

**ANALIZA CHIMICO-TOXICOLOGICĂ A ZOPICLONEI**  
**Tamara Cotelea<sup>1</sup>, Serghei Ermolaev<sup>1</sup>, Leonid Lîsîi<sup>2</sup> Efim Arama<sup>3</sup>**  
<sup>1</sup>Catedra Chimie farmaceutică și toxicologică USMF „N.Testemișanu”  
<sup>2</sup>Catedra Biochimie și Biochimie clinică USMF „N.Testemișanu”  
<sup>3</sup>Catedra Biofizică, informatică și Fiziologia omului

**Summary**

***Chemico-toxicological analysis of zopiclone***

The optimum isolation and extraction conditions of zopiclone from biological fluids. We used physico – chemical methods to identify zopiclone : chromatography on a thin layer by utilizing four systems of solvents, spectrophotometrical method in UV, HPLC...The methods processed by us for zopiclone in biological tests “in vitro” are specific and reproductive, and they are recommended for the study of zopiclone in biological fluids.

**Rezumat**

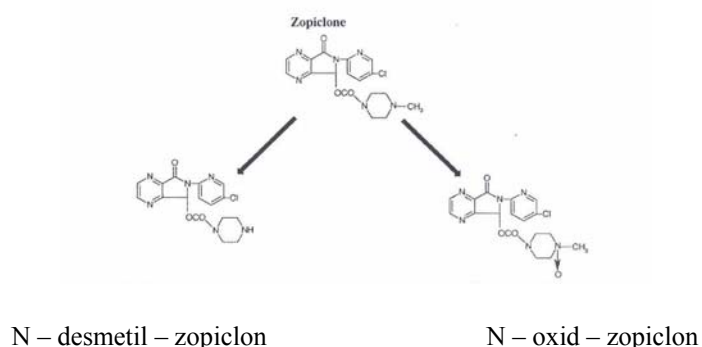
Au fost determinate condițiile optime de izolare și extragere a zopiclonei din lichidele biologice Am aplicat metodele fizico-chimice de identificare a zopiclonei: cromatografia pe strat subțire utilizând patru sisteme de solvenți, metoda spectrofotometrică în UV, HPLC. Metodele prelucrate de noi pentru zopiclonă în probele biologice „in vitro” sunt specifice și reproductive și ele se recomandă pentru studierea zopiclonei în lichidele biologice.

**Actualitatea temei**

Zopiclona – reprezentant din noua clasă a compușilor chimici ciclopirolane. Spre deosebire de benzodiazepine se leagă numai cu receptorii centrali și nu posedă afinitate cu receptorii periferici. Proprietățile farmacologice ale zopiclonei includ acțiunea sedativă, anxiolitică, anticonvulsivă și relaxivă.

În prezent zopiclona se administrează în tratamentul insomniei cronice pentru maturi. Cercetările clinice au arătat că zopiclona îmbunătățește indicii obiectivi și subiectivi ai somnului: micșorează perioada adormirii, mărește longevitatea somnului micșorează frecvența de trezire, îmbunătățește dinamica trezirii, calitatea somnului.

Metabolismul zopiclonei se petrece în ficat cu ajutorul citocromului P-450(3A și 2C). Metaboliții principali sunt derivații N-oxid (activ) și N-dimetil metabolit cu acțiunea anxiolitică și cu proprietățile de inhibare a receptorilor nicotin-acetilcolinici, care protegază dependența psihică și fizică. Perioada de înjumătățire este de 4 ore. Prin urină se elimină 80% , prin intestine -16% . Biotransformarea zopiclonei este redată în figura 1.



**Fig. 1 .Biotransformarea zopiclonei**

Zopiclon N-oxid posedă efect slab tranchilizant și sedativ. Alți metaboliți ai zopiclonei sunt lipsiți de activitate.

Cercetările țărilor baltice marchează cazuri cu intoxicații grave cu sfârșitul letal în urma supradozării. Administrarea zopiclonei concomitent cu alcoolul etilic duce la euforie.

