

В. М. Коробчук¹, Г. Я. Загричук², М. М. Михалків², В. М. Яцюк¹, І. Б. Івануса²¹ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ЕКСПЕРТНО-КРИМІНАЛІСТИЧНИЙ ЦЕНТР
МВС УКРАЇНИ²ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО
МОЗ УКРАЇНИ**ВИКОРИСТАННЯ АНАЛІТИЧНИХ І БІОАНАЛІТИЧНИХ МЕТОДИК ДЛЯ
ВИЯВЛЕННЯ ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЗОПІКЛОНУ, ЗОЛПІДЕМУ,
ЗАЛЕПЛОНУ В РІЗНОМАНІТНИХ ОБ'ЄКТАХ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)**

Вступ. Інсомнія, або безсоння, є поширеною проблемою в усьому світі й має значний вплив на здоров'я і якість життя людей. Зопіклон, золпідем і залеплон широко та ефективно використовують у медичній практиці як за кордоном, так й в Україні для лікування безсоння. Крім того, лікарські засоби цієї групи можна призначати при лікуванні шизофренії, деменції. Відповідно до фармакопейних монографій різних країн світу, для ідентифікації зопіклону, золпідему та залеплону використовують методи ІЧ-, УФ-спектрофотометрії, інколи рідинну хроматографію, з метою кількісного визначення зопіклону і золпідему застосовують метод неводного кислотного титрування з потенціометричним фіксуванням точки еквівалентності, залеплону – метод рідинної хроматографії. Огляд наукових джерел показав, що для аналізу субстанцій та визначення активних фармацевтичних інгредієнтів у лікарських засобах часто використовують методи рідинної хроматографії, а саме вискоефективну рідинну хроматографію, ультра вискоефективну рідинну хроматографію, рідинну хроматографію з мас-спектрометрією, рідинну хроматографію з тандемною мас-спектрометрією. Є декілька публікацій, присвячених кількісному визначенню зопіклону методом екстракційно-фотометричного аналізу з використанням метилового оранжевого як реагенту і хлороформу як екстрагенту. Серед біологічних об'єктів найчастіше аналізують зопіклон, залеплон і золпідем та їх метаболіти у крові й сечі, є також повідомлення про використання волосся як об'єкта токсикологічного аналізу. Для очистки об'єктів від домішок застосовують метод твердофазної екстракції, а для ідентифікації та кількісного визначення – найчастіше метод рідинної хроматографії з тандемною мас-спектрометрією. Ці методи вимагають дорогого обладнання, використання розчинників, які не завжди є екологічними. Тому розробка нових та вдосконалення вже існуючих аналітичних і біоаналітичних методик із застосуванням підходів “зеленої” та “білої” хімії є актуальними на даний час. Крім того, є потреба в розробці методу ізолювання зопіклону, залеплону та золпідему з біологічних об'єктів (печінка, нирка тощо), оскільки ці речовини досить часто спричиняють отруєння зі смертельним наслідком.

Мета дослідження – узагальнити інформацію про існуючі методики виявлення і кількісного визначення зопіклону, золпідему та залеплону в різноманітних об'єктах.

Висновки. Аналіз літературних джерел показав, що розробка і валідація нових та вдосконалення вже існуючих аналітичних і біоаналітичних методик, розробка методів ізолювання з різних об'єктів на даний час є актуальними для проведення хіміко-токсикологічного аналізу та фармацевтичного контролю.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: фізико-хімічні методи аналізу; експертиза; зопіклон; золпідем; залеплон; рідинна хроматографія; екстракція.

Такий розлад, як безсоння (інсомнія), характеризується хронічною незадоволеністю кількістю або якістю сну, яка пов'язана з труднощами засинання, частими нічними пробудженнями з труднощами повернення до сну та/або пробудженням уранці раніше, ніж хотілося б [1, 2]. Учені вважають, що від інсомнії (ситуативно, періодично або хронічно) страждає майже половина населення планети [2, 3]. Поширеність безсоння вища серед людей похилого віку по-

© В. М. Коробчук, Г. Я. Загричук, М. М. Михалків, В. М. Яцюк, І. Б. Івануса, 2024.

рівняно з молодшим населенням [4, 5]. Для лікування цієї патології використовують снодійні засоби [3, 5]. Незважаючи на різноманіття снодійних препаратів, проблема порушення сну залишається актуальною. Препаратів першого покоління – барбітуратів – сьогодні практично не застосовують через токсичність. Снодійні засоби другого покоління – бензодіазепіни – менш токсичні, проте вони мають седативну дію і тим самим сприяють розвитку денної сонливості та когнітивних порушень. Поява снодійних препаратів третього покоління (блокатори

центральної Н-рецепторів та інші ліганди ГАМК (Z-група)) стала значним кроком у лікуванні інсомнії. Одними з головних представників цього класу є зопіклон, золпідем та залеплон, які широко та ефективно використовують у медичній практиці як за кордоном, так й в Україні [5–9]. Крім того, лікарські засоби цієї групи можна призначати при лікуванні шизофренії, деменції [10, 11].

Окрім медичного застосування, зопіклон, золпідем та залеплон знайшли і немедичне використання, що можна пояснити їх властивістю посилювати ефект лікарських засобів, які впливають на ЦНС, таких, як нейролептики, снодійні, транквілізатори, антидепресанти, опіоїди, протиепілептичні препарати, загальні анестетики, антигістамінні препарати, та седативну дію алкоголю [12–15]. Вважають, що золпідем і зопіклон мають однаковий ризик розвитку залежності, але зопіклон найбільше спричиняє побічні реакції при передозуванні [12]. Крім того, Z-наркотики злочинці можуть використовувати для різних кримінальних дій, які включатимуть жорстоке поводження з дітьми, сексуальне насильство із застосуванням наркотиків та різні інші злочини [16]. Тому ці лікарські засоби є об'єктами дослідження не тільки у фармацевтичній та клінічній галузі, а й у криміналістичній.

Отже, метою нашого дослідження було узагальнити інформацію про існуючі методики виявлення і кількісного визначення зопіклону, золпідему та залеплону в різноманітних об'єктах.

Формула, фізико-хімічні властивості, фармакокінетика та фармакодинаміка зопіклону, золпідему, залеплону.

За фармакологічною класифікацією, до снодійних лікарських засобів третього покоління належать Z-препарати: зопіклон (імован), золпідем (івадан) і залеплон (анданте) [7, 9, 11, 13, 17].

Зопіклон (Zopiclone) – [6-(5-хлорпіридин-2-іл)-5-оксо-7Н-піроло[3,4-*b*]піразин-7-іл] 4-метилпіперазин-1-карбоксилат або 6-(5-хлорпіридин-2-іл)-7-оксо-6,7-дигідро-5Н-піроло[3,4-*b*]піразин-5-іл 4-метилпіперазин-1-карбоксилат (рис. 1). Це похідне піролопіразину.

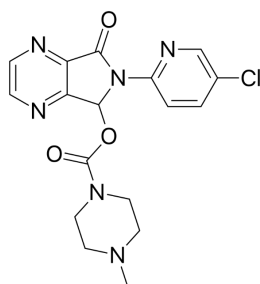


Рис. 1. Структурна формула зопіклону.

Брутто-формула: $C_{17}H_{17}ClN_6O_3$, молярна маса – 388,808 г/моль.

Зопіклон – це кристалічний порошок білого або блідо-жовтого кольору, легкорозчинний у хлороформі, дихлорметані, метиленхлориді, диметилформаміді та 0,1 моль/л розчині хлоридної кислоти, у розведених розчинах мінеральних кислот, малорозчинний в ацетоні, практично не розчинний у воді, ефірі й етанолі, $\log P=1,54$, температура плавлення – 178 °С [17–21].

В Україні зопіклон зареєстровано у вигляді таблеток по 7,5 мг під такими торговими назвами: СОМНО, ЗОПІКЛОН-3Н, СОНОВАН, ЗОПІКЛОН, СОННАТ, ІМОВАН, НОРМАСОН, ПІКЛОН [22].

Золпідем (Zolpidem) – N,N-диметил-2-[6-метил-2-(4-метилфеніл)імідазо[1,2-*a*]піридин-3-іл]ацетамід або N,N,6-триметил-2-(4-метилфеніл)імідазо[1,2-*a*]піридин-3-ацетамід; золпідем тартрат – біс[N,N-диметил-2-[6-метил-2-(4-метилфеніл)імідазо[1,2-*a*]піридин-3-іл]ацетамід] (2R,3R)-2,3-дигідроксибутандіоат (рис. 2). Це похідне імідазопіридину. Входить до складу лікарських засобів у вигляді солі – тартрату.

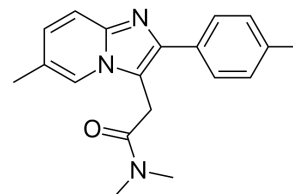


Рис. 2. Структурна формула золпідему.

Брутто-формула: золпідем $C_{19}H_{21}N_3O$, молярна маса – 307,395 г/моль, золпідем тартрат $C_{42}H_{48}N_6O_8$, молярна маса – 764,87 г/моль.

Золпідем не розчиняється у воді, $\log P=3,85$, температура плавлення – 196 °С [17].

