 (9,4); 72 (3,8); 92 (3,3)
	(CH ₃) ₃ Si-	22,08	337 (100); 338 (26,7); 73 (24); 219 (17); 220 (14,3); 409 (13); 161 (11,6); 221 (8,4); 339 (7,8); 394 (7,8); 110 (7,7); 124 (7,4)
6-КЗ	CH ₃ -	18,97	279 (100); 280 (20,3); 351 (11,1); 219 (6,4); 263 (4,5); 264 (3,9); 72 (3,5); 277 (3,2); 220 (2,9)
	CF ₃ CF ₂ CH ₂ -	16,52	397 (100); 398 (21,2); 469 (9,6); 219 (6,3); 72 (5,4); 381 (4,6); 220 (4,5); 205 (2,7)
	(CH ₃) ₃ Si-	19,96	337 (100); 338 (26,5); 409 (8,7); 339 (7,1); 219 (6,4); 220 (6,1); 72 (5,6); 73 (5,5); 205 (3,2); 394 (3,1); 321 (2,8); 322 (2,8); 278 (2,5)
ЗГ	CH ₃ -	8,62	235(100), 294(24), 219(12)
	CH ₃ CH ₂ -	13,96	235(100), 308(27), 219(11)
	(CH ₃) ₂ CH ₂ -	13,93	235(100), 322(19), 219(9)
	CF ₃ CF ₂ CH ₂ -	12,80	235(100), 412(25), 219(9)
	(CH ₃) ₃ Si-	13,76	235(100), 352(16), 219(10)

При интерпретации масс-спектров полученных производных была выявлена закономерность, характерная для производных основных метаболитов золпидема, заключающаяся в том, что при их масс-фрагментации образуются соответствующие молекулярные ион-радикалы и фрагментные ионы [M-72]⁺, имеющие выраженные пики на хроматограммах (рисунок).

Применение того или иного вида дериватизации в каждой отдельно взятой химико-токсикологической или судебно-химической лаборатории зависит от ее технического и материального оснащения, сложившихся традиционных предпочтений и имеющихся в наличии масс-спектральных библиотек. Но необходимо отметить, что получение ТМС-производных удобно на практике, т.к. силирование позволяет одновременно в одной

пробе получить триметилсилильные эфиры гидрокси- и карбоксиметаболитов золпидема, а также продукта его гидролиза.

Заключение

Применение различных способов дериватизации в сочетании с ТФЭ для последующего ГХ/МС анализа позволяет выявить при совместном присутствии золпидем, его метаболиты, а также продукт гидролиза, которые значительно различаются по физико-химическим свойствам. Без дериватизации продукт гидролиза золпидема и ни один из его метаболитов не обнаруживается. Методики могут быть использованы на практике врачами клинической лабораторной диагностики химико-токсикологических лабораторий и врачами судебно-медицинскими экспертами бюро судебно-медицинской экспертизы.