Narcomanii primesc preparatul pentru a sinergiza acțiunea narcoticelor. Simptomele de intoxicații includ disfuncția sistemului nervos central și sistemului respirator, hiperkaliemia, hiperglicemia. Doza letală se consideră 1,4-3,9 mg/l.

Cercetările clinice din Bristol, Marea Britanie au arătat, că pacienții cu disfuncții ale ficatului riscă intoxicații acute cu zopiclon. După administrarea unei doze la bolnavii cu ciroză, concentrația zopiclonei în sânge este cu mult mai mare comparativ cu pacienții sănătoși. La pacienții cu ciroză clearancele zopiclonei se micșorează cu 40% în corespundere cu micșorarea procesului de dismetilare. Acesta se lămurește prin faptul că metabolismul și eliminarea zopiclonei din organism este cu mult mai încetinit și în cele din urmă are loc cumulara preparatului în organism. Totodată folosind preparate inhibitori ai citocromului ficatului se micșorează clearancele zopiclonei, măbind concentrația preparatului în sânge. În baza acestor date ne-am pus ca scop precizarea metodelor disponibile, specifice pentru determinarea zopiclonei în materialul biologic. Analiza chimico-toxicologică se bazează pe analiza chimico-farmaceutică a preparatului de determinare a calității.

### **Obiectivele lucrării**

De a efectua studiul determinării condițiilor de izolare și separare a zopiclonei din lichidele biologice precum și aplicarea metodelor fizico-chimice de identificare și dozare.

### **Materiale și metode de cercetare**

În cadrul cercetărilor s-a folosit zopiclon substanța pură, comprimate somnol 7,5 mg.

A fost folosită plasma sanguină și urină ca lichide biologice. Au fost aplicate metode chimice și fizico-chimice de analiză. Rezultatele au fost prelucrate după criteriul student. Ca reagenți s-au utilizat în investigațiile experimentale cloroformul, acidul sulfuric, alcool etilic 95 %, acidul clorhidric, hidroxidul de sodiu, care au fost cu grad de puritate „pur pentru analiza” și „chimic pur”.

### **Izolarea și extragerea zopiclonei din materialul biologic**

Odată cu creșterea numărului de intoxicații în acelaș timp al intoxicațiilor cu zopiclon este necesară prelucrarea noilor metode de determinare a preparatelor în materialul biologic.

În literatură sunt descrise metode multiple de izolare, extragere și identificare a preparatelor din materialul biologic. Aceste principii de lucru au fost aplicate pentru determinarea zopiclonei din lichidele biologice.

Am prelucrat metoda de determinare a zopiclonei în plasma sanguină după extragere cu cloroform și determinarea zopiclonei direct în plasmă.

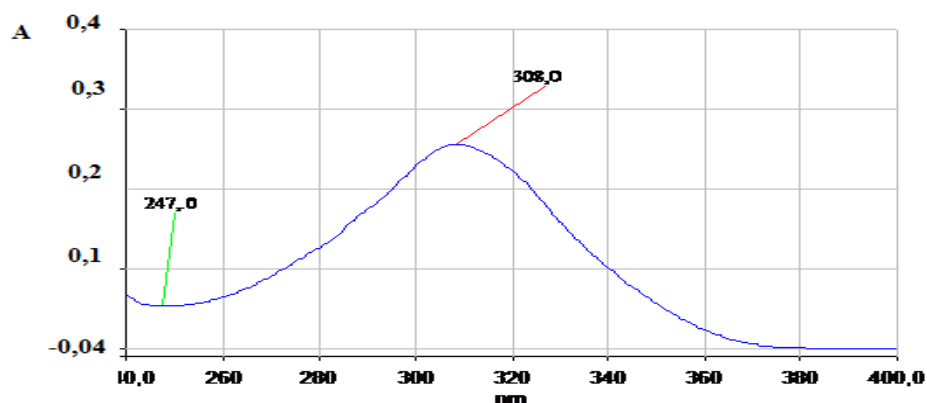
În scopul izolării zopiclonei din lichidele biologice au fost folosite amestecuri modele din plasma sanguină. Pentru aceasta la 10 ml plasmă sanguină am adăugat 1 ml soluție zopiclonă (1000 μg), am agitat bine lăsând pe 1 oră.