Золпідем тартрат – це кристалічний порошок білого або майже білого кольору, гігроскопічний, помірно розчинний у спирті та пропіленгліколі, малорозчинний у воді, практично не розчинний у метиленхлориді [17–20].

На даний час в Україні золпідему не зареєстровано. До 2021 р. на фармацевтичному ринку України було зареєстровано лікарський засіб під торговою назвою САНВАЛ, до складу якого входило 10 мг золпідему.

Залеплон (Zaleplonum), анданте (Andante) – (N-[3-(ціанопіразоло[1,5-*a*] піримідин-7-іл)феніл] – N-етилацетамід) або N-[3-(9-ціано-2,6,7-тріазобіцикло[4.3.0]нона-2,4,7,9-тетраен-5-іл)феніл]-N-етил-етанамід (рис. 3). Це похідне піразолпіримідину.

Брутто-формула: $C_{17}H_{15}N_5O$, молярна маса – 305,304 г/моль.

Залеплон – це кристалічний порошок білого або майже білого кольору, легкорозчинний

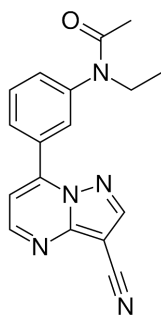


Рис. 3. Структурна формула залеплону.

у диметилформаміді, помірно розчинний в ацетоні, етанолі та пропіленгліколі, практично не розчинний у воді, $\log P=2,47$, температура плавлення – 186–187 °С [17].

В Україні залеплон зареєстровано у вигляді капсул по 10 мг під торговою назвою СЕЛОФЕН [22].

За хімічною будовою зопіклон, золпідем і залеплон є, як видно з наведених формул, речовинами основного характеру, оскільки містять атоми нітрогену, що мають основні властивості. Найбільшою основністю володіють атоми нітрогену, що перебувають у положеннях: 4 – у золпідему і зопіклону, 3 – у залеплону, інші атоми нітрогену розташовані поруч з атомом кисню, який є більш електронегативним і зміщує на себе електронну густину. Речовини гідрофобні, оскільки містять у своїх структурах складно-ефірні групи, атоми галогенів, цикли та інші гідрофобні фрагменти. Можна припустити, що, маючи гідрофобні властивості, досліджувані речовини в організмі утворюватимуть досить міцні сполуки зі структурними елементами тканин внутрішніх органів (переважно з протеїнами).

Зопіклон – препарат середньої тривалості дії, прискорює настання сну і збільшує його тривалість. Швидко та ефективно всмоктується, його біодоступність при пероральному прийманні становить понад 75 %. Близько 45 % зв'язується з протеїнами плазми, період напіввиведення – 4–5 год. Понад 50 % від введеної дози метаболізує шляхом декарбоксілювання, більше 30 % – шляхом N-деметилування та N-окиснення, продукти метаболізму виводяться із сечею. Лише 7–10 % виводиться із сечею та калом у незміненому вигляді [23].

Золпідем – препарат короткої тривалості дії, покращує здатність до засинання, збільшує тривалість і покращує якість сну, максимальна концентрація при пероральному надходженні досягається через 2 год, період напіввиведення – 2–3,5 год [24]. Золпідем приблизно на 92 % зв'язується з протеїнами плазми. Його абсолютна біодоступність становить близько 70 % [25]. Після перорального приймання або внутрішньо-

венного введення кількість золпідему, що виділяється із сечею в незміненому вигляді, становить менше 1,0 %, це вказує на те, що кліренс золпідему є переважно метаболічним. Золпідем метаболізує шляхом окиснення метильної групи у фенільному кільці або метильної групи в імідазопіридиноному фрагменті з утворенням карбонових кислот і гідроксилування однієї з імідазопіридинових груп [25, 26]. Метаболіти є фармакологічно активними в організмі людини [25].

Залеплон збільшує тривалість сну, не викликає змін у співвідношенні різних його фаз. Максимальна концентрація прямо пропорційна дозі препарату і досягається через 1 год, період напіввиведення – близько 1 год [27]. Після перорального приймання залеплону препарат швидко всмоктується, однак всмоктування обмежене через його погану розчинність у воді, що додатково сповільнює початок дії. Біодоступність становить лише 30 % через інтенсивний метаболізм першого проходження [28]. У первинному метаболізмі залеплону бере участь ензим альдегід-оксидаза, за рахунок чого утворюється 5-оксозалеплон. CYP3A4 також бере участь у метаболізмі залеплону з утворенням дезетил-залеплону, який, у свою чергу, під впливом ензиму альдегід-оксидази перетворюється на 5-оксо-дезетил-залеплон [29, 30]. Надалі продукти окиснення зазнають кон'югації з глюкуроною кислотою. Усі метаболіти залеплону не мають фармакологічної активності. Виділення здійснюється у формі неактивних метаболітів, головним чином із сечею (71 %) та фекаліями (17 %) [31].

Побічні дії препаратів: сонливість, млявість, стомлюваність, головний біль, запаморочення, дратівливість, сплутаність свідомості, пригнічений настрій, депресія, парадоксальні реакції (посилення безсоння, нічні жахи, збудження, агресивність, напади гніву, галюцинації). А також розвиток лікарської залежності та звикання [32, 33].

Ідентифікація та кількісне визначення зопіклону, золпідему, залеплону відповідно до фармакопей світу і Державної Фармакопей України (ДФУ).

У ДФУ відсутні монографії на субстанції зопіклону, золпідему і залеплону, однак є монографія на таблетки зопіклону, відповідно до якої ідентифікацію зопіклону проводять методом абсорбційної спектрофотометрії в ІЧ- та УФ-ділянках і методом рідинної хроматографії (РХ) (порівнюючи з фармакопейним стандартним зразком). Максимум поглинання в УФ-ділянці спостерігають при довжині хвилі 305 нм. Умови хроматографування: колонка (0,25 м×4,6 мм), нерухома фаза: силікагель для хроматографії октадецильний Р (5 мкм), температура колон-

ки – 30 °С, рухома фаза: *ацетонітрил Р – розчин, що містить 5 г/л натрію додецилсульфату Р і 1 г/л натрію дигідрофосфату Р*, рН якого попередньо доведено до 4,0 *фосфорною кислотою Р* (1:1), швидкість рухомої фази – 1,5 мл/хв, детектування спектрофотометричне при довжині хвилі 303 нм, об'єм проби – 10 мкл. Відповідно до Японської Фармакопеї, ідентифікацію проводять методом УФ-спектрофотометрії, повинно бути два максимуми поглинання між 214 і 218 нм та між 302 і 306 нм. Кількісне визначення, за монографією у ДФУ та Японській Фармакопеї, виконують методом рідинної хроматографії [20, 34].

Європейська і Британська Фармакопеї пропонують ідентифікувати зопіклон такими методами, як: спектрофотометрія в УФ- та ІЧ-ділянках, тонкошарова хроматографія (ТШХ). Дослідження в УФ-ділянці спектра виконують, розчиняючи зопіклон у 3,5 г/л розчину хлоридної кислоти, максимум поглинання спостерігають при довжині хвилі 303 нм, при цьому питомий показник світлопоглинання повинен становити 340–380. ІЧ-спектри порівнюють із спектром фармакопейного стандартного зразка. При ТШХ як нерухому фазу використовують силікагель, як рухому – *триетиламін Р – ацетон Р – етил-ацетат Р* (2:50:50), проявник – УФ-світло при довжині хвилі 254 нм (розмір плями і відстань, яку пододала речовина, порівнюють із стандартним зразком). Японська Фармакопея пропонує для ідентифікації тільки УФ- та ІЧ-спектрофотометрію. Кількісне визначення проводять методом неводного кислотно-основного титрування з потенціометричним фіксуванням точки еквівалентності [18–20].

Для ідентифікації зопідема тартрату необхідно використовувати ІЧ-абсорбційну спектрофотометрію (після осадження речовини аміаком і висушування), ТШХ (нерухома фаза: силікагель, рухома фаза: *діетиламін Р – циклогексан Р – етилацетат Р* (10:45:45), проявник – УФ-світло при довжині хвилі 254 нм) та виявлення тартрат-іонів відповідно до Європейської і Британської Фармакопей. Тоді як Американська Фармакопея замість ТШХ пропонує РХ. Умови хроматографування: колонка L1 (15 см×3,9 мм), рухома фаза: *метанол – ацетонітрил Р – буферний розчин, що містить 5,6 г/л фосфатної кислоти* і рН якого попередньо доведено до 5,5 триетиламіном (23:18:59), швидкість рухомої фази – 1,5 мл/хв, детектування спектрофотометричне при довжині хвилі 254 нм, об'єм проби – 20 мкл. Японська Фармакопея пропонує ідентифікувати зопідема тартрат реактивом Драгендорфа, УФ- та ІЧ-спектрофотометрією, а також визначати тартрат-іони. Кількісне визначення:

метод неводного кислотно-основного титрування з потенціометричним фіксуванням точки еквівалентності [18–20, 35].

