

Золпидем и его метаболиты как объекты химико-токсикологического анализа и исследований для экспертных целей

КРЫЛОВА Е.А.^{1,2} врач судебно-медицинский эксперт, соискатель кафедры фармацевтической химии ФДПО и ФЗО
КАТАЕВ С.С.¹ канд.хим.н., врач судебно-медицинский эксперт
ХОМОВ Ю.А.² д.фарм.н., профессор кафедры фармацевтической химии ФДПО и ФЗО

¹ ГКУЗОТ «Пермское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы», 614077, г.Пермь, ул. Старцева, 61

² ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия Минздравсоцразвития России»
614990, г.Пермь, ул. Полевая, д.2, кафедра фармацевтической химии ФДПО и ФЗО; e-mail: perm@pfa.ru

Предложены методики количественного определения золпидема в крови и моче, а также схема метаболических превращений золпидема в организме человека с основными масс-спектральными данными производных его метаболитов. Аналитическая информация, которая может быть получена с помощью данных методик, позволит уточнить клинический диагноз при проведении химико-токсикологического анализа (ХТА) либо констатировать или опровергнуть факт отравления золпидемом как основной причины смерти при проведении судебно-медицинской экспертизы.

Ключевые слова: золпидем, метаболиты, твердофазная экстракция, газовая хроматография — масс-спектрометрия

Введение

На сегодняшний день инсомния — это серьёзная проблема общественного здоровья, распространённая не только среди пожилого населения, но и у молодых лиц, чему весьма способствует чрезмерно интенсивный образ жизни, ставший характерной чертой современности. В наши дни одно из значимых мест в терапии инсомнии занимает препарат с новой химической структурой — золпидем, успешно применяемый в мире в течение последних двух десятилетий. Препарат доказанно позитивно влияет на качество жизни [11], облегчая засыпание не только перед сном, но и среди ночи у больных с интрасомническими расстройствами. По данным [24], во Франции золпидем входит в тройку наиболее часто применяемых психотропных лекарств, наряду с бромазепамом и пароксетином, а согласно исследованиям [18], Z-лекарства, к которым относится и золпидем, являются препаратами выбора для лечения бессонницы в США. Российские клиницисты [1] ставят золпидем по значимости в один ряд с такими известными и широко распространёнными лекарственными средствами в нашей стране, как производные 1,4-бензодиазепина (с коротким и средним периодом полувыведения — мидазолам, триазолам). Применяется золпидем в виде тартрата, его лекарственные формы: таблетки, покрытые оболочкой (5 и 10 мг), таблетки подъязычные и спрей. Последние две формы вызывают значительно более быстрое наступление седации [21] по сравнению с классической таблетированной формой. Золпидем в терапевтических дозах практичес-

ки не вызывает «рикошетной» бессонницы (Rebound-синдрома) [5] и субъективно хорошо переносится пациентами [10]. Тем не менее, в литературе описаны случаи проявлений серьёзных побочных действий со стороны ЦНС: антероградной амнезии [23], сомнамбулизма [22] и псевдогаллюцинаций [12].

Токсикологическое значение золпидема имеет, во-первых, в связи с широким применением, во-вторых, из-за способности вызывать явления привыкания и лекарственной зависимости (психической и физической) при длительном (более 4 недель) приёме [9, 13]. При этом формируются благоприятные условия для возможного применения золпидема не по назначению и его неконтрольного приёма. Авторами [6] описан пример злоупотребления золпидемом, вводимым внутривенно. В-третьих, способность золпидема снижать скорость психической и мышечной реакции (эти эффекты сохраняются и на следующий день после употребления его внутрь на ночь) [16] делает несовместимым прием этого лекарства с управлением всеми видами транспортных средств и работой с приборами и автоматами, требующими точности движений и исключения любых ошибки. Кроме того, описано множество случаев применения препарата для осуществления преступных действий против личности, при этом использовались такие свойства золпидема, как потенцированное фармакологическое действие при совместном приеме с алкоголем, а также быстрое наступление седации [8, 15, 17].

