



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **91313**

(13) **U**

(51) МПК

**G01N 33/48** (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2014 01601**

(22) Дата подання заявки: **18.02.2014**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **25.06.2014**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **25.06.2014, Бюл.№ 12**

(72) Винахідник(и):

**Савченко Максим Анатолійович (UA),  
Петюнін Геннадій Павлович (UA),  
Чубенко Олександр Владкович (UA)**

(73) Власник(и):

**ХАРКІВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ  
ПІСЛЯДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ,  
вул. Корчагінців, 58, м. Харків, 61176 (UA)**

## (54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ ГІДАЗЕПАМУ У БІОЛОГІЧНОМУ МАТЕРІАЛІ ЛЮДИНИ

### (57) Реферат:

Спосіб виявлення гідазепаму у біологічному матеріалі людини здійснюють шляхом піддавання відповідного біологічного матеріалу кислотному гідролізу з подальшою екстракцією та наступним дослідженням методом хроматографії в тонких шарах сорбенту. Крім відомих застосовують нову систему розчинників для виявлення амінобензофенонів, яка складається з бензолу, бутанолу та оцтової кислоти у певних співвідношеннях, в яких паралельно хроматографують екстракт, який досліджують, та речовини стандарти метаболітів гідазепаму та 1,4-бензодіазепінів. По закінченні хроматографування пластинку висушують до повного видалення запаху розчинників та одну зону пластинки проявляють реактивом Маркі, а другу реактивом Манделіна. Поява червоної плями після проявлення реактивом Маркі та помаранчевої після проявлення реактивом Манделіна, а також збігання значень  $R_f$  свідка амінокарбоксибромбензофенону та досліджуваного екстракту свідчить про вживання гідазепаму.

**UA 91313 U**



Корисна модель належить до медицини, зокрема до визначення лікарських засобів у біологічному матеріалі.

Гідазепам є вітчизняним препаратом, розробленим Фізико-хімічним інститутом ім. А.В. Богатського НАН України, Одеського університету ім. І.І. Мечникова та НДІ фармакології АМН Росії [Жук О.В., Карпинчик В.А. Гідазепам - новый отечественный дневной транквилизатор / Провизор, 2000. - N17. - С. 33-35] Діючою речовиною препарату є 1-(гідразінокарбоніл)метил-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бензодіазепін-2-он, який являє собою похідне 1,4-бензодіазепіну. Разом із низкою значних фармакологічних переваг гідазепаму, йому притаманні характерні для похідних 1,4-бензодіазепіну побічні властивості (Гідазепам. [Андронати С.А., Воронина Т.А., Головенко Н.Я. и др.; отв. ред. Андронати С.А.; АН Украины. Физико-хим. ин-т им. А.В. Богатского. - К.: Наук, думка, 1992. - С. 15-16, 21, 50-52, 70-75, 63-75, 120-131; Инструкция для медичного застосування препарату ГІДАЗЕПАМ 1С), які обумовлюють інтерес до цього препарату з боку судово-медичної та аналітичної токсикології.

Відомо (Савченко М.А., Петюнін Г.П. Дослідження поведінки гідазепаму та його метаболітів в умовах кислотного гідролізу // Буковинський медичний вісник. - 2013, т. XVII, № 3 (67), ч. 1, с. 143-148.), що при гідролізі як гідазепаму, так і його метаболітів, утворюються триамінобензофенони: амінобромбензофенон (АББ), метиламінобромбензофенон (МББ) та амінокарбоксибромбензофенон (АКББ), причому останній амінобензофенон є характеристичним для аналітичної діагностики гідазепаму. Виявилось, що відома схема тонкошарового хроматографічного скринінгу на похідні 1,4-бензодіазепіну по амінобензофенонам, є малоефективною для діагностики вживання гідазепаму (ТСХ-скринінг токсикологически значимых соединений, изолируемых экстракцией и сорбцией: учебн. Пособие - 060108/ Г. В. Раменская [и др.]; А.П. Арзамасцева. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. - 240 с).