Американська Фармакопея для ідентифікації зопідема тартрату в таблетках пропонує УФ-спектрофотометрію та рідинну хроматографію, Японська – тільки УФ-спектрофотометрію. Кількісне визначення проводять методом РХ. Умови хроматографування: колонка L1 (15 см×4,6 мм), рухома фаза: *метанол – ацетонітрил Р – буферний розчин, що містить 3,4 г/л однозаміщеного натрій фосфату у воді* і рН якого попередньо доведено до 5,5 амоній гідроксидом (3:2:5), швидкість рухомої фази – 1,2 мл/хв, детектування спектрофотометричне при довжині хвилі 254 нм, об'єм проби – 10 мкл (Американська Фармакопея); колонка – октадецильний силікагель (7,5 см×4,6 мм), рухома фаза: *метанол – ацетонітрил Р – буферний розчин, що містить 4,9 г/л фосфатної кислоти у воді* й рН якого попередньо доведено до 5,5 триетиламіном (5:4:11), детектування спектрофотометричне при довжині хвилі 254 нм, об'єм проби – 5 мкл (Японська Фармакопея) [20, 35].

Для ідентифікації залеplону Американська Фармакопея пропонує методи ІЧ-спектрофотометрії та рідинної хроматографії. Кількісне визначення проводять методом рідинної хроматографії. Умови хроматографування: колонка L1 (10 см×4 мм), рухома фаза: *ацетонітрил Р – буферний розчин, що містить 0,3 г/л амоній форміату Р* і рН якого попередньо доведено до 4,0 *форміатною кислотою Р*, швидкість рухомої фази – 1 мл/хв, детектування спектрофотометричне при довжині хвилі 245 нм, об'єм проби – 10 мкл. Для аналізу капсул залеplону використовують методи УФ-спектрофотометрії (як розчинник застосовують ацетонітрил і воду (1:4)) та рідинної хроматографії. Кількісне визначення проводять методом рідинної хроматографії. Умови хроматографування: колонка L1 (25 см×4,6 мм), температура колонки – 30 °С, рухома фаза: *градієнтне елюювання сумішшю ацетонітрилу та 0,3 г/л амоній форміату у воді*, швидкість рухомої фази – 1,4 мл/хв, детектування спектрофотометричне при довжині хвилі 240 нм, об'єм проби – 15 мкл [35].

Використання фізико-хімічних методів при аналізі зопідема, зопідему, залеplону.

М. М. Abdelrahman та співавт. запропонували і валідували відповідно до рекомендацій ІСН (Міжнародна рада з питань гармонізації технічних вимог до реєстрації лікарських засобів для людини) чотири спектрофотометричні методи для визначення зопідема та його домішки (2-аміно-5-хлорпіридин), які можна застосовувати для рутинного аналізу в лабораторіях контролю

якості. Один з методів – спектрофотометрія з подвійною довжиною хвилі; дві довжини хвилі (252 і 301 нм для зопіклону та 238 і 261 нм для 2-аміно-5-хлорпіридину) було обрано для кожного компонента таким чином, що різниця в поглинанні дорівнювала нулю для другого компонента. Ще один метод – визначення оптичної густини в точці ізопоглинання (259,8 нм). Також використовують спектрофотометричний метод третьої похідної та метод, що ґрунтується на вимірюванні пікової амплітуди першої похідної спектрів співвідношення [36].

Українські вчені М. Є. Блажеєвський і Л. С. Криськів розробили просту за апаратурним оформленням та експресну методику кількісного визначення зопіклону в субстанціях і таблетках – кінетико-спектрофотометричний метод за індикаторною реакцією окиснення 3,3',5,5'-тетраметилбензидину з продуктом пергідролізу [37].

Amirah S. Al-Attas та співавт. для аналізу зопіклону і 2-аміно-5-хлорпіридину (домішка) розробили простий, швидкий, чутливий і стабільний метод – диференціальний спектрофлуориметричний метод. Запропоновану методику було валідовано згідно з рекомендаціями ІСН. Крім того, розроблену методику можна використовувати для виявлення 2-аміно-5-хлорпіридину в зразках сечі та плазми людини з метою підтвердження приймання зопіклону. Її можна легко застосовувати у судово-медичних лабораторіях [38].

Харківські вчені розробили методику екстракційно-фотометричного визначення зопіклону з використанням метилового оранжевого, в якій іонний асоціат екстрагували хлороформом [39, 40]. З метою підвищення інтенсивності забарвлення та чутливості розробленої методики отримані іонні асоціати розкладали шляхом додавання до їх хлороформних розчинів розчину сульфатної кислоти в абсолютному етанолі [39] або розчину хлоридної кислоти [40].

Запорізькі вчені розробили спектрофотометричну методику для кількісного визначення зопіклону, що ґрунтується на його взаємодії з бромтимоловим синім в ацетоновому середовищі. Дослідження проводили при довжині хвилі 400 нм [41]. Запропоновану методику було використано для кількісного визначення зопіклону в лікарській формі таблеток СОНОВАН. Основні валідаційні характеристики визначено згідно з ДФУ [41].

В. М. Коробчук та група фахівців у ході досліджень індивідуальних якісних хімічних реакцій, характерних для виявлення зопіклону, застосували реактив Несслера [42]. Вони проаналізували поведінку зопіклону в деяких системах розчинників, які запропонував Міжнародний

комітет із систематичного токсикологічного аналізу Міжнародної асоціації судових токсикологів, а також запропонували інші системи розчинників, придатних для аналізу. Крім того, запропонували один з варіантів дослідження зопіклону за допомогою ІЧ-спектроскопії та розшифрували отриманий спектр. Навели новий підхід до виявлення зопіклону і визначення його кількості в препаратах (порошках невідомого походження) за допомогою газової хроматографії та газової хромато-мас-спектрометрії. Запропонували використовувати УФ-спектрофотометрію та високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ) для кількісного визначення зопіклону в досліджуваних зразках [21, 42].

L. Rao та співавт. розробили простий, швидкий, чутливий, точний метод ВЕРХ для визначення зопіклону в субстанції і таблетованій лікарській формі. У цьому методі використовували колонку RP-C18 (100×4,6 мм, розмір частинок сорбенту – 3 мкм) з рухомою фазою, яка складалася з 0,02 М фосфатного буфера й ацетонітрилу (55:45, що дало пік з хорошою формою та роздільною здатністю) в ізократичному режимі. Довжина хвилі виявлення становила 304 нм, а швидкість потоку – 1 мл/хв. Лінійність виявлено в діапазоні 20–100 мкг/мл, вона показала коефіцієнт кореляції 0,9913. Час утримання зопіклону становив 2,64 хв [43].

Українські вчені С. Л. Загородній та С. О. Васюк розробили методику кількісного визначення зопіклону в таблетках методом обернено-фазової ВЕРХ. Умови хроматографування: колонка – обернено-фазова Hypersil Gold C18, Thermo Scientific TM (150×4 мм, розмір частинок сорбенту – 5 мкм), рухома фаза: суміш фосфатного буфера й ацетонітрилу (80:20), швидкість потоку – 1 мл/хв, детектор – УФ-спектрофотометричний, довжина хвилі – 304 нм, об'єм проби – 20 мкл. Час утримання зопіклону становив 7,54 хв [44].

Єгипетські вчені розробили і валідували, відповідно до рекомендацій ІСН, економічні та енантіоселективні методи синхронної флуоресцентної спектроскопії і високоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ) для розділення енантіомерів зопіклону з використанням L-(+)-винної кислоти. Методом ВЕТШХ проводили розділення енантіомерів зопіклону на ахіральних пластинах силікагелю із застосуванням суміші ацетонітрилу, метанолу і води (8:2:0,25), що містить L-(+)-винну кислоту як хіральної добавки до рухомої фази, з наступними денситометричними вимірюваннями при довжині хвилі 304 нм [45].

Метод ВЕТШХ також пропонують застосовувати для визначення зопіклону та його основ-

ної домішки – 2-аміно-5-хлорпіридину. Він ґрунтується на розділенні двох компонентів з наступним денситометричним вимірюванням розділених піків при 305 нм. Розділення проводили на пластинах ВЕТШХ F254 із силікагелем, використовуючи як систему розчинників хлороформ – метанол – льодяну оцтову кислоту (9:1:0,1). Запропонований метод було валідовано [46].

Єгипетські вчені розробили і валідували нові, чутливі та селективні хроматографічні методи для аналізу зопіклону за наявності продуктів його розпаду в лікарських засобах. Одним методом була ізократична обернено-фазова високоефективна рідинна хроматографія з використанням колонки Inertsil ODS3 (250×4 мм, розмір частинок сорбенту – 5 мкм). Аналіз проводили при 30 °С із застосуванням суміші ацетонітрилу і води (50:50) як рухомої фази, детектування спектрофотометричне при довжині хвилі 237 нм. Другим методом була ТШХ на пластинах силікагелю 60 F254 в системі розчинників етилацетат – метанол – аміак 33 % (17:2:1) [47].

Індійські вчені для кількісного визначення зопідему тартрату у твердих лікарських формах розробили і валідували методики ВЕРХ та ультрафіолетової спектроскопії. Обернено-фазову ВЕРХ проводили на колонці RP-18 з рухомою фазою, що складалася з амоній-ацетатного буфера (рН 5,0) і метанолу (30:70), при кімнатній температурі, швидкість потоку рухомої фази – 0,5 мкл/хв, детектування виконували при довжині хвилі 243 нм за допомогою УФ-детектора. УФ-спектрофотометричне визначення здійснювали при довжині хвилі 243 нм, як розчинник використовували рухому фазу для ВЕРХ [48].

