

## ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЗОПІКЛОНУ В ТАБЛЕТКАХ МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

**Ключові слова:** вискоелективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), зопіклон, валідація, кількісне визначення

Зопіклон, (6-(5-хлор-2-піридинил)-6,7-дигідро-7-оксо-5Н-пірроло[3,4-*b*]піразин-5-іловий естер 4-метил-1-піперазінкарбонової кислоти) – це 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 у разі ситуативного безсоння, пов'язаного з психоемоційною напругою, зміною звичного ритму життя (наприклад за госпіталізацією), десинхронізом, в т. ч. під час зміни часових поясів, позмінного режиму роботи. Сон настає протягом 20–30 хв після прийому і триває 6–8 год [1].

Зопіклон посилює дію алкоголю та препаратів, що пригнічують центральну нервову систему (похідні морфіну, седативні препарати, антидепресанти, барбітурати тощо), що може призвести до підсилення депресій та підвищення ризику суїциду. Застосування разом з похідними морфіну підвищує ризик зупинки дихання [3]. Виражена дія на центральну нервову систему призвела до поширення випадків зловживання зопіклоном у немедичних цілях для потенціювання дії наркотичних засобів та психотропних речовин [2].

У літературі описано різні методи кількісного визначення зопіклону в лікарських формах за допомогою газової хроматографії [4, 5, 6]. Деякі вчені рекомендують кількісно визначати зопіклон у всьому діапазоні рН методом полярографії, а низькі концентрації досліджуваної речовини – методом вольтамперометрії за рН = 9 [7]. Описано спосіб кількісного визначення зопіклону, заснований на методі капілярного електрофорезу [8]. Уже давно в практику хімічного аналізу ввійшов метод вискоелективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), що характеризується високою чутливістю, специфічністю, простотою та швидкістю. Цей метод рекомендовано Державною фармакопеею України (ДФУ) [9] та Європейською фармакопеею [10].

У літературі описано численні способи кількісного визначення зопіклону, які ґрунтуються на використанні ВЕРХ, але не були валідовані за вимогами ДФУ [11, 12, 13, 14].

**Мета роботи** – опрацювання та валідація за вимогами ДФУ зручної, економічної, високочутливої методики кількісного визначення зопіклону в лікарських формах методом ВЕРХ.

### Матеріали та методи дослідження

Для виконання дослідження було використано фармакопейний стандартний зразок зопіклону (ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», серія 1) та лікарські засоби – таблетки Зопіклон 7,5 мг (ВАТ «Лубнифарм», Україна), таблетки Соннат-КМП 7,5 мг (ВАТ «Київмедпрепарат», Україна), серії 130510 та 42571 відповідно. Розчинники та реактиви класу чистоти «ч. д. а.»

Визначення здійснювали на хроматографі Thermo Spectra System 2000 (США), використовували ваги електронні KERN ABT-120-5DM (Німеччина), мірний посуд класу А.

*Загальна методика кількісного визначення зопіклону.* Аліквотну частину (0,0002 г) розчину зопіклону в рухомій фазі вміщують у мірну колбу ємністю 10,00 мл, доводять рухомою фазою до позначки та перемішують. Виконують хроматографування за умов: колонка – оберненофазова Hypersil Gold C18, Thermo Scientific TM,  $4 \times 150$  мм, розмір частинок сорбенту – 5 мкм, рухома фаза – суміш фосфатний буфер:ацетонітрил у співвідношенні 80:20, швидкість потоку – 1 мл/хв, детектор – УФ-спектрофотометричний, довжина хвилі 304 нм, інжектор напівавтоматичний, об'єм проби – 20 мкл.

*Приготування фосфатного буфера.* У 1 л дистильованої води розчиняють 3,0 г гідроксиду калію, 12,0 г 82%-ї ортофосфорної кислоти та 3,0 г діетиламіну. Розчин вказаного складу має рН рівне 3. У разі відхилення від зазначеної величини рН здійснюють корегування, додаючи ортофосфорну кислоту або гідроксид калію.