Відомим є спосіб виявлення 1,4-бензодіазепінів в біологічному матеріалі, в основу якого покладено застосування кислотного гідролізу для отримання метаболітів 1,4-бензодіазепінів з наступним виявленням останніх методом хроматографії в тонких шарах сорбенту з використанням як візуалізатора реактиву Браттона-Маршала (Recommended Methods for the Detection and Assay of Benzodiazepines in Biological Specimens Manual for Use by National Laboratories: ST/NAR/27-N.Y.: United Nations, 1997- С 78. Thin-Layer Chromatographic Rf Values of Toxicologically Relevant Substances on Standardized Sysmtes; 2nd Ed. Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) Copyright © 1992 VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim p-306-308). Для виявлення гідазепаму методом тонкошарової хроматографії описано використання малоспецифічного реактиву Драгендорфа по Мунье (Качук Л.І. Методи виявлення лікарського засобу гідазепаму - похідного 1,4-бензодіазепіну/ Л.І.Ткачук, О.Д. Туркевич, М.М. Кучер//Фармація України, Погляд у майбутнє: матер 7 Нац. З'їзду фармацевтів України (Харків, 15-17 верес. 2010.): у 2-х т. -Х.:НФаУ, 2010.- Т.1 - с. 80) (див. табл. 1).

Недоліком цих способів є те, що запропоновані реактиви проявники показують малу селективність відносно гідазепаму та його метаболітів (див. табл. 1).

Таблиця 1

## Забарвлення з деякими реактивами

1,4-бензодіазепіни та їх метаболіти	Забарвлення з реактивами	
	Драгендорфа по Мунье	Браттона-Маршала
нозепам	помаранчеве	-
діазепам	помаранчеве	-
нітразепам	помаранчеве	-
клоназепам	помаранчеве	-
гідазепам	помаранчеве	-
N <sup>1</sup> -дезалкілгідазепам	помаранчеве	-
карбоксиметил-гідазепам	помаранчеве	-
АКББ	блідо-жовте	малинове
АКББ-Ме	блідо-жовте	малинове
АХБ	блідо-жовте	малинове
МХБ	блідо-жовте	малинове
АБХБ	блідо-жовте	малинове
АНБ	блідо-жовте	малинове
АНХБ	блідо-жовте	малинове

Хроматографічна рухливість амінобромбензофенону (АББ), метиламінобромбензофенону (МББ) та амінокарбоксібромбензофенону (АКББ), визначена паралельно з відомими метаболітами інших 1,4-бензодіазепінів показало значну близькість їх хроматографічної рухливості, або як у випадку із АКББ, її відсутність (див. табл. 2).

Таблица 2

Значення  $R_f$  амінобензофенонів в різних системах розчинників

система	Амінобензофенон								
	АКББ	АКББ-Ме	АББ	МББ	АХБ	МХБ	АБХБ	АНБ	АНХБ
1	0	15	50	75	51	75	62	24	24
2	0	14	45	67	45	67	57	24	25
3	91	78	90	92	90	92	91	89	89
4	0	26	35	79	35	80	62	9	9
5	2	95	93	94	93	94	93	90	91
6	0	88	92	94	92	93	93	87	88
7	20	93	94	95	94	95	95	93	93
8	0	88	93	93	93	94	93	91	91
9	0	93	93	94	93	94	93	92	92
10	2	89	91	92	91	92	92	89	89
11	93	79	95	95	95	95	95	95	95
12	74	85	94	94	94	94	94	94	94
13	75	86	85	85	86	90	85	74	75
14	92	95	94	95	94	95	95	94	94
15	0	7	14	38	14	38	19	6	6
16	0	0	3	0	3	10	4	0	0
17	54	85	80	86	80	86	78	69	70
18	4	90	85	90	85	90	85	83	83
19	2	89	86	89	86	89	86	80	80
20	0	94	93	95	93	95	93	92	92

Системи: 1. бензол; 2. толуол; 3. метанол:25 %аміак (100:1,5); 4. циклогексан:толуол:діетиламін (75:15:10); 5. хлороформ:метанол (9:1); 6. хлороформ:ацетон (8:2); 7. етилацетат:метанол:25 %аміак (85:10:5); 8. етилацетат; 9. ацетон; 10. хлороформ:метанол (9:1); 11. метанол; 12. метанол:н-бутанол (60:40) система містить 0,1 М NaBr; 13. хлороформ:циклогексан:оцтова кислота (4:4:2); 14. хлороформ:метанол:пропіонова кислота (72:18:10); 15. хлороформ:чотирихлористий вуглець (1:1); 16. Гексан:хлороформ (3: 1); 17. бензол:етанол:діетиламін (9:1:1); 18. Бензол:і-пропанол:25 %аміак (17:3:0,2); 19. Тoluол:ацетон:етанол:25 %аміак (9:9:1,5:0,5); 20. Діоксан:хлороформ:ацетон:25 %аміак (19:18:2:1).

АХБ - амінобензофенон; МХБ - метиламінобензофенон; АНБ - амінітробензофенон; АНХБ - амінітрохлорбензофенон, АКББ-Ме - метиловий ефір амінокарбоксібромбензофенону.