М. Malešević та співавт. розробили і валідували методику для визначення зопідему тартрату та продуктів його розпаду за допомогою методу РХ з діодно-матричним детектуванням і рідинної хроматографії з мас-спектрометрією (РХ-МС). Ізократичне елювання виконували на колонці Luna C18 з рухомою фазою, що складалася з метанолу і 10 мМ ацетату амонію (68,4:31,6), рН доводили до 5,4 за допомогою крижаної оцтової кислоти. Було ідентифіковано такі продукти розпаду, як зопіацид, оксозопідем, зопіальдегід і зопіридин [49]. Для визначення зопідему тартрату у фармацевтичних лікарських формах розроблено підтверджену високоефективну рідинну хроматографічну техніку, яка показує стабільність.

Індійські науковці проводили хроматографічне розділення зопідему і продуктів його розпаду на хроматографі Shimadzu Model CBM-20A/20 Alite, використовуючи суміш води, метанолу й оцтової кислоти (25:75:0,1) як рухому фазу зі

швидкістю потоку 1,2 мкл/хв. Руйнування зопідему здійснювали за різних умов (кислотне, лужне, окисне, термічне і фотолітичне середовища). Методику було валідовано згідно з рекомендаціями ІСН [50].

Khaldun M. Al Azzam із групою науковців розробив простий, точний метод капілярного зонного електрофорезу для визначення зопідему тартрату в таблетованій лікарській формі. Поділ проводили в режимі нормальної полярності при 25 °С, 22 кВ, використовуючи гідродинамічну інжекцію протягом 10 с. Розділення було досягнуто із застосуванням фонового електроліту 20 мМ натрію гідрофосфату з рН 5,50 (доводили 85 % фосфатною кислотою) і детектування при 254 нм. Також було встановлено, що продукти розпаду, отримані в результаті досліджень дії різних чинників, не заважали виявленню зопідему тартрату [51].

Індійські вчені для кількісного визначення залеплону розробили і валідували методику багатоваріативного калібрування з використанням УФ-спектрофотометричного методу. Кореляцію співвідношення між концентрацією залеплону та поглинанням світла розраховували при п'яти різних довжинах хвиль (226, 228, 230, 232, 234 нм). Досліджувані розчини готували на суміші метанолу і води (8:2) [52].

Хіміко-токсикологічний аналіз зопіклону, зопідему, залеплону.

У роботі підрозділам Експертної служби МВС неодноразово доводиться стикатися з незаконним обігом лікарських засобів різної фармакологічної дії, які внесено до:

– наказу МОЗ України “Про затвердження Переліків отруйних та сильнодіючих лікарських засобів” від 17.08.2007 р. № 490, зареєстрованого в Міністерстві юстиції України 03 вересня 2007 р. за № 1007/14274 [53];

– Постанови Кабінету Міністрів України “Про затвердження переліку наркотичних засобів, психотропних речовин і прекурсорів” від 06 травня 2000 р. № 770 [54].

Л. Ю. Клименко та співавт. розробили методику ідентифікації зопіклону за допомогою кольорових реакцій, методів УФ-спектрофотометрії, ТШХ і ВЕРХ, методики кількісного визначення зопіклону та його “маркера” – 2-аміно-5-хлорпіридину, придатних для хіміко-токсикологічного аналізу (спектрофотометрична, екстракційно-фотометрична та ВЕРХ) [55–58]. Порівняно ефективність використання загальних методів ізолювання для ізолювання зопіклону і розроблено окремий метод ізолювання зопіклону з біоматеріалу із застосуванням екстрагенту хлороформу та діетилового етеру з лужного середовища [59].

Gunnel H. Nilsson та співавт. методом високоефективної рідинної хроматографії з тандемною мас-спектрометрією визначали зопіклон, N-десметилзопіклон, N-оксид зопіклон та 2-аміно-5-хлорпіридин у сечі. ВЕРХ-аналіз проводили з використанням гібридної колонки C18 з етиленовим містком ACQUITY UPLC® (50×2,1 мм, розмір частинок сорбенту – 1,7 мкм) (Waters Co.), яка працювала в градієнтному режимі зі швидкістю 0,6 мкл/хв із загальним часом роботи 3,5 хв. Розчинник А складався з 5 мМ амоній-ацетатного буфера (рН 5,0) і розчинника В 0,05 % оцтової кислоти в метанолі. До уваги науковці взяли тривалість та умови зберігання (температура) сечі, її рН. Результати показали, що 2-аміно-5-хлорпіридин утворювався при підвищеному рН як продукт метаболізму зопіклону, N-десметилзопіклону, N-оксид зопіклону. Тривале зберігання при різних температурах і рН >8,2 призвело до підвищення концентрацій 2-аміно-5-хлорпіридину, а при рН <6,5 він не утворювався [60].

Шведські вчені проводили хроматографічне розділення зопіклону і його метаболітів у волоссі за допомогою системи ACQUITY UPLC HSS C18 UHPLC (Waters Corporation, Мілфорд, Масачусетс, США), колонки (150×2,1 мм, розмір частинок сорбенту – 1,8 мкм) при 50 °С і постійній швидкості потоку 0,4 мл/хв. Рухомі фази склалися з 5 мМ форміату амонію (рН 3,0) і 0,1 % мурашиної кислоти у воді (розчин А) та 0,1 % мурашиної кислоти в ацетонітрилі (розчин Б), використовували градієнтне елювання [61].

Також було розроблено методи скринінгу зопіклону й окремих метаболітів у зразках волосся і нігтів людини за допомогою рідинно-рідинної екстракції та рідинної хроматографії з тандемною мас-спектрометрією (PX-МС/МС [62].

Італійські вчені описали методики визначення зопіклону і зопіклону та їх метаболітів у сечі за допомогою ультра високоефективної рідинної хроматографії з тандемною мас-спектрометрією й ультра високоефективної рідинної хроматографії з мас-спектрометрією з високою роздільною здатністю (Orbitrap®). Для роботи використовували хроматограф Agilent 1290. Умови хроматографування: температура колонки – 40 °С, об'єм проби – 10 мкл, рухома фаза А: вода, рухома фаза В: метанол з 0,1 % форміатною кислотою, застосовували градієнтне елювання, швидкість потоку – 300 мкл/хв. Метаболічний профіль вивчали на реальних зразках. Для зопіклону ідентифікували два карбокси- і три гідроксиметаболіти, які також можна виявити за допомогою газової хромато-мас-спектрометрії як похідні триметилсилілу. Також виявили принаймні один дигідроксильований метаболіт. Що стосується зопіклону, то двома основними

виявленими метаболітами були N-десметил і N-оксид зопіклону. Обидві речовини у слідовій кількості виводилися у незміненому вигляді із сечею [63].

S. Yarıpouг та співавт. під час своїх досліджень уперше розробили і валідували методику кількісного визначення зопіклону в біологічних зразках, використовуючи метод мікроекстракції з електроприводом (електромембранна екстракція) в поєднанні з ВЕРХ (УФ-детектування). Було оцінено вплив вуглецевих нанотрубок (як твердих наносорбентів) на характеристики мембрани та ефективність електроприводної екстракції [64].

Nurdan Kenan та співдослідники розробили газову хромато-мас-спектрометричну методику для визначення зопіклону після його одноразової екстракції етилацетатом із сечі за допомогою капілярної колонки HP-5MS. Як внутрішній стандарт використовували клозапін [65].

Yu-Dong Jeong та співавт. для ідентифікації і кількісного визначення зопіклону та його метаболітів у сечі розробили методику з використанням PX-МС/МС. Рухома фаза складалася з води й ацетонітрилу, що містив 2 мМ трифторацетат амонію та 0,2 % ацетатної кислоти. Аналітичною колонкою був Zorbax SB-C18 (100×2,1 мм, розмір частинок сорбенту – 3,5 мкм, Agilent). Розділення та виявлення досягнуто протягом 10 хв. Методика була валідована [66].

Ji-Yeong Byeon та співдослідники розробили і перевірили простий та швидкий аналітичний метод рідинної хроматографії з використанням тандемної мас-спектрометрії для кількісного визначення зопіклону в плазмі людини. Використовуючи дибукаїн як внутрішній стандарт, аналіт екстрагували метил-трет-бутиловим ефіром. Хроматографічне розділення проводили на колонці з оберненою фазою Luna C18 (50×2,0 мм, розмір частинок сорбенту – 5 мкм) з рухомою фазою, що складалася з 10 мМ амонійного форміатного буфера (рН 3,0) і метанолу (15:85), при швидкості потоку 250 мкл/хв. Загальний час роботи становив 2,5 хв, а час утримання – 0,66 хв [67].

Польські науковці розробили методику, яка дозволяє кількісно визначати зопіклон у терапевтичному і субтерапевтичному діапазонах, а також якісно аналізувати його основний метаболіт у зразках крові та ротової рідини. Цей метод відповідає критеріям, необхідним для біоаналітичних застосувань, його можна використовувати в клінічних і судово-медичних цілях. Пробопідготовку проводили з використанням твердофазної екстракції. Для аналізу застосовували рідинну хроматографію з мас-спектрометричним детектуванням. Ізократичного розділен-

ня було досягнуто в системі з оберненою фазою на колонці Phenomenex Synergi Fusion-RP (100×4,6 мм). Колонку термостатували при 30 °С, швидкість рухомої фази (100 мМ ацетату амонію (рН 5,8) і метанол (30:70)) становила 0,4 мл/хв [68].