В РФ золпидем является контролируемым лекарственным средством в уголовном законодательстве:

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НАРКОЛОГИИ

он внесен в Список сильнодействующих веществ, согласно Постановлению Правительства №964 [2] от 29 декабря 2007 г.

Для эффективного лекарственного мониторинга токсикологически значимых веществ необходимо своевременно готовить практическую и теоретическую базу.

Целью настоящей работы была разработка методик определения золпидема и его метаболитов в крови и моче для использования в клинической и судебно-экспертной практике.

Материалы и методы

Оборудование

В исследованиях использовали: газовый хроматограф Agilent 6850, оснащённый 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); система с вакуумной камерой (манифолд) на 12 позиций (Supelico), насос низкого вакуума (AIR CADET, США), термоблок ПЭ-4030 (ОАО «Экрос», Россия), микроволновая печь Rolsen MS 1770 SA (Россия), микровстряхиватель ПЭ-2 (ОАО

«Экрос», Россия), полуавтоматические пипетки-дозаторы, позволяющие отбирать объёмы жидкостей 4—40, 40—200, 200—1000 мкл и 1—5 мл.

Материалы

Картриджи для твердофазной экстракции (ТФЭ) AccuBond II EVIDEX — 200 мг — 3 мл (Agilent, США); золпидема тартрат (порошок-субстанция, Испания, НД 42-13447-05); Невиграмон® (капсулы, содержащие 500 мг налидиксовой кислоты, Chinoin, Будапешт, Венгрия); метиловый эфир налидиксовой кислоты получен по методике [4]; мелипрамин (ампулы, с содержанием имиπραмина гидрохлорида 12,5 мг/мл, EGIS PHARMACEUTICALS); β-глюкуронидаза (Type HP-2, From Helix Romatia, 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), содержащего 1% триметилхлорсилана (Sigma Chemical, Co; Sigma-ALDRICH CHEMI, Germany); трифторуксусный ангидрид (х.ч., Вектон, ACROS 14781); метилиодистый (х.ч., Вектон, Шосткинский завод химреактивов). Все используемые растворители и реактивы имели чистоту х.ч.

Таблица 1

Протокол процедуры ТФЭ для количественного определения золпидема в крови

Этап	Процедуры
Подготовка образца	500 мкл крови; 50 мкл спиртового раствора имиπραмина гидрохлорида 0,01 мг/мл (внутренний стандарт); 3 мл 1/15М фосфатного буфера (pH 6,0)
Центрифугирование	3000 об/мин в течение 10 мин
Кондиционирование	2 мл этанола; 2 мл 1/15М фосфатного буфера (pH 6,0)
Загрузка образца	Скорость 1 мл/мин
Промывка	1 мл 1/15М фосфатного буфера (pH 6,0); 1 мл 0,1М уксусной кислоты; 1 мл 10% раствора этанола в воде
Элюирование I	2 x 2 мл элюента гексан-этилацетат (3:1)
Промывка	2 x 2 мл метанола
Элюирование II	2 x 2 мл элюента дихлорметан-изопропанол — 25% раствор аммиака (4:1:0,1)
Концентрирование	Испарение элюата II в токе азота при 60°C.

Таблица 2

Протокол процедуры ТФЭ для количественного определения золпидема в моче

Этап	Процедуры
Подготовка образца	2 мл мочи; 20 мкл спиртового раствора метилового эфира налидиксовой кислоты 0,1 мг/мл (внутренний стандарт); 1 мл 0,1 М ацетатного буфера (pH 4,6)
Кондиционирование	2 мл этанола; 2 мл 0,1М ацетатного буфера (pH 4,6)
Загрузка образца	Скорость 1 мл/мин
Промывка	1 мл 0,1М ацетатного буфера (pH 4,6); 1 мл 0,1М уксусной кислоты; 1 мл 10% раствора этанола в воде
Элюирование I	2 x 2 мл элюента гексан-этилацетат (3:1)
Элюирование II	2 x 2 мл элюента дихлорметан-изопропанол — 25% раствор аммиака (4:1:0,1)
Концентрирование	Испарение элюата II в токе азота при 60°C

Подготовку образцов крови проводили, согласно протоколу, описанному в табл. 1. Подготовку образцов мочи проводили, согласно протоколу, описанному в табл. 2.