Найбільш близький та вибраний як найближчий аналог є спосіб ідентифікації 1,4-бензодіазепінів методом хроматографії в тонких шарах сорбенту [Schlitz H (1988) Benzodiazepines II-a handbook. Springer, Berlin Heidelberg NewYork London Paris Tokyo P.47-48] з використанням кислотного гідролізу та наступним виявленням метаболітів 1,4-бензодіазепінів, і в якому не наведені дані про гідазепам та його метаболіти.

Недоліки способу пов'язані з відсутністю нативного гідазепаму. Встановлено, що в біологічному матеріалі після вживання гідазепаму присутні лише метаболіти (Колыванов Г.Б. Биотрансформация и фармакокинетика гидазепам у животных разных видов и человека / Г.Б. Колыванов, В.П. Жердев // Эксперим. и клин. фармакол. - 1993. - Т. 56, № 3. - С. 48-50)/

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалення способу виявлення гідазепаму в біологічному матеріалі людини, в якому за рахунок введення нових систем розчинників, досягається низька кореляція між хроматографічною рухливістю метаболітів гідазепаму відносно метаболітів інших бензодіазепінів та їх візуалізація специфічними проявниками.

Поставлена задача вирішується в способі виявлення гідазепаму в біологічному матеріалі людини, який здійснюють шляхом піддавання відповідного біологічного матеріалу кислотному

гідролізу з подальшою екстракцією та наступним дослідженням методом хроматографії в тонких шарах сорбенту, згідно з корисною моделлю, крім відомих застосовують нову систему розчинників для виявлення амінобензофенонів, яка складається з бензолу, бутанолу та оцтової кислоти у певних співвідношеннях, в яких паралельно хроматографують екстракт, який досліджують, та речовини стандарти метаболітів гідазепаму та 1,4-бензодізепаїнів, по закінченні хроматографування пластинку висушують до повного видалення запаху розчинників та одну зону пластинки проявляють реактивом Маркі, а другу реактивом Манделіна, поява червоної плями після проявлення реактивом Маркі та помаранчевої після проявлення реактивом Манделіна, а також збігання значень  $R_f$  свідка АКББ та досліджуваного екстракту свідчить про вживання гідазепаму.

Амінобензофенони гідазепаму отримували шляхом гідролізу субстанції гідазепаму (Савченко М.А., Петюнін Г.П. Дослідження поведінки гідазепаму та його метаболітів в умовах кислотного гідролізу // Буковинський медичний вісник. - 2013, т. XVII, № 3(67), ч. 1, с. 143-148.). Отриману суміш амінобензофенонів розділяли методом тонкошарової хроматографії на препаративних хроматографічних пластинках із закріпленим гіпсом силікагелем в системі - бензол та бензол:етанол:діетиламін (9:1:1). Плями розділених амінобензофенонів змивали з силікагелю етанолом та упарювали. Ідентифікацію плям проводили методом хроматомаспектрометрії на хроматомаспектрометрі Agilent 6890N/5973N/FID виробництва Agilent Technologies. Метиловий ефір АКББ отримували шляхом взаємодії АКББ із розчином діазометану в етилацетаті впродовж 10 хв при кімнатній температурі. Аналогічно отримували та виділяли інші амінобензофенони (АХБ, МХБ, АНБ та АНХБ), вихідними речовинами для яких слугували відповідно нозепам, діазепам, нітазепам та клоназепам. З отриманих амінобензофенонів готували розчини в хлороформі із концентрацією кожної речовини по 2 мг/мл, на хроматографічні пластинки наносили по 2 мкл отриманих розчинів. Довжина хроматографічного шляху становила 8 см.

Використовували пластинки Sorbfil (ТУ26-11-17-89), тип ПТСХ-П-А, розмір зерен силікагелю 5-17 мкм. При використанні систем 3, 4, 5 та 9, хроматографічні пластинки попередньо імпрегнували 0,1 М розчином КОН в метанолі, та висушували при 80 °С. Розчинники для приготування рухомих фаз для ТШХ використовували кваліфікації "ч" та "ч.д.а.", системи розчинників 11 та 12 використовували без насичення камери. Розчин діазометану отримували з нітрозометилсечовини взаємодією останньої з 50 % розчином гідроксиду натрію та поглинанням утвореного діазометану етилацетатом.

