

DOI: 10.30906/0869-2092-2022-85-11-32-36

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТАБОЛИТОВ ЗОПИКЛОНА МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ – МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ С ТЕХНОЛОГИЕЙ ОРБИТАЛЬНОЙ ЛОВУШКИ

А. А. Волкова^{1,2}, Р. А. Калёкин^{1,2,*}, А. М. Орлова¹,
Н. Е. Москалева^{1,3}, П. А. Маркин^{1,3}, О. Г. Асташкина^{1,4}

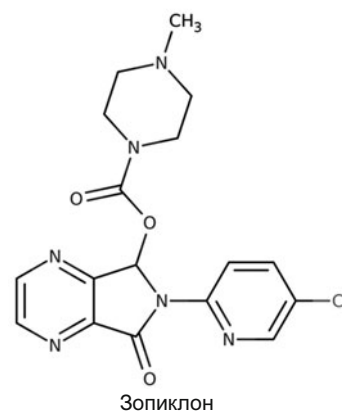
Зопиклон — наиболее часто применяемый в медицинской практике агонист бензодиазепиновых рецепторов небензодиазепинового ряда, и обнаружение его метаболитов актуально в случаях отравления им. В статье описан разработанный комплексный метод высокоэффективной жидкостной хроматографии — масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС) высокого разрешения с технологией орбитальной ловушки (Orbitrap), использованный для обнаружения метаболитов зопиклона в моче пациентов при судебно-химическом и химико-токсикологическом исследовании. По масс-спектрам идентифицированы метаболиты зопиклона — зопиклон-N-оксид и N-дезметилзопиклон. Подтверждение обнаружения проводили по временам удерживания и характерным ионам данных соединений. На основании полученных данных предложен чувствительный метод с пределом обнаружения 0,03 нг/мл метаболитов зопиклона, который можно применять в современных лабораториях.

Ключевые слова: зопиклон; зопиклон-N-оксид; N-дезметилзопиклон; высокоэффективная жидкостная хроматография; масс-спектрометрия высокого разрешения; судебно-химическое исследование; химико-токсикологический анализ; моча.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в медицинской практике широко применяют агонисты бензодиазепиновых рецепторов небензодиазепинового ряда. Производные бензодиазепинов являются психоактивными веществами, модуляторами рецепторов гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), проявляющими снотворное, седативное, анксиолитическое и противосудорожное действие. К небензодиазепиновым лекарственным средствам (ЛС) относят так называемые “Z-препараты”, по названию первых ЛС из этой группы (зопиклон, золпидем, залеплон), которые являются селективными агонистами омега-1-подтипа (зопиклон, золпидем) и омега-2-подтипа (залеплон) бензодиазепиновых рецепторов макромолекулярного ГАМК_A-рецепторного комплекса. В настоящее время в Российской Федерации из этой группы препаратов широко применяемым ЛС является зопиклон [7, 12]. Зопиклон не относится к производным бензодиазепина, но является агонистом бензодиазепиновых рецепторов, принадлежит к классу цикло-

пирролонов. Зопиклон обладает некоторыми барбитуратоподобными свойствами — снотворным, седативным и противосудорожным [2, 16]. Химическая формула по ИЮПАК — (RS)-6-(5-хлор-2-пиридил)-7[4(4-метилпиперазин-1-ил)карбонилокси]-5,6-дигидропироло[3,4-*b*]пиразин-5-он; брутто-формула C₁₇H₁₇ClN₆O₃; молярная масса 388,81 г/моль.



Торговые названия этого ЛС на территории Российской Федерации: “Имован”, “Сомнол” и “Торсон”. Лекарственная форма — таблетки, покрытые пленочной оболочкой по 3,75 и 7,5 мг [2, 6]. Является рецептурным ЛС. Для зопиклона риск лекарственной зависимости и синдром отмены были и остаются достаточно высокими. В европейских постмаркетинговых отчетах сообщалось о редких отдельных случаях летального исхода после передозировки (более 7,5 мг) рацемиче-

¹ ФГБУ “Российский центр судебно-медицинской экспертизы”, Россия, 125284, Москва, ул. Поликарпова, 12/13.

² ФГАОУ ВО “Российский университет дружбы народов”, Россия, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6.