При изучении метаболизма золпидема исследовали образцы мочи от двух испытуемых лиц, полученные после перорального приема однократной терапевтической дозы золпидема тартрата (10 мг). Перед ТФЭ таких образцов проводили ферментативный гидролиз по схеме: к 2 мл мочи прибавляли 0,5 мл 1/15 М фосфатного буфера (рН 6,0), 0,1 мл β -глюкуронидазы (10 140 ЕД) и экспонировали в течение 2 ч при 45°C. Гидролизат центрифугировали при 2000 об./мин в течение 5 мин. К центрифугату прибавляли 2,5 мл 0,1 М ацетатного буфера (рН 4,6) и подвергали ТФЭ по схеме, описанной в табл. 2. Образцы мочи далее исследовали методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии (ГХ/МС), регистрацию масс-спектров проводили в режиме полного сканирования масс 35—700 а.е. (Scan). Условия газохроматографического разделения приведены в табл. 3.

Режим регистрации при проведении количественного анализа — селективный ионный мониторинг (SIM) по ионам с величинами m/z для золпидема — 235, 307, 219 (9,65 мин); для метилового эфира налidikсовой кислоты — 188, 215, 246 (7,58 мин); для имипрамина — 234, 235, 280 (7,31 мин). Для количественного определения были использованы величины площадей пиков ионных фрагментов со 100%-ной интенсивностью в спектре (235 — для золпидема, 188 — для метилового эфира налidikсовой кислоты и 234 — для имипрамина).

Результаты и их обсуждение

В настоящей работе методы ТФЭ и ГХ/МС были применены для изолирования, прекоцентрации и обнаружения золпидема и его метаболитов в биологических пробах. ТФЭ имеет ряд преимуществ (высокий выход, селективность, экологичность и др.) перед классической жидкость-жидкостной экстракцией, применяемой повсеместно в рутинной работе химико-токсикологических лабораторий и судебно-химических отделений. ГХ/МС является высокочувствительной, верифицирующей другие методы, дающей структурную информацию о веществе техникой. Нами разработаны две методики количественного определения золпидема в крови и моче. Основные калибровочные данные для этих методик приводятся в табл. 4.

Количественное определение золпидема в образцах реальной крови позволит дать объективную оценку влияния вещества на организм потребителя и установить степень тяжести токсического состояния. Диапазон концентраций был выбран, исходя из чувствительности метода и данных литературы о величинах концентраций, имевших место в реальных случаях отравлений (терапевтическая концентрация золпидема в крови составляет 0,08—0,15 мг/л; токсическая — 0,5 мг/л; летальная — 2—4 мг/л) [3]. Необходимо отметить, что даже при приеме терапевтической дозы золпидема клиническая картина у потреблявшего лица может соответствовать токсической дозе, так как, во-первых, это может быть проявлением побочных действий со стороны ЦНС, а во-вторых, необходимо учитывать потенцированное действие золпидема при совместном приеме с алкоголем и другими психотропны-

Условия газохроматографического анализа

Таблица 3

Параметры	Scan	SIM
Скорость потока газа-носителя (гелий)	1,5 мл/мин	
Режим работы хроматографа	Деление потока 15:1 с задержкой включения 1 мин после ввода пробы	
Температура инжектора	250°C	300°C
Температура интерфейса	280°C	
Температура колонки	Начальная 70°C (2 мин), прогрев со скоростью 20°C в мин до 280°C (12 мин), затем прогрев 20°C в мин до 300°C (5 мин)	Начальная 70°C (1 мин), прогрев со скоростью 40°C в мин до 230°C, затем прогрев 20°C в мин до 300°C (2,5 мин)