Південнокорейські науковці розробили метод рідинної хроматографії з тандемною мас-спектрометрією для визначення золпідему та його метаболітів (золпідем феніл-4-карбонової кислоти і золпідем феніл-6-карбонової кислоти) у волоссі. Після механічного подрібнення волосся проводили ультразвукову екстракцію метанолом, екстракт очищали методом твердофазної екстракції на основі діоксиду цирконію. Зразок обробленого волосся аналізували за допомогою методу РХ-МС/МС. Цільові аналіти було розділено та виявлено протягом 8 хв за допомогою колонки Xselect HSS T3. Градієнтне елювання проводили з використанням 5 мМ форміату амонію та ацетонітрилу [69].

Американські вчені розробили аналітичний метод виявлення 40 бензодіазепінів, зопіклону, залеплону та золпідему в крові й сечі за допомогою твердофазної екстракції і рідинної хроматографії з тандемною мас-спектрометрією. Зразки сечі гідролізували при 55 °С протягом 30 хв генетично модифікованим ферментом β-глюкуронідазою, що призвело до >95 % ефективності, виміряної за допомогою глюкуроніду оксазепаму. Інтенсивна підготовка зразків включала поєднання осмотичного лізису та осадження протеїну сумішшю метанолу/ацетонітрилу з подальшим заморожуванням і центрифугуванням [70].

Чилійські вчені для визначення залеплону в лікарських засобах та пероральній рідині розробили вольтамперометричну методику [71].

Огляд вітчизняної і зарубіжної літератури показав, що більшість публікацій присвячено фармацевтичному аналізу золпідему, зопіклону та залеплону, а також ідентифікації цих речовин і продуктів їх метаболізму в сечі й плазмі крові. З цією метою в основному використовують рідинну хроматографію з різним способом детектування. Мало праць присвячено виділенню речовин з біологічних об'єктів і дослідженню метаболітів. Деякі методики, виконані з використанням лише розчинів лікарських препаратів, рекомендують застосовувати у практиці хіміко-токсикологічних лабораторій без урахування особливостей біологічних об'єктів. Усе вищеведене робить актуальною розробку приватних та загальних методик ізолювання, очищення, ідентифікації і кількісного визначення зопіклону, золпідему та залеплону при дослідженні біологічних об'єктів, що містять як окремі речовини, так і їх суміші й метаболіти.

Окрім того, використання експресних і високого ступеня інформативності аналітичних та/або біоаналітичних методів аналізу лікарських засобів і/чи їх метаболітів у цьому випадку потребує наявності сучасного обладнання, висококваліфікованих фахівців, відпрацьованих методик досліджень, які постійно оновлюють. Тому розробка і валідація нових та вдосконалення вже існуючих аналітичних і біоаналітичних методик, розробка методів ізолювання з різних об'єктів на даний час є актуальними для проведення хіміко-токсикологічного аналізу та фармацевтичного контролю.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. The pathophysiology of insomnia / Levenson Jessica C., Kay Daniel B., Buysse Daniel J. // *Chest*. – 2015. – **147**, No. 4. – P. 1179–1192.
2. Morin, Charles M., et al. *Insomnia disorder // Nature reviews Disease primers*. – 2015. – **1**, No. 1. – P. 1–18.
3. Winkelmann, John W. *Insomnia disorder // New England Journal of Medicine*. – 2015. – **373**, No. 15. – P. 1437–1444.
4. Patel Dhaval, Steinberg Joel, Patel Pragnesh. *Insomnia in the elderly: a review // Journal of Clinical Sleep Medicine*. – 2018. – **14**, No. 6. – P. 1017–1024.
5. Хронічна інсомнія і методи її корекції (за результатами клінічного дослідження) / Т. С. Міщенко, Л. П. Забродіна, В. М. Міщенко, Ю. В. Бовт // *Міжнар. неврол. журн.* – 2021. – **17**, № 8. – С. 16–25.
6. Fang Hong, et al. *Depression in sleep disturbance: a review on a bidirectional relationship, mechanisms and treatment // Journal of cellular and molecular medicine*. – 2019. – **23**, No. 4. – P. 2324–2332.
7. Stranks Elizabeth K., Crowe Simon F. *The acute cognitive effects of zopiclone, zolpidem, zaleplon, and eszopiclone: a systematic review and meta-analysis // Journal of clinical and experimental neuropsychology*. – 2014. – **36**, No. 7. – P. 691–700.
8. Louzada Luciana L., et al. *Zopiclone to treat insomnia in older adults: a systematic review // European Neuropsychopharmacology*. – 2021. – No. 50. – P. 75–92.
9. Treves Nir, et al. *Z-drugs and risk for falls and fractures in older adults – a systematic review and meta-analysis // Age and ageing*. – 2018. – **47**, No. 2. – P. 201–208.
10. Kishi Taro, et al. *Z-drug for schizophrenia: a systematic review and meta-analysis // Psychiatry Research*. – 2017. – No. 256. – P. 365–370.
11. Richardson Kathryn, et al. *Adverse effects of Z-drugs for sleep disturbance in people living with dementia: a population-based cohort study // BMC medicine*. – 2020. – No. 18. – P. 1–15.

12. Schifano Fabrizio, et al. An insight into Z-drug abuse and dependence: an examination of reports to the European medicines agency database of suspected adverse drug reactions // *International Journal of Neuropsychopharmacology*. – 2019. – **22**, No. 4. – P. 270–277.
13. Hockenull Joanna, et al. Nonmedical use of benzodiazepines and Z-drugs in the UK // *British journal of clinical pharmacology*. – 2021. – **87**, No. 4. – P. 1676–1683.
14. Szmulewicz Alejandro, et al. The risk of overdose with concomitant use of Z-drugs and prescription opioids: a population-based cohort study // *American Journal of Psychiatry*. – 2021. – **178**, No. 7. – P. 643–650.
15. Abuse and dependence potential for the non-benzodiazepid hypnotics zolpidem and zopiclon: a review of case reports and epidemiological data / G. Hajak, W. E. Muller, D. Pittow, W. Kirch // *Additson*. – 2003. – **98**, No. 10. – P. 1371–1378.
16. Chauhan Varsha, Shukla S. K., Sharma G. P. Abuse of z-drugs and its challenges to the society // *International Journal of Medical Toxicology & Legal Medicine*. – 2020. – **23**, No. 1–2. – P. 191–205.
17. Moffat Anthony C., et al. Clarke's analysis of drugs and poisons. London: Pharmaceutical press, 2011.
18. European Pharmacopoeia. 11 edn. 2022. URL: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph-eur-11th-edition>
19. British Pharmacopoeia, 2021. URL: <https://www.pharmacopoeia.com>
20. Japan Pharmacopoeia 18th Edition, June 7, 2021. URL: <https://www.pmda.go.jp/english/rs-sb-std/standards-development/jp/0029.html>
21. Дослідження сильнодіючих і отруйних лікарських засобів : метод. рек. / [О. П. Замощець, Г. М. Брон, О. М. Барікова та ін.]. – К. : ДНДЕКЦ МВС України, 2021. – 74 с.
22. Державний реєстр лікарських засобів України [Електронний ресурс]. – Режим доступу : <http://www.drlz.com.ua>.
23. Hansen Stine Lund, et al. Distribution of zopiclone and main metabolites in hair following a single dose // *Forensic science international*. – 2020. – No. 306. – P. 110074.
24. Greenblatt David J., Roth Thomas. Zolpidem for insomnia // *Expert opinion on pharmacotherapy*. – 2012. – **13**, No. 6. – P. 879–893.
25. Salvà Pau, Costa Joan. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of zolpidem: therapeutic implications // *Clinical pharmacokinetics*. – 1995. – **29**, No. 3. – P. 142–153.
26. Chouinard Guy, Lefko-Singh Karen, Teboul Eric. Metabolism of anxiolytics and hypnotics: benzodiazepines, buspirone, zopiclone, and zolpidem // *Cellular and molecular neurobiology*. – 1999. – No. 19. – P. 533–552.
27. Madan A., et al. In vitro metabolism of indiplon and an assessment of its drug interaction potential // *Xenobiotica*. – 2007. – **37**, No. 7. – P. 736–752.
28. Dudhipala N. A review of novel formulation strategies to enhance oral delivery of zaleplon // *J Bioequiv Availab*. – 2016. – **8**, No. 5. – P. 211–213.
29. Tanoue Chiaki, et al. Variability of zaleplon 5-oxidase activity in mice and humans, and inhibition by raloxifene // *Drug Metabolism Letters*. – 2016. – **10**, No. 4. – P. 278–285.
30. Ebbens Marieke M., Verster Joris C. Clinical evaluation of zaleplon in the treatment of insomnia // *Nature and science of sleep*. – 2010. – P. 115–126.
31. Huq Fazlul. Molecular modelling analysis of the metabolism of zaleplon // *J. Pharmacol. Toxicol.* – 2006. – No. 1. – P. 328–336.
32. Stranks Elizabeth K., Crowe Simon F. The acute cognitive effects of zopiclone, zolpidem, zaleplon, and eszopiclone: a systematic review and meta-analysis // *Journal of clinical and experimental neuropsychology*. – 2014. – **36**, No. 7. – P. 691–700.
33. Edinoff Amber N., et al. Zolpidem: efficacy and side effects for insomnia // *Health psychology research*. – 2021. – No. 9. – P. 1.
34. Державна Фармакопея України / Державне підприємство “Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів”. – 2-ге вид. – Допов. 1. – Харків : Державне підприємство “Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів”, 2016. – 360 с.
35. United States Pharmacopoeia. Validation of compendial procedures. USP40–NF35. 2017.
36. Abdelrahman Maha M., et al. Quantitative determination of zopiclone and its impurity by four different spectrophotometric methods // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2015. – No. 137. – P. 617–624.
37. Blazheyevskiy M. Ye., Kryskiv L. S. Development of the kinetic-spectrophotometric method for quantitative determination of zopiclone in tablets by the perhydrolysis reaction // *Вісн. фармації*. – 2014. – No. 3. – С. 38–41.
38. Al-Attas Amirah S., et al. First derivative spectrophotometric determination of zopiclone and its degradation product, 2-amino-5-chloropyridine, in pharmaceutical formulations with preliminary tool in biological fluids for clinical evidence of zopiclone intake // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2017. – No. 181. – P. 148–152.
39. Fotesko K. A., et al. Development and validation of tandem UV-spectrophotometric/extraction-photometric procedure of zopiclone quantitative determination. 2015.
40. Kozak O. D., et al. Development of tandem procedure for zopiclone determination in sewages of pharmaceutical plants. 2016.
41. Загородній С. Л. Кількісне визначення зопікло-ну у таблетках Сонован методом спектрофотометрії / С. Л. Загородній, С. О. Васюк // *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. – 2014. – № 2. – С. 23–26.
42. Методи дослідження зопікло-ну в об'єктах судової експертизи / В. Коробчук, В. Яцюк, М. Михалків, І. Івануса // *Фармац. часоп.* – 2016. – № 1. – С. 59–65.
43. Rao L., Lakshmi C. R., Rambabuc C. RP-HPLC Method for the Estimation of Zopiclone in Tablet Dosage // *International Journal of Pharmaceutical Research*. – 2010. – **3**, No. 1. – P. 49–51.
44. Zagorodniy S. L., Vasyuk, S. O. Validation methods quantifying zopiclone tablets by HPLC // *Фармац. журн.* – 2019. – № 2. – С. 69–74.
45. Moussa Bahia A., et al. Indirect synchronous fluorescence spectroscopy and direct high-tioseparation of zopiclone and determination of chiral-switching eszopiclone: Evaluation of thermodynamic quantities of chromatographic separation // *Chirality*. – 2019. – **31**, No. 5. – P. 362–374.