Дослідження хроматографічних характеристик АКББ, його метилового ефіру та інших амінобензофенонів в десяти хроматографічних системах які використовуються при систематичному токсикологічному аналізі 1-14, чотирьох хроматографічних систем розчинників, які використовуються в вітчизняній практиці (17-20), двох (15 та 16), які використовувались при дослідженні амінобензофенонів (Гідазепам. [Андронати С.А., Воронина Т.А., Головенко Н.Я. и др.; отв. ред. Андронати С.А.; АН Украины. Физико-хим. ин-т им А.В. Богатского. - К.: Наук. думка, 1992. - С. 15-16, 21, 50-52, 70-75, 63-75, 120-131; Головенко Н.Я., Зиньковский В.Г., Андронати С.А. Масс-спектрометрический анализ производных 2-аминобензофенонов и их метаболитов // Биоорганическая химия. - 1986. - № 6. - С. 8891.]). Властивості АКББ, в хроматографічних системах 13 та 14, показали повну непридатність цих ТШХ систем (див. таблиця 2). В більшості з них (системи 4, 5, 6, 8, 9, 10, 15, 16, 18, 19, та 20) АКББ також не хроматографується, а в тих, де він проявляє рухливість (системи 3, 7, 11, 13, 14 та 17), не відбувається хоча б задовільного розділення інших амінобензофенонів. Виключення становить система 4, в якій достатньо добре розділяються амінобензофенони, та АКББ у вигляді метилового ефіру. Враховуючи хроматографічну рухливість АКББ і інших амінобензофенонів (обумовлену значною різницею в полярності цих речовин) в різних розчинниках та їх сумішах, за базову ТШХ систему було вибрано бензол та толуол. В попередніх дослідках було з'ясовано, що найбільш ефективним полярним компонентом, який би збільшував рухливість АКББ, водночас зберігаючи достатньо добре розділення інших амінобензофенонів, виявився н-бутанол. Використання метанолу, етанолу та пропанолу значно погіршувало розділення АХБ, АБХБ, МХБ та АНБ разом із АББ та МББ. З метою підвищення ефективності, до хроматографічної системи було додано оцтову кислоту, що в цілому дало змогу запропонувати в ТШХ систему бензол:н-бутанол:оцтова к-та (98:2:1).

Таблиця 3

## Порівняння хроматографічних властивостей амінобензофенонів

Аміно- бензофенон	бензол	бензол:н-бутанол:оцтова к-та (98:2:1)	толуол:н-бутанол:оцтова к-та (98:2:1)
	hRf	hRf	hRf
АКББ	0	23	20
АКББ-Ме	15	34	30
АББ	50	48	39
МББ	75	73	68
АХБ	51	48	39
МХБ	75	73	68
АБХБ	62	58	50
АНБ	24	33	29
АНХБ	24	33	29

5 Порівняння відносної довжини хроматографічної рухливості амінобензофенонів відносно АХБ в системі бензол та запропонованій (див таблицю 3), демонструє майже однакову розподільну здатність обох систем, але запропонована на відміну від відомої, дозволяє виявляти АКББ. Використання толуолу замість бензолу суттєво не впливає на розділення, відмічається лише дещо менша хроматографічна рухливість АХБ, АББ, та АБХБ. (див. таблиця 3).

10 Із всіх досліджених реактивів для проявлення хроматограф, найбільш специфічним виявився реактив Маркі, з яким як АКББ, так і його метиловий ефір АКББ-Ме, утворює стабільне червоне забарвлення, при цьому чутливість становить 0,5 мкг в плямі для обох сполук (див табл. 4)

Таблиця 4

## Забарвлення з деякими реактивами

Речовина	Реактив	
	Маркі	Манделіна
АКББ	червоне	помаранчеве
АКББ-Ме	червоне	помаранчеве
АББ	-	-
МББ	-	-
АХБ	-	-
МХБ	-	-
АБХБ	-	-
АНБ	-	-
АНХБ	-	-
просидол	червоне	-
промедол	червоне	-

15 Інші амінобензофенони та співекстрактивні речовини подібної окраски не утворюють і не заважають відкриттю АКББ. Промедол та просидол, які теж дають аналогічне забарвлення, в запропонованій системі розчинників залишаються на старті і теж не заважають, крім того на відміну від АКББ вони не утворюються азобарвник та руйнуються при гідролізі. Із реактивом Манделіна обидві речовини утворюють яскраве помаранчеве забарвлення, але на результат реакції впливають співекстрактивні речовини, в присутності яких утворення забарвлення подавляється.