³ ФГАОУ ВО “Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова” (Сеченовский Университет), Россия, 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2.

⁴ ГБУЗ “Бюро судебно-медицинской экспертизы” Департамента здравоохранения Москвы, Россия, 115516, Москва, Тарный проезд, 3.

* e-mail: kalyokin@yandex.ru

ским зопиклоном, чаще всего связанных с передозировкой других ЛС, угнетающих ЦНС. Признаки и симптомы передозировки депрессантами ЦНС, в том числе зопиклоном, проявляются как “преувеличение” фармакологических эффектов [2]. Отсутствие мер контроля со стороны действующего Законодательства за оборотом зопиклона предопределяет потенциальную возможность злоупотребления этим ЛС [12].

Поскольку немедицинское применение и комбинация с другими психотропными ЛС [5, 6], а также с этанолом [8, 9] и наличие побочных эффектов могут привести к наступлению острого и летального отравления зопиклоном, разработка методики обнаружения и идентификации его современными методами в биологических объектах до настоящего времени остается актуальной задачей судебно-химического и химико-токсикологического исследования [3, 10, 11, 13]. Обнаружение метаболитов зопиклона позволяет достоверно утверждать о применении зопиклона потерпевшим и отсутствие ложноположительного результата при подлоге в виде добавления его в биологический объект. Неинвазивным способом отбора проб и наиболее распространенным объектом исследования является биологическая жидкость — моча.

В последние годы высокоэффективная жидкостная хроматография — масс-спектрометрия (ВЭЖХ-МС) успешно применяется в качестве надежного, селективного и чувствительного метода для скрининга, идентификации и количественной оценки малых молекул в биологических жидкостях [14, 15]. Современное решение актуальных задач для судебно-химических и химико-токсикологических исследований возможно при использовании масс-спектрометра высокого разрешения с технологией орбитальной ловушки в сопряжении с системой жидкостной хроматографии сверхвысокого давления и генератором азота со встроенным компрессором [4].

Цель исследования — разработка методики обнаружения зопиклона и его метаболитов в моче методом ВЭЖХ-МС высокого разрешения с использованием технологии Orbitrap для целей и задач лабораторной и судебно-медицинской практики. Новый метод позволит на современном уровне обнаруживать все метаболиты зопиклона в сверхмалых концентрациях.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании участвовали пациенты обоего пола медицинских центров г. Москвы в 2021 г. Исследование одобрено Этическим комитетом ДЗ СВАО г. Москвы (протокол № 2 от 11.02.2021 г.). Мочу собирали утром натощак у пациентов, которые принимали зопиклон в терапевтических дозах по назначению врача. Средний возраст пациентов 32 ± 6 лет. Забор проб биологической жидкости производили неинвазивным способом, добровольно с согласия пациентов и на анонимных условиях.

Определяли количество в пробах действующего вещества зопиклон (“Имован” (П № 015904/01-290920) после очистки от вспомогательных веществ — рабочие стандартные образцы (РСО) — спиртовой раствор с содержанием 1 мг/мл исследуемого вещества.

Для исследования использовали ВЭЖХ-МС высокого разрешения с технологией Orbitrap на масс-спектрометре Orbitrap Exploris 120 MS (ThermoFisher Scientific, США), представляющим собой автономный прибор Orbitrap™ с источником ионизации при атмосферном давлении (ИАД) для высокопроизводительных задач масс-спектрометрии (МС) с жидкостной хроматографией (ЖХ).

В организме человека зопиклон интенсивно метаболизируется до 2 основных метаболитов: зопиклон-N-оксида и N-дезметилзопиклона, поэтому определение в биологическом объекте было направлено на эти метаболиты. Поскольку при направлении на судебно-медицинскую экспертизу для химико-токсикологического исследования симптоматика побочных эффектов у зопиклона сходна с таковыми для производных бензодиазепина, то пробоподготовку проводили по общепринятой схеме для соединений этой группы и данного метода исследования. Для исследования брали нативную мочу объемом 100 мкл, затем добавляли к ней 400 мкл метанола. Встряхивали в шейкере в течение 1 мин, центрифугировали в течение 5 мин при 3500 об/мин. Отбирали 100 мкл этого раствора и добавляли 100 мкл воды. Полученный раствор объемом 200 мкл анализировали.