46. Naguib Ibrahim A., et al. HPTLC method for quantitative determination of zopiclone and its impurity // *Journal of Chromatographic Science*. – 2015. – **53**, No. 8. – P. 1395–1399.
47. Abdel Razeq Sawsan A., Soliman Suzan M., Mohamed Amal S. Validated stability-indicating high-performance liquid chromatography and thin-layer chromatography methods for the determination of zopiclone in pharmaceutical formulation // *JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*. – 2018. – **31**, No. 4. – P. 297–308.
48. Saravanan V. Sampath, Revathi Ramadoss. Comparative UV-spectroscopy and HPLC methods for content analysis of zolpidem tartrate in solid dosage forms // *Turk J Pharm Sci*. – 2014. – **11**, No. 2. – P. 127–136.
49. Malesevic M., et al. Stress degradation studies on zolpidem tartrate using LC-DAD and LC-MS methods // *Acta Chromatographica*. – 2014. – **26**, No. 1. – P. 81–96.
50. Annapurna M. Mathrusri, et al. Development and Validated of Stability-Indicating RP-HPLC Method for the Analysis of Zolpidem Tartrate in Tablets // *Chemical Science*. – 2014. – **3**, No. 2. – P. 694–702.
51. Al Azzam Khaldun M., et al. Development and validation of a stability-indicating capillary electrophoresis method for the determination of zolpidem tartrate in tablet dosage form with positive confirmation using 2D- and 3D-DAD fingerprints // *Scientia Pharmaceutica*. – 2014. – **82**, No. 2. – P. 341–356.
52. Kokilambigai K. S., et al. Multivariate calibration technique for the spectrophotometric quantification of zaleplon in bulk drug and pharmaceutical formulations // *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. – 2017. – **9**, No. 6. – P. 824.
53. Про затвердження Переліків отруйних та сильнодіючих лікарських засобів : наказ МОЗ України від 17.08.2007 р. № 490, зареєстрований у Міністерстві юстиції України 03 вересня 2007 р. за № 1007/14274.
54. Про затвердження переліку наркотичних засобів, психотропних речовин і прекурсорів : Постанова Кабінету Міністрів України від 06 травня 2000 р. № 770.
55. Болотов В. В. Спектрофотометричне та екстракційно-фотометричне визначення зопіклону та продукту його лужного гідролізу – 2-аміно-5-хлорпіридину / В. В. Болотов, Л. Ю. Клименко // *Вісн. фармації*. – 2004. – № 4 (40). – С. 15–19.
56. Болотов В. В. Розробка кольорових реакцій на зопіклон / В. В. Болотов, Л. Ю. Клименко // *Журн. органічної та фармацевтичної хімії*. – 2005. – **3**, вип. 1 (9). – С. 65–69.
57. Болотов В. В. Застосування тонкошарової хроматографії в аналізі снодійних засобів зопіклону та дономілу / В. В. Болотов, Л. Ю. Клименко, І. М. Іванчук // *Вісн. фармації*. – 2005. – № 2 (42). – С. 7–12.
58. Болотов В. В. Високоєфективна рідинна хроматографія в аналізі зопіклону / В. В. Болотов, Л. Ю. Клименко // *Журн. органічної та фармацевтичної хімії*. – 2005. – **3**, вип. 4 (12). – С. 77–81.
59. Болотов В. В. Вивчення методів ізолювання зопіклону з об'єктів біологічного походження / В. В. Болотов, Л. Ю. Клименко // *Вісн. фармації*. – 2006. – № 3 (47). – С. 26–30.
60. Nilsson Gunnel H., et al. Quantitative analysis of zopiclone, N-desmethylzopiclone, zopiclone N-oxide and 2-Amino-5-chloropyridine in urine using LC-MS-MS // *Journal of Analytical Toxicology*. – 2014. – **38**, No. 6. – P. 327–334.
61. Hansen Stine Lund, et al. Distribution of zopiclone and main metabolites in hair following a single dose // *Forensic science international*. – 2020. – No. 306. – P. 110074.
62. Irving Rachel C., Dickson Stuart J. The detection of sedatives in hair and nail samples using tandem LC-MS-MS // *Forensic Science International*. – 2007. – **166**, No. 1. – P. 58–67.
63. Strano Rossi Sabina, et al. UHPLC-MS/MS and UHPLC-HRMS identification of zolpidem and zopiclone main urinary metabolites and method development for their toxicological determination // *Drug Testing and Analysis*. – 2014. – **6**, No. 3. – P. 226–233.
64. Yaripour Saeid, et al. Quantitation of zolpidem in biological fluids by electro-driven microextraction combined with HPLC-UV analysis // *EXCLI journal*. – 2018. – No. 17. – P. 349.
65. Kenan Nurdan, Mercan Selda, Acikkol Munever. Development and validation of a practical analytical method for Zolpidem as a drug facilitated crime tool // *Journal of Chemical Metrology*. – 2019. – **13**, No. 2. – P. 68–74.
66. Jeong Yu-Dong, et al. Rapid determination of benzodiazepines, zolpidem and their metabolites in urine using direct injection liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *Forensic science international*. – 2015. – No. 257. – P. 84–92.
67. Byeon Ji-Yeong, et al. Determination of zolpidem in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry for clinical application // *Journal of Chromatography B*. – 2015. – No. 986. – P. 129–134.
68. Piotrowski Przemysław, et al. Simultaneous analysis of zolpidem and its metabolite in whole blood and oral fluid samples by SPE-LC/MS for clinical and forensic purposes // *Advances in Medical Sciences*. – 2015. – **60**, No. 1. – P. 167–172.
69. Kim Seon Yeong, et al. LC-MS/MS method for determining picogram-level of zolpidem and its main metabolites in hair using a zirconia-based sorbent // *Talanta*. – 2021. – No. 228. – P. 122041.
70. Sofalvi Szabolcs, et al. Development and validation of an LC-MS-MS method for the detection of 40 benzodiazepines and three Z-drugs in blood and urine by solid-phase extraction // *Journal of Analytical Toxicology*. – 2020. – **44**, No. 7. – P. 708–717.
71. Aguilera Scarlett, et al. A simple electroanalytical methodology for determination of zaleplon by adsorptive stripping voltammetry in oral fluids // *Microchemical Journal*. – 2023. – No. 193. – P. 109256.