Спосіб, який заявляється, проводиться наступним чином:

25 До 30 г подрібнених внутрішніх органів труп (або 10 мл сечі) додають 60 мл 6 М хлороводневої кислоти (у випадку сечі додається 5 мл концентрованої кислоти) та нагрівають в герметично закритому флаконі на киплячій водяній бані протягом однієї години. По охолодженню гідролізат центрифугують, кислотність доводять до рН 2-3 (згідно з універсальним

індикаторним папером) та тричі екстрагують хлороформом (при дослідженні органів 20 мл, при дослідженні сечі - 5 мл). Хлороформні екстракти об'єднуються, зневоднюються зневодненням сульфатом натрію та упарюють. Половина екстракту наносять на хроматографічну пластинку у дві зони. Поряд з досліджуваним екстрактом в першій зоні пластинки наносять свідки АХБ, АБХБ, МХБ, АНБ та АКББ, в другій лише свідок АКББ. Пластинку хроматографують в системі розчинників (бензол:н-бутанол:оцтова к-та (98:2:1) до просування фронту розчинників на 8 см. Після закінчення хроматографування пластинка висушується до повного зникнення запаху розчинників та перша зона хроматографічної пластинки витримується 40 хв в променях кварцової лампи для фотолітичного дезалкілювання, після чого проводять проявлення реактивом Браттона-Маршалла. В разі появи в першій зоні хроматографічної пластинки малинової плями досліджуваного екстракту,  $R_f$  яких збігається із свідком АКББ, другу зону пластинки проявляють реактивом Маркі. Поява червоної плями досліджуваного екстракту та свідка АКББ,  $R_f$  яких збігається між собою та плямами свідка АКББ та досліджуваного екстракту в першій зоні хроматографічної пластинки, може свідчити про вживання гідазепаму. З метою підтвердження, до  $\mu$ г частини екстракту що лишився, додають 1 мл розчину діазометану в етилацетаті та втримують 10 хв при кімнатній температурі для метилування АКББ. По закінченню метилування етилацетат випаровується а залишок наносять на хроматографічну пластинку в дві зони. В обидві зони поряд із досліджуваним екстрактом наносять свідок метилового ефіру АКББ. Пластинку хроматографується в системі розчинників 4 (циклогексан:толуол:діетиламін (75:15:10) до просування фронту розчинників на 8 см. По закінченню хроматографування пластинка висушується до повного видалення запаху розчинників та одна зона пластинки проявляється реактивом Маркі, а друга реактивом Манделіна. Поява червоної плями після проявлення реактивом Маркі та помаранчевої після проявлення реактивом Манделіна, а також збігання значень  $R_f$  свідка АКББ та досліджуваного екстракту свідчить про вживання гідазепаму.

Приклад 1. Хворий X; 1984 р.н., наркоман приймає за немедичним призначенням лікарський засіб "Сибазон" та інші 1,4-бензодіазепіни Проведення аналізу дало можливість виявити присутність гідазепаму у сечі по значеннях  $R_f$  відповідних метаболітів та забарвленню з реактивами Маркі та Манделіна та реакцією Браттона-Маршала.

Приклад 2. Хвора Y; 1975 р.н., померла в лікарні від прийому невідомого лікарського засобу. Дослідження внутрішніх органів трупа дозволило ідентифікувати гідазепам та нітазепам по значеннях  $R_f$  відповідних метаболітів та забарвленню з реактивами Маркі, Манделіна та за реакцією Браттона-Маршала.

Приклад 3. Хворий Z; 1964 р.н., помер вдома від прийому невідомого бензодіазепіну. Дослідження внутрішніх органів трупа дозволило ідентифікувати "Сибазон" по значеннях  $R_f$  відповідних метаболітів та забарвленню з реактивом Браттона-Маршала та відсутністю забарвлення з реактивом Маркі та Манделіна.

Таким чином запропонований спосіб визначення гідазепаму дозволяє його надійно ідентифікувати серед інших 1,4- бензодіазепінів та невідомих лікарських сполук.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб виявлення гідазепаму у біологічному матеріалі людини, який здійснюють шляхом піддавання відповідного біологічного матеріалу кислотному гідролізу з подальшою екстракцією та наступним дослідженням методом хроматографії в тонких шарах сорбенту, який **відрізняється** тим, що крім відомих застосовують нову систему розчинників для виявлення амінобензофенонів, яка складається з бензолу, бутанолу та оцтової кислоти у певних співвідношеннях, в яких паралельно хроматографують екстракт, який досліджують, та речовини стандарти метаболітів гідазепаму та 1,4-бензодіазепінів, по закінченні хроматографування пластинку висушують до повного видалення запаху розчинників та одну зону пластинки проявляють реактивом Маркі, а другу реактивом Манделіна, поява червоної плями після проявлення реактивом Маркі та помаранчевої після проявлення реактивом Манделіна, а також збігання значень  $R_f$  свідка амінокарбоксібромбензофенону та досліджуваного екстракту свідчить про вживання гідазепаму.

---

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601