Условия хроматографирования ВЭЖХ-МС высокого разрешения. Программное обеспечение — Termo Scientific Xcalibur 4.4; колонка TF Accucore PhenylHexyl column (100 × 2,1 мм, 2,6 мм), температура колонки 30°C.

В исследовании использовали разработанную нами комбинированную подвижную фазу для повышения информативности анализа, уменьшения ширины хроматографических пиков с учетом разного градиента по составу подвижной фазы и изменение скорости её подачи. Подвижная фаза представлена в градиентном режиме: подвижная фаза А — 2 мМ раствор аммония формиата в водном растворе 0,1 % муравьиной кислоты (рН 3,0) и подвижная фаза В — 2 мМ раствор аммония формиата в растворе 0,1 % муравьиной кислоты в смеси ацетонитрил — метанол (1:1 по объему). Скорость потока 0,5 мл/мин. Градиентный режим представлен в табл. 1.

Определение проводили в режиме информационно зависимой фрагментации. Режим полного сканирования с обнаружением ddMS2: диапазон сканирования 100 – 1000 m/z ; RF Lens 50 %, сбора данных с высоким разрешением Orbitrap 120000 FWHM. Режим диапазона сканирования автоматический. Автоопределение времени инъекции ионов в ловушку. Порог интенсивности для фрагментации составлял 2000. Обнаружение вершины 30 %, изолирующее окно 1 m/z , режим

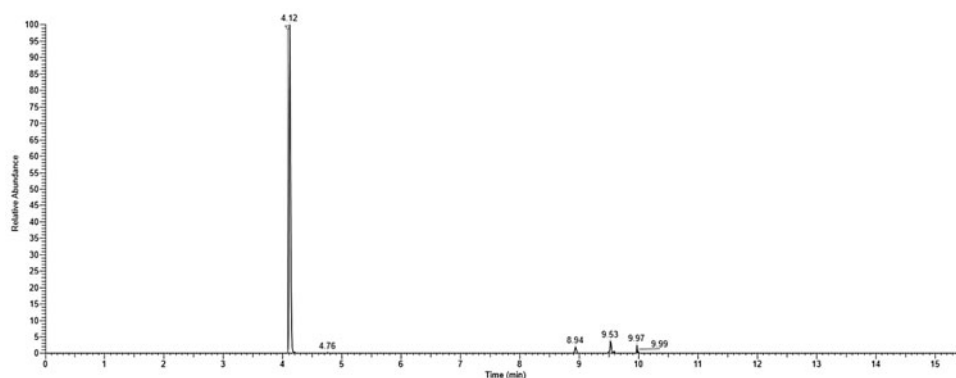


Рис. 1. Хроматограмма N-дезметилзопиклона из мочи.

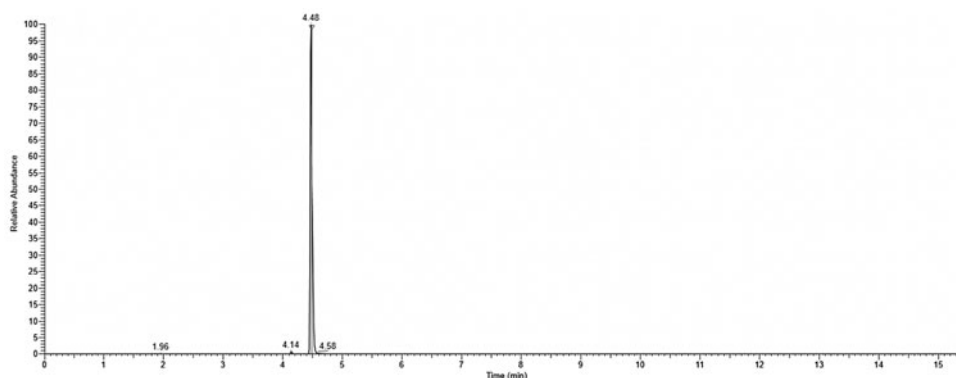


Рис. 2. Хроматограмма зопиклон-N-оксида из мочи.