REFERENCES

1. Levenson, J.C., Kay, D.B., & Buysse, D.J. (2015). The pathophysiology of insomnia. *Chest*, 147(4), 1179-1192.
2. Morin, C.M., Drake, C.L., Harvey, A.G., Krystal, A.D., Manber, R., Riemann, D., & Spiegelhalter, K. (2015). Insomnia disorder. *Nature reviews Disease primers*, 1(1), 1-18.
3. Winkelman, J. W. (2015). Insomnia disorder. *New England Journal of Medicine*, 373(15), 1437-1444.
4. Patel, D., Steinberg, J., & Patel, P. (2018). Insomnia in the elderly: a review. *Journal of Clinical Sleep Medicine*, 14(6), 1017-1024.
5. Mishchenko, T.S., Zabrodina, L.P., Mishchenko, V.N., & Bovt, Y.V. (2021). Chronic insomnia and methods of its correction (according to the results of a clinical study). *International neurological journal*, 17(8), 16-25.
6. Fang, H., Tu, S., Sheng, J., & Shao, A. (2019). Depression in sleep disturbance: a review on a bidirectional relationship, mechanisms and treatment. *Journal of cellular and molecular medicine*, 23(4), 2324-2332.
7. Stranks, E.K., & Crowe, S.F. (2014). The acute cognitive effects of zopiclone, zolpidem, zaleplon, and eszopiclone: a systematic review and meta-analysis. *Journal of clinical and experimental neuropsychology*, 36(7), 691-700.
8. Louzada, L. L., Machado, F. V., Nóbrega, O. T., & Camargos, E. F. (2021). Zopiclone to treat insomnia in older adults: a systematic review. *European Neuropsychopharmacology*, 50, 75-92.
9. Treves, N., Perlman, A., Kolenberg Geron, L., Asaly, A., & Matok, I. (2018). Z-drugs and risk for falls and fractures in older adults – a systematic review and meta-analysis. *Age and ageing*, 47(2), 201-208.
10. Kishi, T., Inada, K., Matsui, Y., & Iwata, N. (2017). Z-drug for schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. *Psychiatry Research*, 256, 365-370.
11. Richardson, K., Loke, Y.K., Fox, C., Maidment, I., Howard, R., Steel, N., ... & Savva, G.M. (2020). Adverse effects of Z-drugs for sleep disturbance in people living with dementia: a population-based cohort study. *BMC medicine*, 18, 1-15.
12. Schifano, F., Chiappini, S., Corkery, J.M., & Guirguis, A. (2019). An insight into Z-drug abuse and dependence: an examination of reports to the European medicines agency database of suspected adverse drug reactions. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 22(4), 270-277.
13. Hockenfull, J., Black, J.C., Haynes, C.M., Rockhill, K., Dargan, P.I., Dart, R.C., & Wood, D.M. (2021). Nonmedical use of benzodiazepines and Z-drugs in the UK. *British journal of clinical pharmacology*, 87(4), 1676-1683.
14. Szmulewicz, A., Bateman, B.T., Levin, R., & Huybrechts, K.F. (2021). The risk of overdose with concomitant use of Z-drugs and prescription opioids: a population-based cohort study. *American Journal of Psychiatry*, 178(7), 643-650.
15. Hajak, G., Müller, W.E., Wittchen, H.U., Pittrow, D., & Kirch, W. (2003). Abuse and dependence potential for the non-benzodiazepine hypnotics zolpidem and zopiclone: a review of case reports and epidemiological data. *Addiction (Abingdon, England)*, 98(10), 1371-1378.
16. Chauhan, V., Shukla, S.K., & Sharma, G.P. (2020). Abuse of z-drugs and its challenges to the society. *International Journal of Medical Toxicology & Legal Medicine*, 23(1and2), 191-205.
17. Moffat, A.C., Osselton, M.D., Widdop, B., & Watts, J. (2011). *Clarke's analysis of drugs and poisons* (Vol. 3, p. 533). London: Pharmaceutical press.
18. European Pharmacopoeia. 11 edn. (2022). URL: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph-eur-11th-edition>.
19. British Pharmacopoeia (2021). URL: <https://www.pharmacopoeia.com>.
20. Japan Pharmacopoeia 18th Edition, (June 7, 2021). URL: <https://www.pmda.go.jp/english/rs-sb-std/standards-development/jp/0029.html>.
21. Zamoshets O.P., Bron H.M., Barikova O.M., Zeleny P.O., Korobchuk V.M., Kosmina, N.M. (2021) Research of potent and poisonous drugs: methodological recommendations, Kyiv, 74 p.
22. State Register of Medicinal Products of Ukraine. URL: <http://www.drllz.com.ua>.
23. Hansen, S.L., Johansen, S.S., Nielsen, M.K.K., Nilsson, G., & Kronstrand, R. (2020). Distribution of zopiclone and main metabolites in hair following a single dose. *Forensic science international*, 306, 110074.
24. Greenblatt, D.J., & Roth, T. (2012). Zolpidem for insomnia. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 13(6), 879-893.
25. Salvà, P., & Costa, J. (1995). Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of zolpidem: therapeutic implications. *Clinical pharmacokinetics*, 29(3), 142-153.
26. Chouinard, G., Lefko-Singh, K., & Teboul, E. (1999). Metabolism of anxiolytics and hypnotics: benzodiazepines, buspirone, zopiclone, and zolpidem. *Cellular and molecular neurobiology*, 19, 533-552.
27. Madan, A., Fisher, A., Jin, L., Chapman, D., & Bozigian, H.P. (2007). In vitro metabolism of indiplon and an assessment of its drug interaction potential. *Xenobiotica*, 37(7), 736-752.
28. Dudhipala, N. (2016). A review of novel formulation strategies to enhance oral delivery of zaleplon. *J Bioequiv Availab*, 8(5), 211-213.
29. Tanoue, C., Sugihara, K., Tayama, Y., Uramaru, N., Watanabe, Y., Ohta, S., & Kitamura, S. (2016). Variability of zaleplon 5-oxidase activity in mice and humans, and inhibition by raloxifene. *Drug Metabolism Letters*, 10(4), 278-285.
30. Ebbens, M.M., & Verster, J.C. (2010). Clinical evaluation of zaleplon in the treatment of insomnia. *Nature and science of sleep*, 115-126.
31. Huq, F. (2006). Molecular modelling analysis of the metabolism of zaleplon. *J. Pharmacol. Toxicol*, 1, 328-336.
32. Stranks, E.K., & Crowe, S.F. (2014). The acute cognitive effects of zopiclone, zolpidem, zaleplon, and eszopiclone: a systematic review and meta-analysis. *Journal of clinical and experimental neuropsychology*, 36(7), 691-700.
33. Edinoff, A.N., Wu, N., Ghaffar, Y.T., Prejean, R., Gremillion, R., Cogburn, M., ... & Kaye, A.D. (2021). Zolpidem: efficacy and side effects for insomnia. *Health psychology research*, 9(1).
34. State Pharmacopoeia of Ukraine (2016) State enterprise "Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center for the Quality of Medicinal Products". 2nd edition Supplement 1, 360 c.