*Приготування рухомої фази для розчинів.* Фосфатний буфер змішують з ацетонітрилом у співвідношенні 80:20, ретельно перемішують та фільтрують через мембранний фільтр з розміром пор не більше 20 мкм.

*Кількісне визначення зопіклону в таблетках.* Точну наважку ретельно розтертої таблеткової маси (аліквотну 0,005 г зопіклону) розчиняють у 3 мл рухомої фази в склянці на 25 мл, фільтрують одержаний розчин у мірну колбу ємністю 25,00 мл, склянку ополіскують двома порціями рухомої фази по 2 мл, які теж переносять на фільтр, фільтр додатково промивають 2 мл рухомої фази двічі, доводять одержаний розчин до позначки тим самим розчинником і перемішують. 1,00 мл одержаного розчину переносять у мірну колбу ємністю 10,00 мл і аналізують за загальною методикою. Розрахунок вмісту діючої речовини виконують за типовою формулою.

### **Результати дослідження та обговорення**

Метод ВЕРХ широко застосовують у хімічному аналізі для кількісного дослідження лікарських засобів різних фармакологічних груп та хімічних властивостей. По-перше, це зумовлено широкою універсальністю методу, що дає змогу без значних змін умов аналізу досліджувати різні за молекулярною структурою речовини. А по-друге, високою селективністю відносно хроматографічних показників різних речовин.

Вибрану для досліджень методику можна виконати на обладнанні досить поширеного типу. УФ-спектрометричний детектор у поєднанні з оберненофазовою колонкою дає можливість досліджувати дуже широке коло лікарських речовин. Також у цій методиці використовують недорогі й популярні розчинники – ацетонітрил та фосфатний буфер, і немає потреби у складній тривалій пробопідготовці. Тому можна зазначити, що обрана методика якнайкраще відповідає поставленій меті нашої роботи.

На підготовчому етапі дослідження було встановлено, що зопіклон має основний центр у молекулі, тому його добре хроматографувати саме на оберненофазовій колонці з досить кислотною рухомою фазою, якою і є вибрана суміш.

У результаті хроматографічного дослідження стандартного фармакопейного зразка зопіклону було отримано хроматограми, що містили один правильний пік зопіклону з часом утримування ( $t$ ) 7,54 хв, який був відсутній при хроматографуванні холостої проби (рисунок).

Було розраховано основні хроматографічні показники одержаних хроматограм, такі, як об'єм утримання ( $V$ ), коефіцієнт симетрії ( $A_s$ ), число теоретичних тарілок ( $N$ ), відношення сигнал/шум ( $S/N$ ), максимально припустиме відносне стандартне відхилення ( $RSD_{max}$ ), та відносне стандартне відхилення ( $RSD_{\%}$ ). Значення розрахованих показників свідчать про високу ефективність обраної хроматографічної системи (табл. 1).

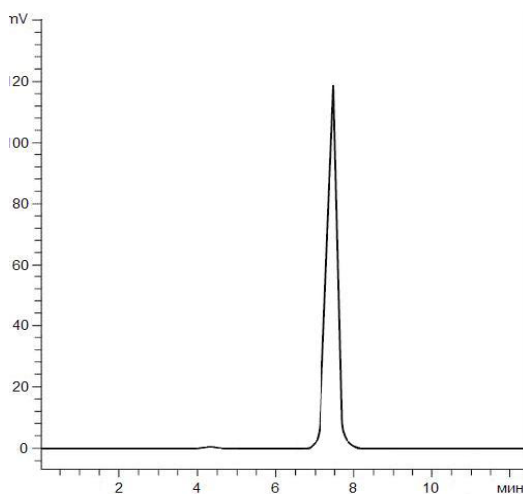


Рис. Хроматограма зопіклону, одержана за обраною методикою

Т а б л и ц я 1

**Основні параметри ефективності обраної хроматографічної системи**

$t$ , хв	$V$ , мл	$A_s$	$N$	$S/N$	$RSD_{max}$	$RSD_{\%}$
7,54	7,54	1,12	1210	416	1,73	1,16

*Валідація аналітичної методики.* За вимогами ДФУ було здійснено процедуру валідації для розробленої методики. Основні валідаційні характеристики, такі як лінійність, прецизійність та правильність встановлено за стандартизованою процедурою валідації методом стандарту [9].