энергии столкновения — ступенчатый, тип энергии столкновения — абсолютный. Энергия диссоциации (HCD) 15, 30, 45 %. Разрешение для фрагментов 30000 у.е. Для оптимизации условий качественного и количественного анализа уточнение окон обнаружения проводили рутинным для лаборатории методом. Режим исключения ионов осуществлялся после получения одного спектра за 3 с. Применение подобранного режима сканирования позволяет получить максимальную чувствительность (из-за отсутствия потерь в процессе соударительной ионизации). Это необходимо при оценке временных окон обнаружения, так как оптимизация метода на быстрое разделение могла привести к возникновению ложноотрицательных результатов из-за низкой скорости сканирования, в то время как существенное повышение последней могло привести к значительному падению интенсивности сигналов, что критично при определении метаболитов в низких и сверхнизких концентрациях в биологических жидкостях (в том числе, в моче).

В работе использовали систему, которая была оснащена источником ионизации со следующими параметрами: тип ионного источника H-ESI; напряжение электроспрея положительная ионизация 3500 V; напряжение электроспрея отрицательная ионизация 2500 V. Распыляющий газ азот 50 отн. ед., вспомогательный газ азот 13 отн. ед. Температура капилляра 280°C; тем-

пература испарителя 350°C. Встроенная подстройка массы — EASY-ICTM (флуорантрен).

Идентификацию нативного соединения зопиклона и его метаболитов после хроматографирования проводили при использовании библиотек масс-спектрометрической информации: TRACEFINDER 5.1 SP1; TOXFINDER 1.0; EFS HRAM Compound Database; Toxicology HRAM Compound Database; Thermo Scientific™ mzVault HRAM MS/MS spectral library; COMPOUND DISCOVERER 3.1; MzCloud.

Полученные результаты статистически обрабатывали с применением программы Windows Excel 2010 и с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при доверительной вероятности $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Подобранные условия хроматографирования — комбинированный градиент подвижной фазы и температурный режим позволили уменьшить количество соэлюирующихся соединений из мочи и обеспечили получение качественных результатов, представленных на рис. 1 и 2.

На представленных хроматограммах идентифицированы метаболиты зопиклона — зопиклон-N-оксид и N-дезметилзопиклон. Идентификацию проводили по временам удерживания и после анализа характерных

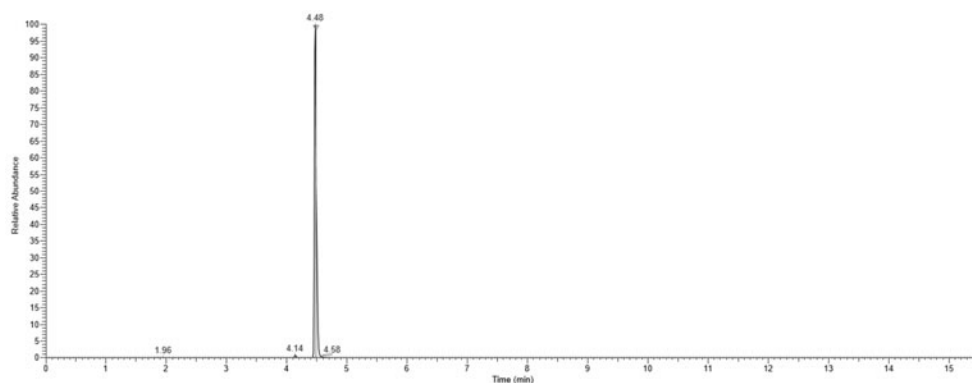


Рис. 3. Масс-спектр зопиклон-N-оксида.

Таблица 1. Градиент подвижной фазы по составу при хроматографировании методом ВЭЖХ-МС высокого разрешения (скорость потока подвижной фазы 0,5 мл/мин)

Время, мин	Подвижная фаза А, %	Подвижная фаза В, %
0	99,0	1,0
1,0	99,0	1,0
10,0	1,0	99,0
11,5	1,0	99,0
12,0	99,0	1,0
13,5	99,0	1,0

ионов масс-спектров данных соединений, поскольку спектральные характеристики являются значимым фактором при идентификации исследуемых веществ. На рис. 3 приведен масс-спектр зопиклон-N-оксида. Поскольку на основании данных времени удерживания пиков исследуемых веществ можно их идентифицировать, то необходима статистическая обработка полученных данных (табл. 2).