35. United States Pharmacopoeia (2017). Validation of compendial procedures. USP40–NF35.
36. Abdelrahman, M.M., Naguib, I.A., El Ghobashy, M.R., & Ali, N.A. (2015). Quantitative determination of zopiclone and its impurity by four different spectrophotometric methods. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 137, 617-624.
37. Blazheyevskiy, M.Y., & Kryskiw, L.S. (2014). Development of the kinetic-spectrophotometric method for quantitative determination of zopiclone in tablets by the perhydrolysis reaction. *Вісник фармації*, (3), 38-41.
38. Al-Attas, A.S., Nasr, J.J., Shalan, S., & Belal, F. (2017). First derivative spectrofluorimetric determination of zopiclone and its degradation product, 2-amino-5-chloropyridine, in pharmaceutical formulations with preliminary tool in biological fluids for clinical evidence of zopiclone intake. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 181, 148-152.
39. Fotesko, K.A., Novitsky, A.I., Klimentko, L.Y., & Mykytenko, O.Y. (2015). Development and validation of tandem UV-spectrophotometric/extraction-photometric procedure of zopiclone quantitative determination.
40. Kozak, O.D., Sergeieva, M.S., Kostina, T.A., & Klimentko, L.Y. (2016). Development of tandem procedure for zopiclone determination in sewages of pharmaceutical plants.
41. Zagorodniy, S.L., Vasyuk, S.O. (2014). Quantitative determination of zopiclone tablets "Sonovan" by spectrophotometry. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*, (2), 23-26.
42. Korobchuk, V.M., Yatsyuk, V.M., Mykhalkiv, M.M., & Ivanusa, I.B. (2016). Methods of Zopiclone Investigation in the Object of Forensic Examination. *Pharmaceutical Journal*, (1), 59-65.
43. Rao, L., Lakshmi, C. R., & Rambabuc, C. (2010). RP-HPLC Method for the Estimation of Zopiclone in Tablet Dosage. *International Journal of Pharmaceutical Research*, 3(1), 49-51.
44. Zagorodniy, S.L., & Vasyuk, S.O. (2019). Validation methods quantifying zopiclone tablets by HPLC. *Farmatsevtichnyi Zhurnal*, (2), 69-74.
45. Moussa, B.A., Youssef, N.F., Elkady, E.F., & Mohamed, M.F. (2019). Indirect synchronous fluorescence spectroscopy and direct high-performance thin-layer chromatographic methods for enantioseparation of zopiclone and determination of chiral-switching eszopiclone: Evaluation of thermodynamic quantities of chromatographic separation. *Chirality*, 31(5), 362-374.
46. Naguib, I.A., Abdelrahman, M.M., El Ghobashy, M.R., & Ali, N.A. (2015). HPTLC method for quantitative determination of zopiclone and its impurity. *Journal of Chromatographic Science*, 53(8), 1395-1399.
47. Abdel Razeq, S.A., Soliman, S.M., & Mohamed, A.S. (2018). Validated stability-indicating high-performance liquid chromatography and thin-layer chromatography methods for the determination of zopiclone in pharmaceutical formulation. *JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 31(4), 297-308.
48. Saravanan, V.S., & Revathi, R. (2014). Comparative UV-spectroscopy and HPLC methods for content analysis of zolpidem tartrate in solid dosage forms. *Turk J Pharm Sci*, 11(2), 127-136.
49. Malesevic, M., Zivanovic, L., Protic, A., Radisic, M., Lausevic, M., Jovic, Z., & Zecevic, M. (2014). Stress degradation studies on zolpidem tartrate using LC-DAD and LC-MS methods. *Acta Chromatographica*, 26(1), 81-96.
50. Annapurna, M.M., Bhargavi, S., Pavani, S., & Venkatesh, B. (2014). Development and Validated of Stability-Indicating RP-HPLC Method for the Analysis of Zolpidem Tartrate in Tablets. *Chemical Science*, 3(2), 694-702.
51. AlAzzam, K.M., Yit, L.K., Saad, B., & Shaibah, H. (2014). Development and validation of a stability-indicating capillary electrophoresis method for the determination of zolpidem tartrate in tablet dosage form with positive confirmation using 2D-and 3D-DAD fingerprints. *Scientia Pharmaceutica*, 82(2), 341-356.
52. Kokilambigai, K.S., Seetharaman, R., Kavitha, J., Sowndaravel, P., & Lakshmi, K.S. (2017). Multivariate calibration technique for the spectrophotometric quantification of zaleplon in bulk drug and pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9(6), 824.
53. Order of the Ministry of Health of Ukraine No. 490 dated August 17, 2007 "On Approval of the Lists of Poisonous and Potent Medicines", registered in the Ministry of Justice of Ukraine on September 3, 2007 under No. 1008/14275.
54. Resolution of the Cabinet of Ministers of Ukraine dated May 6, 2000 No. 770 "On approval of the List of narcotic drugs, psychotropic substances and precursors approved by the resolution of the Cabinet of Ministers of Ukraine".
55. Bolotov V.V., Klimentko L.Yu. (2004) Spectrophotometric and extraction-photometric determination of zopiclone and 2-amino-5-chloropyridine – its alkaline hydrolysis product. *News of pharmacy*, 40(4), 15-19.
56. Bolotov V.V., Klimentko L.Yu. (2005) Development of color reactions for zopiclone. *Journal of organic and pharmaceutical chemistry*, 9(1), 65-69.
57. Bolotov V.V., Klimentko L.Yu., Ivanchuk I.M. (2005) Application of thin-layer chromatography in analysis of hypnotic agents of zopiclone and donormil. *News of pharmacy*, 42(2), 7-12.
58. Bolotov V.V., Klimentko L.Yu. (2005) High-performance liquid chromatography in analysis of zopiclone. *Journal of organic and pharmaceutical chemistry*, 12(4), 77-81.
59. Bolotov V.V., Klimentko L.Yu. (2006) Study of isolating methods for zopiclone from objects of biological origin. *News of pharmacy*, 47(3), 26-30.
60. Nilsson, G. H., Kugelberg, F. C., Ahlner, J., & Kronstrand, R. (2014). Quantitative analysis of zopiclone, N-desmethylzopiclone, zopiclone N-oxide and 2-Amino-5-chloropyridine in urine using LC–MS–MS. *Journal of Analytical Toxicology*, 38(6), 327-334.
61. Hansen, S.L., Johansen, S.S., Nielsen, M.K.K., Nilsson, G., & Kronstrand, R. (2020). Distribution of zopiclone and main metabolites in hair following a single dose. *Forensic science international*, 306, 110074.
62. Irving, R.C., & Dickson, S.J. (2007). The detection of sedatives in hair and nail samples using tandem LC–MS–MS. *Forensic Science International*, 166(1), 58-67.
63. Strano Rossi, S., Anzillotti, L., Castrignanò, E., Frison, G., Zancanaro, F., & Chiarotti, M. (2014). UHPLC-MS/MS and UHPLC-HRMS identification of zolpidem and zopiclone main urinary metabolites and method development for their toxicological determination. *Drug Testing and Analysis*, 6(3), 226-233.

64. Yaripour, S., Mohammadi, A., Esfanjani, I., Walker, R.B., & Nojavan, S. (2018). Quantitation of zolpidem in biological fluids by electro-driven microextraction combined with HPLC-UV analysis. *EXCLI journal*, 17, 349.
65. Kenan, N., Mercan, S., & Acikkol, M. (2019). Development and validation of a practical analytical method for Zolpidem as a drug facilitated crime tool. *Journal of Chemical Metrology*, 13(2), 68-74.
66. Jeong, Y.D., Kim, M.K., Suh, S.I., In, M.K., Kim, J.Y., & Paeng, K.J. (2015). Rapid determination of benzodiazepines, zolpidem and their metabolites in urine using direct injection liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Forensic science international*, 257, 84-92.
67. Byeon, J.Y., Lee, H.I., Lee, Y.J., Lee, J.E., Kim, S.H., Kim, Y.H., ... & Lee, S.Y. (2015). Determination of zolpidem in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry for clinical application. *Journal of Chromatography B*, 986, 129-134.
68. Piotrowski, P., Bocian, S., Śliwka, K., & Buszewski, B. (2015). Simultaneous analysis of zolpidem and its metabolite in whole blood and oral fluid samples by SPE-LC/MS for clinical and forensic purposes. *Advances in Medical Sciences*, 60(1), 167-172.
69. Kim, S.Y., Kwon, N.H., Cheong, J.C., & Kim, J.Y. (2021). LC–MS/MS method for determining picogram-level of zolpidem and its main metabolites in hair using a zirconia-based sorbent. *Talanta*, 228, 122041.
70. Sofalvi, S., Lavins, E.S., Kaspar, C.K., Michel, H.M., Mitchell-Mata, C.L., Huestis, M.A., & Apollonio, L.G. (2020). Development and validation of an LC–MS-MS method for the detection of 40 benzodiazepines and three Z-drugs in blood and urine by solid-phase extraction. *Journal of Analytical Toxicology*, 44(7), 708-717.
71. Aguilera, S., Flores, E., Segura, R., Barrientos, H., Márquez, P., García, C., ... & Aguirre, M. (2023). A simple electroanalytical methodology for determination of zaleplon by adsorptive stripping voltammetry in oral fluids. *Microchemical Journal*, 193, 109256.

Отримано 16.05.2024

Адреса для листування: М. М. Михалків, Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, майдан Волі, 1, Тернопіль, 46001, Україна, e-mail: mikhalkiv@tdmu.edu.ua.

V. M. Korobchuk¹, H.Y. Zahrychuk², M. M. Mykhalkiv², V. M. Yatsyuk¹, I. B. Ivanusa²
¹TERNOPIL RESEARCH EXPERT FORENSIC CENTER OF THE MINISTRY OF INTERNAL AFFAIRS OF UKRAINE
²I. HORBACHEVSKY TERNOPIL NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

USAGE OF ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL METHODS FOR DETERMINATION AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF ZOPICLONE, ZOLPIDEM, ZALEPLON IN VARIOUS OBJECTS (LITERATURE REVIEW)

Summary

Introduction. *Insomnia, or sleeplessness, is a common sleep disorder that affects a significant number of people around the world today. This condition is characterized by difficulty falling asleep, frequent awakenings during the night, or very early awakenings after which the person is unable to fall back asleep. Insomnia can significantly affect the quality of life, physical and mental health. Zopiclone, zolpidem and zaleplon are used in medical practice for the treatment of insomnia widely and effectively both abroad and in Ukraine. In addition, drugs of this group can be used for schizophrenia and dementia treatment. According to the pharmacopoeial monographs of different countries, IR- and UV-spectrophotometry methods are used for the identification of zopiclone, zolpidem and zaleplon. Sometimes, liquid chromatography is used as well. The method of non-aqueous acid-base titration with potentiometric fixation of the equivalence point is used for assay of zopiclone, zolpidem, while for zaleplon is carried out the method of liquid chromatography. A review of scientific sources showed that liquid chromatography (such as HPLC, UHPLC, LC-MS, LC-MS/MS) are often used for these substances analysis in medicinal products. There are several publications about quantitative determination of zopiclone by the extraction-photometric method, in which methyl orange is used as a reagent and chloroform as an extragent. Hair, blood and urine are biological objects in toxicological analysis for investigation of (±)-zopiclone, zaleplon and zolpidem and their metabolites. The solid-phase extraction method is used as purification method from impurities, and the LC-MS/MS method is often used for identification and quantification.*

The aim of the study – to summarize information about the existing methods of detection and quantification of zopiclone, zolpidem, and zaleplon in various objects.

Conclusions. *The analysis of literary sources showed that the development and validation of new, improved analytical and bioanalytical methods, the development of isolation methods from various objects are currently relevant for chemical-toxicological analysis and pharmaceutical control.*

KEY WORDS: physical and chemical methods of analysis; expertise; zopiclone; zolpidem; zaleplon; liquid chromatography; extraction.