Основные показатели калибровочных кривых при количественном определении золпидема в крови и моче

Таблица 4

Объект	Диапазон концентраций, мг/л	LOD, нг/мл	LOQ, нг/мл	r^2	Уравнение
Кровь	0,1—2,5	5	25	0,996	$y=23,637x$ 1,235
Моча	0,1—10	10	25	0,993	$y=15,563x$ 4,038

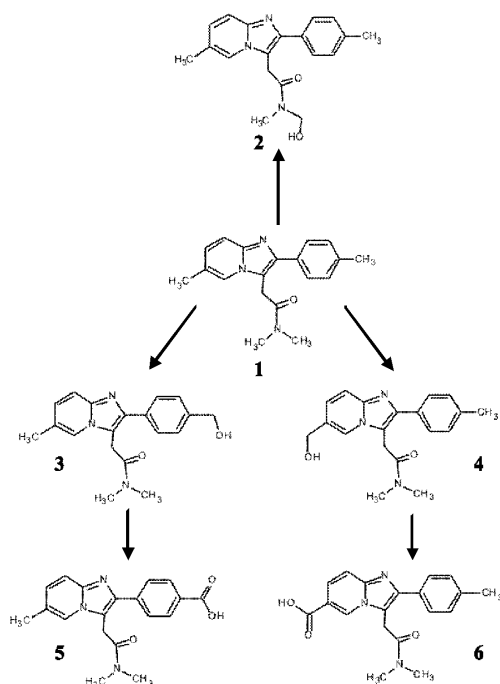


Схема метаболизма золпидема:

1 — золпидем; 2 — N-(гидроксиметил)-N-метил-2-[6-метил-2-(4-метилфенил)имидазо[1,2-a]пиридин-3-ил]ацетамид; 3 — 4'-гидроксиметильное производное золпидема; 4 — 6-гидроксиметильное производное золпидема; 5 — 4'-карбоксильное производное золпидема; 6 — 6-карбоксильное производное золпидема

ми веществами [7, 14], а также парадоксальное усиление седации при совместном приеме с кофеином [19].

В нашей практике имел место случай комбинированного отравления золпидемом и этиловым алкоголем, пострадавшая женщина находилась в бессознательном состоянии, при этом концентрация золпидема в крови составила 0,22 мг/л, этанола — 2,55 г/л.

Моча — это наиболее частый биологический объект, исследуемый на наличие токсикологически важных веществ, включая золпидем. Моча удобна для анализа из-за отсутствия в ней белковых компонентов, наряду с кровью она является основным объектом исследования при проведении ХТА. Комбинация ТФЭ и ГХ/МС-анализа делает возможным обнаружение золпидема в объектах даже в случаях приема его однократ-

ной терапевтической дозы и на терминальной стадии его выведения: спустя 24 ч после приема лекарственного средства мы определяли золпидем в моче в концентрации 0,03—0,04 мг/л, что немного превышает предел его количественного определения (LOQ) данным методом.

Однако, необходимо учесть, что короткий период полувыведения (1,5—2,4 ч) и высокая метаболическая активность золпидема предполагают возможность получения ложноотрицательных результатов, особенно при отсутствии в качестве дополнительных объектов альтернативных биосред. В таких спорных случаях необходимо проводить определение метаболитов золпидема в моче как маркеров приема данного препарата. Кроме того, факт наличия метаболитов абсолютно исключает возможные лабораторные ошибки, при которых может иметь место загрязнение проб извне исходным лекарственным веществом, используемым в ходе анализа. ГХ/МС данных метаболитов в отечественной и зарубежной литературе не представлены. В пробах мочи лиц, употреблявших золпидем, мы проводили идентификацию метаболитов, исходя из свойств функциональных групп, входящих в состав их молекул. При этом использовали реакции ацилирования, алкилирования и силилирования. При изучении закономерностей масс-фрагментации полученных производных были получены структурные данные о химическом строении изучаемых соединений. Эти данные были нами систематизированы и представлены в виде схемы метаболических превращений золпидема в организме человека (рисунок). Соединение 2 нами обнаружено не было, но об этом направлении метаболизма указывается в публикации [20].