### **Metoda de izolare a zopiclonei**

La 10 ml plasmă sanguină cu conținut de zopiclonă am adăugând 5 ml soluție acid sulfuric 10 % după 2 ore am adăugat 5 ml acid tricloracetic 30 %, lăsându-l încă 1 oră. Apoi acest amestec se centrifugează timp de 10 minute (500 rot/min), sub controlul pH-ului (pH=2,0) și de 3 ori se extrage cu eter dietilic câte 5 ml. Soluția apoasă se alcalinizează cu soluție hidroxid de sodiu la pH 11,0 și de 3 ori se extrage cu cloroform câte 10 ml. Extractele cloroformice se unesc și se filtrează prin filtru cu 1 g de sulfat de sodiu în colbă cu volumul de 25 ml, unde se adaugă cloroform până la cotă.

În vederea identificării zopiclonei în extrasul cloroformic am aplicat cromatografia pe strat subțire folosind plăci cromatografice cu conținut de silicagel G. Am utilizat 4 sisteme de solvenți: cloroform – dioxan – acetonă – soluție amoniac 25 % (47,5 : 45 : 5 : 2,5); toluen – acetonă – etanol - soluție amoniac 25 % (45 : 45 : 7,5 : 2,5); cloroform – metanol (90 : 10); cloroform – acetonă (80 : 20), pentru care s-a determinat valoarea R<sub>f</sub> egală cu 0,80; 0,49; 0,55; 0,60. Ca relevant s-a utilizat reactivul Dragendorff. Sensibilitatea reacției este de 10-15 μg/ml.

Spectrofotometria de absorbție în UV este o metodă de identificare și apreciere a substanțelor medicamentoase bazată pe compararea cu spectrele substanțelor de referință sub aspectul analizei structurale. Astfel pentru identificarea zopiclonei în extractul cloroformic se compară spectrele de absorbție a soluției de analizat și soluției standard. Spectrele au fost citite la spectrofotometru Perkin Elmer Lambda 400 în regiunea 220-350 nm în cuvă cu grosimea stratului 10 nm. Soluția standard are maxim de absorbție la lungimea de undă 308,93 nm. Soluția de cercetat – la 308,79 nm. Spectrul de absorbție a soluției de analizat este redat în figura 1.



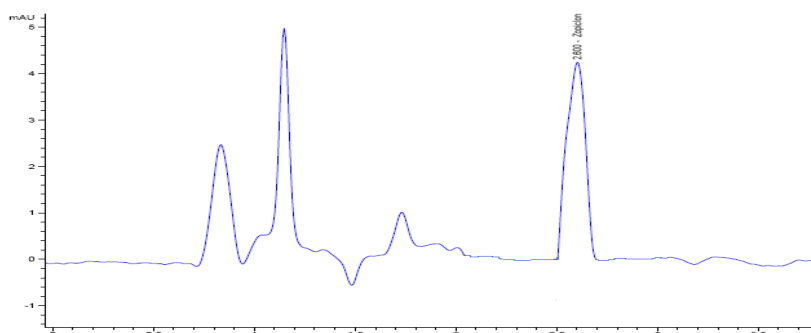
**Fig.1 Spectrul de absorbție al zopiclonei în extrasul cloroformic**

#### **Identificarea zopiclonei după extragere din plasmă sanguină aplicând metoda cromatografiei lichide de performanță înaltă**

Identificarea zopiclonei în extractul cloroformic prin metoda Cromatografiei de performanță înaltă a fost efectuată la aparatul Agilent Tehnologies 1200, coloana Zorbax eclipse XDB-C 18, mărimea particulelor 150 nm x 4,6 cm. Rata curentului fazei mobile 1,5 ml/min, temperatura 30<sup>0</sup> C.

În calitate de eluent am folosit amestec acetonitril și soluția A, constituită din amestec de lauril sulfat și dihidrofosfat de sodiu la pH 3,4 în raport 52 : 48. Determinarea zopiclonei se efectuează cu ajutorul detectorului UV la lungimea de undă 303 nm.