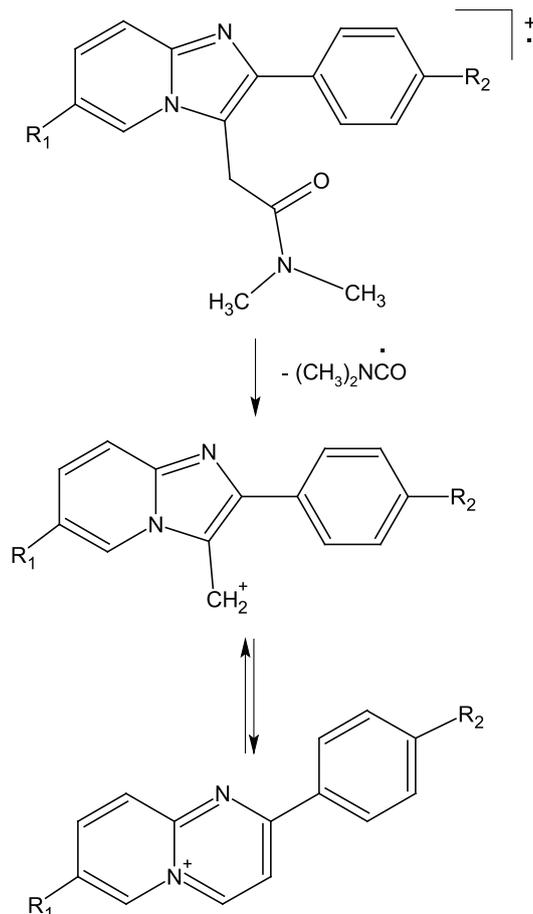


Схема образования и стабилизации иона $[M-72]^+$ из молекулярного ион-радикала золпидема и производных его основных метаболитов (4'-ГМЗ, 6-ГМЗ, 4'-КЗ, 6-КЗ)

Список литературы

1. Большой справочник лекарственных средств / под ред. Л.Е. Зиганшиной, В.К. Лепехина, В.И. Петрова, Р.У. Хабриева. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – С. 988–989.
2. Машковский М.Д. Лекарственные средства. – 16-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: Новая волна: Издатель Умеренков, 2010. – С. 32.
3. Hariri B. L'influence du processus de putrification sur l'identification du zolpidem dans les bio-liquids / B. Hariri, E.A. Krylova, Y.A. Khomov // Инновационные процессы в исследовательской и образовательной деятельности: I Международн. науч. конф.: тез. докл. – Пермь, 2012. – С. 106–107.
4. Hempel G. Direct determination of zolpidem and its main metabolites in urine using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection / G. Hempel, G. Blaschke // Journal of Chromatography B. – 1996. – Vol. 675, № 1. – P. 131–137.
5. Lewis J.H. A simple and rapid method for the identification of zolpidem carboxylic acid in urine / J.H. Lewis, J.H. Vine // Journal of Analytical Toxicology. – 2007. – Vol. 31, № 4. – P. 195–199.
6. Thermospray liquid chromatography tandem mass spectrometry: application to the elucidation of zolpidem metabolism / S. Vajta [et al.] // Biomedical and Environmental Mass Spectrometry. – 1988. – Vol. 15(4). – P. 223–228.

References

1. *Bol'shojspravochniklekarstvennyhsredstv* [Big reference book of medicines]. Moscow, GJeOTAR-Media, 2011, pp. 988–989.
2. *Mashkovskij M.D. Lekartstvennyesredstva* [Medicines]. Moscow, New wave, 2010, pp. 32.

3. Hariri, B. L'influence du processus de putrification sur l'identification du zolpidem dans les bio-liquids / B. Hariri, E.A. Krylova, Y.A. Khomov // *Innovacionnyeprocessy v issledovatel'skoj i obrazovatel'nojdetel'nosti. I Mezhdunarodn. nauch. konf.* [Innovative processes in research and educational activity. I International scientific conference]. Perm, 2012, pp. 106–107.

4. Hempel, G. Direct determination of zolpidem and its main metabolites in urine using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection / G. Hempel, G. Blaschke // *Journal of Chromatography B*. 1996. Vol. 675, № 1. pp. 131–137.

5. Lewis, J.H. A simple and rapid method for the identification of zolpidem carboxylic acid in urine / J.H. Lewis, J.H. Vine // *Journal of Analytical Toxicology*. 2007. Vol. 31, № 4. pp. 195–199.

6. Thermospray liquid chromatography tandem mass spectrometry: application to the elucidation of zolpidem metabolism / S. Vajta, J.P. Thenot, F. de Maack, G. Devant, M. Lesieur // *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry*. 1988. Vol. 15(4). pp. 223–228.

Рецензенты:

Михалев А.И., д.фарм.н., профессор, зав. кафедрой биологической химии, ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России, г. Пермь;

Гейн В.Л., д.х.н., профессор, зав. кафедрой общей и органической химии, ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России, г. Пермь.

Работа поступила в редакцию 26.03.2014.