Характерной особенностью масс-спектров производных основных метаболитов золпидема является наличие выраженных пиков молекулярных ион-радикалов и фрагментных ионов $[M-72]^+$ (табл. 5).

Установлено, что реакции получения триметилсилильных эфиров основных метаболитов золпидема являются предпочтительными для ГХ/МС анализа, так как это приводит к получению хороших газохроматографических данных дериватов и позволяет проводить одновременную идентификацию как гидрокси-, так и карбокси- метаболитов золпидема.

Таблица 5

Молекулярные ионы радикалы и фрагментные ионы $[M-72]^+$ для производных гидрокси- и карбоксиметаболитов золпидема (m/z)

Группа	Ме		Ас		ТМС		ПФПол	
	M ⁺	[M-72] ⁺	M ⁺	[M-72] ⁺	M ⁺	[M-72] ⁺	M ⁺	[M-72] ⁺
-CH ₂ OH	н.о.	н.о.	365	293	395	323	н.о.	н.о.
-COOH	351	279	н.о.	н.о.	409	337	469	397

Примечание. н.о. — не образуется; Ме — метилирование; Ас — ацетилирование; ПФПол — 2,2,3,3,3-пентафторпропанол (алкилирование); BSTFA — бис-триметилсилил-трифторацетамид (силилирование)

Заключение

Для реализации комплексного подхода при решении задач лекарственного мониторинга применения золпидема в немедицинских целях предложены методики количественного определения золпидема в крови и моче, а также схема метаболических превращений золпидема в организме человека с основными масс-спектральными данными его метаболитов. Аналитическая информация, которая может быть получена с помощью данных методик, позволит уточнить клинический диагноз путем оценки степени тяжести интоксикации при проведении ХТА, либо констатировать или опровергнуть факт отравления золпидемом как основной причины смерти при проведении судебно-медицинской экспертизы.