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

Основні показники лінійної залежності наведено в табл. 2, з якої видно, що лінійність методики підтверджується в усьому діапазоні концентрацій, зазначених вище.

Т а б л и ц я 2

**Основні параметри лінійної залежності**

Величина	Значення	Критерії	Висновок
<i>Таблетки Зопіклон 7,5 мг (ВАТ «Лубнифарм», Україна)</i>			
$a \pm (S_a)$	$-25,2 \pm (60,1)$	$a \leq \Delta a = t (95\%; 3) \cdot S_a = 141$	Відповідає
$S_0/b$	0,024	$\leq \Delta_{As} (\%)/t (95\%; 3) = 1,36$	Відповідає
$r$	0,9986	$\geq 0,9963$	Відповідає
<i>Таблетки Соннат-КМП 7,5 мг (ВАТ «Київмедпрепарат», Україна)</i>			
$a \pm (S_a)$	$-101,8 \pm (56,5)$	$a \leq \Delta a = t (95\%; 3) \cdot S_a = 133$	Відповідає
$S_0/b$	0,022	$\leq \Delta_{As} (\%)/t (95\%; 3) = 1,36$	Відповідає
$r$	0,9989	$\geq 0,9963$	Відповідає

*Прецизійність* методики визначали для кожної лікарської форми на рівні збіжності. Для цього кожного разу виконували дев'ять паралельних визначень (три навески, три повтори), а за результатами розраховували валідаційні характеристики (табл. 3). Було встановлено, що в усіх випадках однієї довірчий інтервал  $\Delta_x$  не перевищує максимально допустиму невизначеність аналізу, тому методика є точною на рівні збіжності.

### Визначення збіжності результатів кількісного визначення досліджуваних лікарських препаратів

Вміст	Метрологічні характеристики			
	$\bar{X}$	$S_0$	RSD, %	$\Delta_{x,r} \leq \Delta_{As}(\%)$
<i>Таблетки Зопіклон 7,5 мг (ВАТ «Лубнифарм», Україна)</i>				
7,5 мг	7,45 мг	$7,8 \cdot 10^{-2}$	1,05	$1,95 < 3,20$
<i>Таблетки Соннат-КМП 7,5 мг (ВАТ «Київмедпрепарат», Україна)</i>				
7,5 мг	7,47 мг	$6,1 \cdot 10^{-2}$	0,82	$1,86 < 3,20$

П р и м і т к а: об'єм вибірки  $n = 9$ , довірча імовірність  $P = 95\%$ .

*Правильність* в обох випадках визначали методом добавок. Для цього до розчину мінімальної наважки лікарських засобів тричі додавали три різні порції розчину стандартного фармакопейного зразка зопіклону. Таким чином, одержували по три розчини трьох концентрацій зопіклону. Далі хроматографували одержані розчини за методикою, наведеною вище. Результати визначень можна вважати правильними, тому що систематична похибка статистично не відрізняється від нуля, тобто справжнє значення величини не виходить за межі встановленого довірчого інтервалу (табл. 4).