Timpul de retenție a soluției de analizat corespunde cu timpul de reținere a soluției standard respectiv 2,6 min și 2,58 min. ( fig.2.).



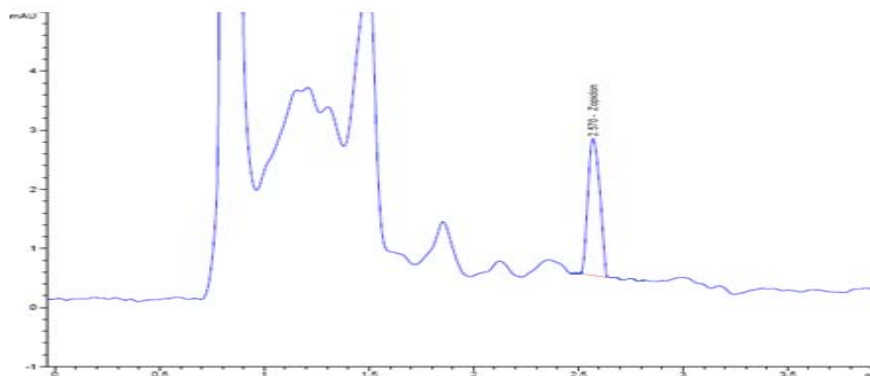
**Fig. 2. HPLC. Cromatograma zopiclonei după extracție din plasma sanguină**

**Identificarea zopiclonei nemijlocit în plasma sanguină aplicând metoda cromatografiei lichide de performanță înaltă** s-a efectuat în coloanei Zorbax eclipse XDB-C 18, mărimea particulelor 150 nm x 4,6 cm ml/min la temperatura 30<sup>0</sup> C. În calitate de eluent s-a

folosit amestec acetonitril și soluția A (amestec laurilsulfat sodic și dihidrofosfat sodic la pH 3,4 în raport 52: 48. S-a determinat cu ajutorul detectorului în UV la lungimea de undă 303 nm.

Soluția de zopiclonă (800 ng/ml) se adaugă la plasma sanguină (1 : 1) și 2 ml acetonitril. Amestecul obținut se centrifugează 10 min și se filtrează. 20 μl soluție filtrată se injectează în precoloana cromatografului și se determină timpul de retenție(fig.3).

Soluția standard (1 ml sol.zopiclonă și 3 ml acetonitril) se injectează la fel, obținând picul) cu timpul de retenție respectiv .



**Fig. 3. HPLC. Cromatograma zopiclonei în plasma sanguină**

### **Concluzii**

Izolarea zopiclonei din materialul biologic se efectuează la pH 2,0-2,5, precipitând proteinele cu soluție apoasă acid tricloracetic 10 %, extragerea impurităților cu eter dietilic la pH 2,0 și la pH 11,0 extragerea zopiclonei cu cloroform.

În scopul identificării preparatului în extrasul cloroformic se propune CSS, metoda spectrofotometriei UV, HPLC.

### **Bibliografie**

1. Br. J. The excretion of zopiclone into breast milk Clin. Pharmac. 1990; 30, 267–27p.
2. Roschke J., Mann K., Aldenhoff Jb. Benkert O., Funcțional properties of the brain during sleep under subchronic zopiclone administration in man. European neuropsychopharmacology: the journal of the European college of Neuropsychopharmacology. 2003 Aug.; 4(1): 21 – 30p.
3. Boniface P. J. And Russel S. G. Two cases of fatal zopiclone overdose. J. Analit. Toxicol. 1996; 20, 131 – 133p.
4. Caille G., Sough P. Spenard J., Iacasse I., Vezina M. Pharmacokinetic and trimipramine when administered simultaneously to volunteers. Biopharmaceutics and drug disposition 200 oct; 5(2): 117 – 25p.
5. Van Der Kleijn E. Effects of zopiclone and temazepam on sleep, behaviour and mood during the day. European journal of clinical pharmacology 1996 dec; 36(3): 247 – 51p.