Список литературы

1. Левин Я.И. Некоторые современные подходы к терапии инсомнии // *Лечащий Врач*. — 2003. — №4. — С. 18—22.
2. Постановление Правительства №964 от 27 декабря 2007 г. 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.
3. Терапевтические, токсические, летальные концентрации лекарственных и других химических веществ: по данным Международной Ассоциации судебных токсикологов / Под ред. D.R.A. Uges, University Hospital Groningen, The Netherlands. — 1996. — Т. 26, №1. — 16 с.
4. Шилова Е.А., Егорова Е.И. Количественное определение золпидема в моче методом газовой хроматографии — масс-спектрометрии // *Вестник ПГФА*. — 2009. — №5. — С. 165—167.
5. Элленхорн М.Д. Медицинская токсикология: Диагностика и лечение отравлений у человека / В 2 т. Т. 1. — М.: Издательство, 2003. — С. 747—749.
6. Benyamina A., Dublanchet O., Karila L. et al. Intravenous zolpidem abuse: a case for serotonin depletion // *Am. J. Addict.* — 2007. — №6. — P. 534.
7. Chen C.Y., Shiah I.S., Lee W.K. et al. Dependence on quetiapine in combination with zolpidem and clonazepam in bipolar depression // *Psychiatry Clin. Neurosci.* — 2009. — №3. — P. 427—428.
8. Cheze M., Muckensturm A., Hoizey G. et al. A tendency for re-offending in drug-facilitated crime // *Forensic Sci. Int.* — 2010. — №1—3. — P. 14—17.
9. Damm J., Eser D., Moeller H.J. et al. Severe dependency on zolpidem in a patient with multiple sclerosis suffering from parasomnia // *World J. Biol. Psychiatry*. — 2010. — №2. — P. 516—518.
10. Dingemans J. Comparative tolerability, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of a metabolite of a quinolizone hypnotic and zolpidem in healthy subjects // *Drug Metabolism and Disposition*. — 2000. — №12. — P. 1411—1416.
11. Frey D.J., Ortega J.D., Wiseman C. et al. Influence of zolpidem and sleep inertia on balance and cognition during nighttime awakening: a randomized placebo-controlled trial // *J. Am. Geriatr. Soc.* — 2011. — №1. — P. 73—81.
12. De Haas S., Dingemans J., Hoever P. et al. Pseudohallucinations after zolpidem intake: a case report // *J. Clin. Psychopharmacol.* — 2007. — №6. — P. 728—730.
13. Huang M.C., Lin H.Y., Chen C.H. Dependence on zolpidem // *Psychiatry Clin. Neurosci.* — 2007. — №2. — P. 207—208.
14. Kito S., Koga Y. Visual hallucinations and amnesia associated with zolpidem triggered by fluvoxamine: a possible interaction // *Int. Psychogeriatr.* — 2006. — №4. — P. 749—751.
15. Levine B. Zolpidem distribution in postmortem cases // *J. Forensic Sci.* — 1999. — №2. — P. 369—371.
16. Logan B.K. Zolpidem and driving impairment // *J. Forensic Sci.* — 2001. — №1. — P. 105—110.
17. Maravelias C., Stefanidou M., Dona A. et al. Drug-facilitated sexual assault provoked by the victim's religious beliefs: a case report // *Am. J. Forensic Med. Pathol.* — 2009. — №4. — P. 384—385.
18. Morlock R.J., Tan M., Mitchell D.Y. Patient characteristics and patterns of drug use for sleep complaints in the United States: analysis of National Ambulatory Medical Survey data, 1997—2002 // *Clin. Ther.* — 2006. — №7. — P. 1044—1053.
19. Myslobodsky M. The paradox of caffeine-zolpidem interaction: a network analysis // *Curr. Drug Targets*. — 2009. — №10. — P. 1009—1020.
20. Pichard L., Gillet G., Bonfils C. et al. Oxidative metabolism of zolpidem by human liver cytochrome P450S // *Drug Metabolism and Disposition*. — 1995. — №11. — P. 1253—1262.
21. Staner L., Eriksson M., Cornette F. et al. Sublingual zolpidem is more effective than oral zolpidem in initiating early onset of sleep in the post-nap model of transient insomnia: a polysomnographic study // *Sleep Med.* — 2009. — №6. — P. 616—620.
22. Tsai J.H., Yang P., Chen C.C. et al. Zolpidem-induced amnesia and somnambulism: rare occurrences? // *Eur. Neuropsychopharmacol.* — 2009. — №1. — P. 74—76.
23. Tsai M.J., Tsai Y.H., Huang Y.B. Compulsive activity and anterograde amnesia after zolpidem use // *Clin. Toxicol. (Phila.)*. — 2007. — №2. — P. 179—181.
24. Wainstein L., Victorri-Vigneau C., Seville V. et al. Pharmacoepidemiological characterization of psychotropic drugs consumption using a latent class analysis // *Int. Clin. Psychopharmacol.* — 2011. — №1. — P. 54—62.

ZOLPIDEM AND ITS METABOLITES ARE THE OBJECTS OF CHEMICAL, TOXICOLOGICAL AND FORENSIC EXAMINATIONS

KRYLOVA E.A., KATAEV S.S., KHOMOV Y.A.

Perm Kray Bureau of Forensic and Medical Examination, 614990 Perm, Startsev st, 61

Perm State Pharmaceutical Academy, 614081 Perm, Polevaya st, 2; e-mail: perm@pfa.ru

The methods of quantitative determination of zolpidem in blood and urine are suggested. The scheme of metabolic transformations of the zolpidem in human with basic mass spectral data of its metabolites is also presented. This analytical information enables one to make more precise the clinical diagnosis of intoxication or forensic diagnosis in case of death.

Key words: zolpidem, metabolites, gas chromatography, mass-spectrometry, chemical-toxicological examination