Согласно данным, представленным в табл. 2, среднее время удерживания N-дезметилзопиклона составляет 4,11 мин, а зопиклон-N-оксида — 4,47 мин. Полученные полные спектры исследованных веществ с

диссоциацией масс-спектров ионов характерных фрагментов молекулы в различных функциональных группах позволяют выделить по 8 характерных ионов для основного метаболита при определении зопиклон-N-оксида: 157, 163, 190, 217, 245, 263, 304, 405 m/z (отношение массы заряженных частиц к их заряду). Можно выделить характерный ион, однако идентификацию необходимо проводить не менее чем по 5 характерным ионам. На основании полученных данных при исследовании возможно выполнение анализа в режиме селективного ионного мониторинга (SIM) по заданным ионам для зопиклон-N-оксида — m/z 217 [17]. Следует отметить, что ионы, находящиеся в “неинформативном” диапазоне — менее 150 а.е.м. (атомных единиц массы) присутствуют в обоих изучаемых соединениях, поэтому на результаты идентификации сильно влияют компоненты матрицы исследуемого образца и “фона” хроматографической колонки. Следовательно, рекомендовано [17] оптимально использовать для идентификации данные более 150 а.е.м.

Совокупность параметров: наличие пиков, идентичных пикам библиотечного масс-спектра, а также одинаковое время удерживания свидетельствует о наличии метаболитов зопиклона — N-дезметилзопиклона и зопиклон-N-оксида в биологическом объекте.

Таблица 2. Результаты хроматографирования мочи с применением ВЭЖХ-МС высокого разрешения

Вещество	Брутто-формула	Наблюдаемая масса протонированного иона, m/z	Время удерживания, мин ($n = 6$)	Статистические параметры времени удерживания*
N-Дезметил-зопиклон	$C_{16}H_{15}ClN_6O_3$	375,09	4,09; 4,12; 4,11; 4,13; 4,12; 4,10	$\sigma^2 = 0,00022$; $\sigma = 0,01472$; $V = 0,36 \%$; $A/m_a = -0,33658$; $E/m_e = -2,05424$; $\bar{a} = 0,01167$
Зопиклон-N-оксид	$C_{17}H_{17}ClN_6O_4$	405,11	4,43; 4,48; 4,47; 4,49; 4,49; 4,47	$\sigma^2 = 0,0005$; $\sigma = 0,02229$; $V = 0,5 \%$; $A/m_a = -1,2971$; $E/m_e = -0,96655$; $\bar{a} = 0,015$

* Примечание: σ^2 — дисперсия, σ — среднеквадратическое отклонение, V — коэффициент вариации, A/m_a — отношение показателя асимметрии к его ошибке, E/m_e — отношение показателя эксцесса к его ошибке, \bar{a} — среднее линейное отклонение.

По результатам исследования разработанной методики провели статистическую обработку полученных данных и валидационную оценку по необходимым параметрам (оценка переноса аналита, определение интерференционных эффектов, подавление/повышение ионизации, предел обнаружения 0,03 нг/мл) согласно методическим рекомендациям [1].

ВЫВОДЫ

1. Разработана методика идентификации зопиклона по его метаболитам — N-дезметилзопиклону и зопиклон-N-оксиду — в моче пациентов методом ВЭЖХ-МС высокого разрешения с использованием технологии Orbitrap.

2. Обнаружено и установлено время удерживания метаболитов N-дезметилзопиклона и зопиклон-N-оксида (4,11 и 4,47 мин соответственно) и определены характерные ионы (217 *m/z*) для использования при идентификации в моче пациентов. Относительное стандартное отклонение (*RSD*, %) времени удерживания при оценке сходимости и внутрिलाбораторной воспроизводимости не превышала 5 % для биологического объекта — моча.