### Визначення правильності методики із застосуванням методу добавок

$\bar{Z}$	RSD, %	$\Delta \bar{Z}$	$ \bar{Z} - 100  \leq \Delta_x / \sqrt{n}$	Висновок
<i>Таблетки Зопіклон 7,5 мг (ВАТ «Лубнифарм», Україна)</i>				
101,77	3,25	6,04	$1,77 < 2,01$	Відповідає
<i>Таблетки Соннат-КМП 7,5 мг (ВАТ «Київмедпрепарат», Україна)</i>				
98,20	4,33	8,05	$1,80 < 2,68$	Відповідає

### В и с н о в к и

1. Вивчено умови хроматографування зопіклону методом оберненофазової високоефективної рідинної хроматографії. Обрано точну, економічну та швидку хроматографічну методику кількісного визначення зопіклону з використанням як рухомої фази суміші фосфатний буфер:ацетонітрил у співвідношенні 80:20.

2. Розраховано основні хроматографічні показники за обраною методикою, які свідчать про придатність хроматографічної системи відповідно до вимог ДФУ для кількісного аналізу зопіклону.

3. Доведено, що опрацьована методика кількісного визначення зопіклону, застосована до двох досліджуваних лікарських форм, за такими характеристиками як лінійність, прецизійність, правильність є валідною і може бути використана у фармацевтичних та криміналістичних аналітичних лабораторіях.

### Л І Т Е Р А Т У Р А

1. *Машковський М. Д.* Лекарственные средства: в 2 т. – М.: Новая волна, 2012. – Т. 1.
2. *Коваленко В. Н., Викторов А. П.* Компендиум 2008 – Лекарственные препараты. – К.: МОРИОН, 2008. – 2250 с.
3. *Шайдукова Л. К.* Классическая наркология. – Казань: Институт истории им. Ш. Марджани АН РТ, 2008. – 260 с.
4. *Adamowicz P., Kala M.* Simultaneous screening for and determination of 128 date-rape drugs in urine by gas chromatography-electron ionization-mass spectrometry // Forensic Science Inter. – 2010. – V. 198, N 1–3. – P. 39–45.

5. Nilsson G. H., Kugelberg F. C., Kronstrand R., Ahlner J. Stability tests of zopiclone in whole blood // *Ibid.* – 2010. – V. 200, N 1–3. – P. 130–135.
6. Papoutsis I. I., Athanaselis S. A., Nikolaou P. D. et al. 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. Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications.* – 2010. – V. 52, N 4. – P. 609–614.
7. Viré J.-C., Zhang H., Quarin G. et al. Electrochemical behavior of zopiclone // *Talanta.* – 1993. – V. 40, N 3. – P. 313–323.
8. Szökő É., Tábi T. Analysis of biological samples by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection // *J. Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications.* – 2010. – V. 53, N 5. – P. 1180–1192.
9. Державна фармакопея України. – 1-е вид. – Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – Доповнення 2. – 2008. – 620 с.
10. European Pharmacopeia. – 7-th edition – European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care. – 2010.
11. Ren-Yu Hsua, Shan-An Chanb, Shu-Ling Lina. Direct quantitative analysis of benzodiazepines, metabolites, and analogs in diluted human urine by rapid resolution liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *J. Food and Drug Analysis.* – 2013. – V. 21, N 4. – P. 376–383.
12. Nielsen M. K. K., Johansen S. S., Linnet K. Pre-analytical and analytical variation of drug determination in segmented hair using ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *Forensic Science Inter.* – 2014. – V. 234. – P. 16–21.
13. Ishida T., Kudo K., Hayashida M., Ikeda N. 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. Chromatography B.* – 2009. – V. 877, N 25 – P. 2652–2657.
14. Salomone A., Gerace E., Brizio P. et al. A fast liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determining benzodiazepines and analogues in urine. Validation and application to real cases of forensic interest // *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* – 2011. – V. 56, N 3. – P. 582–591.

Надійшла до редакції 15. 01. 2015.