ЛИТЕРАТУРА

1. С. С. Барсегян, Е. М. Саломатин, Т. В. Плетенева и др., *Методические рекомендации по валидации аналитических методик, используемых в судебно-химическом и химико-токсикологическом анализе биологического материала*, Москва (2014).
2. Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Имован® П № 015904 / 01 – 290920.
3. Р. А. Калёкин, Д. С. Лазарян, М. Г. Цыбулина, *Суд.-мед. экспертиза*, № 1, 24 – 26 (2007).
4. Р. А. Калёкин, Н. Е. Москалева, А. А. Волкова и др., *Суд.-мед. экспертиза*, **65**(2), 24 – 28 (2022); doi: 10.17116 / sudmed20226502124.
5. Р. А. Калёкин, Е. М. Саломатин, В. А. Калёкина и др., *Наркология*, № 4, 33 – 37 (2008).
6. Р. А. Калёкин, О. В. Салтыкова, Г. М. Родионова и др., *Суд.-мед. экспертиза*, № 1, 36 – 41 (2020).
7. П. А. Маркин, Н. Е. Москалева, С. А. Апполонова и др., *Актуальные вопросы судебной медицины и права*, Сб. науч.-практ. статей, Казань (2021), сс. 158 – 161.
8. А. А. Мартемьянова, А. М. Орлова, А. Л. Кочоян и др., *Суд.-мед. экспертиза*, № 3, 30 – 34 (2020).
9. А. А. Мартемьянова, А. Л. Кочоян, Р. А. Калёкин и др., *J. Siberian Med. Sci.*, № 4, 27 – 39 (2021).
10. А. М. Орлова, Р. А. Калёкин, А. А. Волкова и др., *Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация*, № 3, 106 – 113 (2021).
11. А. З. Павлова, Р. А. Калёкин, А. М. Орлова и др., *Трезвость как социальный фактор развития общества*, Чебоксары (2018), сс. 168 – 175.
12. Н. Ю. Порсева, О. Н. Дворская, *Современные проблемы науки и образования*, № 3, 242 (2015). URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=20191> (дата обращения: 03.06.2021).
13. Е. М. Саломатин, Р. А. Калёкин, А. М. Орлова и др., *Суд.-мед. экспертиза*, № 6, 49 – 52 (2015).
14. A. G. Helfer, J. A. Michely, A. A. Weber, et al., *Anal. Chim. Acta*, **965**, 83 – 95 (2017); doi: 10.1016 / j.aca.2017.03.002.
15. A. G. Helfer, J. A. Michely, A. A. Weber, et al., *Anal. Chim. Acta*, **891**, 221 – 233 (2015).
16. <https://grls.rosminzdrav.ru/GRLS.aspx?RegNumber=&MnnR=%d0%97%d0%be%d0%bf%d0%b8%d0%ba%d0%bb%d0%be%d0%bd&lf=&TradeNmR=&OwnerName=&MnfOrg=&MnfOrgCountry=&isfs=0®type=1%2c6&pageSize=10&order=RegDate&orderType=desc&pageNum=1> — [Электронный ресурс] (дата обращения: 28.01.2022).

Поступила 01.02.22

DETERMINATION OF ZOPICLONE METABOLITES USING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY – HIGH RESOLUTION ORBITRAP MASS SPECTROMETRY (HPLC – HRMS)

A. A. Volkova^{1,2}, R. A. Kalekin^{1,2,*}, A. M. Orlova¹, N. E. Moskaleva^{1,3}, P. A. Markin^{1,3}, O. G. Astashkina^{1,4}

¹ Russian Center of Forensic Medical Examination, 12/13 Polikarpova ul., Moscow, 125284 Russia

² Peoples' Friendship University of Russia, 6 Miklukho-Maklaya ul., Moscow, 117198 Russia

³ I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8 – 2 Trubetskaya ul., Moscow 119991 Russia

⁴ Bureau of Forensic Medical Expertise of the Moscow Department of Health, 3 Tarny proezd, Moscow, 115516 Russia

Zopiclone is the most commonly used in medical practice agonist of benzodiazepine receptors of the non-benzodiazepine series. The detection of zopiclone metabolites is relevant in cases of poisoning. We present the developed complex method of HPLC – HRMS with orbitrap technology used to detect zopiclone metabolites in the urine of patients during forensic chemical and chemical-toxicological examination. The zopiclone metabolites — zopiclone-N-oxide and N-desmethylzopiclone have been identified. The retention time and characteristic ions of the mass spectra of those compounds proved the validity of the proposed detection procedure as a sensitive method for detecting zopiclone metabolites which can be used in modern laboratories.

Keywords: zopiclone; zopiclone-N-oxide; N-desmethylzopiclone; high-performance liquid chromatography; high resolution mass spectrometry; forensic chemical investigation; chemical-toxicological analysis; urine.