*С. Л. Загородний, С. А. Васюк*

*Запорозький державний медичний університет*

#### ВАЛИДАЦІЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЗОПИКЛОНА В ТАБЛЕТКАХ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

**Ключевые слова:** высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), зопиклон, валидация, количественное определение

#### АННОТАЦИЯ

Зопиклон является небензодиазепиновым гипнотиком, используемым для лечения бессонницы. Он относится к циклопиролонам. Так же как и бензодиазепины, увеличивает передачу нейромедиатора – ГАМК в центральной нервной системе. Из-за своих побочных действий (потенцирования других снотворных, седативных, антигистаминных, алкоголя) зопиклон используют в немедицинских целях, и при передозировке он имеет токсикологическое значение. Исходя из того, что препараты зопиклона пользуются достаточно высоким спросом на фармацевтическом рынке Украины, целесообразность обеспечения надежного контроля качества этих препаратов не вызывает сомнений.

Цель работы – разработка и валидация согласно требованиям Государственной фармакопеи Украины удобной, экономичной и чувствительной методики количественного определения зопиклона в лекарственных формах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Использовано аналитическое оборудование: хроматограф Thermo Spectra System 2000, электронные весы KERN ABT-120-5DM, мерная посуда класса А. Фармацевтические препараты: таблетки Зопиклон 7,5 мг (Украина) и таблетки Соннат-КМП 7,5 мг (Украина).

Хроматографирование осуществляли при таких условиях: колонка – с обращенной фазой C18 Hypersil Gold, Thermo Scientific TM, 4 × 150 мм; размер частиц сорбента – 5 мкм; подвижная фаза – смесь фосфатный буфер:ацетонитрил в соотношении 80:20; скорость потока – 1 мл/мин; детектор – УФ спектрометрический при длине волны 304 нм; объем пробы – 20 мкл.

Предлагаемая методика была применена к двум лекарственным формам зопиклона – таблеткам по 7,5 мг, произведенным украинскими фармацевтическими компаниями. Основные валидационные характеристики предложенной методики удовлетворяют требованиям Государственной фармакопеи Украины.

Таким образом, разработана простая методика количественного определения зопиклона в фармацевтических препаратах, применимая для рутинного анализа. Согласно полученным 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.

**Key words:** high performance liquid chromatography (HPLC), zopiclone, validation, quantification

ABSTRACT

Zopiclone is a nonbenzodiazepine hypnotic agent used in the treatment of insomnia. It is a cyclopyrrolone, which increases the normal transmission of the neurotransmitter GABA in the central nervous system, as benzodiazepines do, but in a different way. Due to adverse events (potentiation of other hypnotics, sedatives, anti-allergy, alcohol) Zopiclone used for non-medical purposes, and in overdose has toxicological significance. Based on the fact, that Zopiclone drugs have fairly high demand in the pharmaceutical market, there is no doubt in the supplying desirability of worthy quality control of these drugs.

Purpose of this paper is study and validation of requirements for Ukrainian pharmacopoeia to find convenient, economical, highly sensitive methods of quantitative determination of Zopiclone in dosage forms by high performance liquid chromatography.

Analytical equipment: chromatograph Thermo Spectra System 2000, electronic scales KERN ABT-120-5DM, measuring vessel class A.

Pharmaceutical preparations: tablets Zopiclone 7.5 mg (Ukraine) and tablets Sonnat-KMP 7.5 mg (Ukraine).

Spend chromatography following conditions: column – reversed phase Hypersil Gold C18, Thermo Scientific TM, 4 × 150 mm; particle size sorbent – 5 mm; mobile phase – a mixture of phosphate buffer:acetonitrile in the ratio of 80:20; the flow rate – 1 ml/min; detector – UV spectrophotometric wavelength 304 nm; semi-injector volume of samples is 20 ml.

The proposed method is applied to the two dosage forms of Zopiclone – tablets to 7.5 mg, produced by various Ukrainian pharmaceutical companies. The main characteristics was validated by Pharmacopoeia of Ukraine.

Thus, the developed method is simple and useful for routine analysis of zopiclone in pharmaceutical formulations and in-process quality control. According to the experimental data, the technique can be correctly reproduced and it is suitable for using in pharmaceutical and forensic analytical laboratories.

*Електронна адреса для листування з авторами: zsvjat@gmail.com*