

ДОСЛІДЖЕННЯ ХРОМАТОГРАФІЧНОЇ ПОВЕДІНКИ МЕТФОРМІНУ В УМОВАХ ЗАГАЛЬНОГО ТШХ-СКРИНІНГУ ЛІКАРСЬКИХ РЕЧОВИН

© В. Ю. Москаленко, С. І. Мерзлікін

Національний фармацевтичний університет, Харків

Резюме: досліджено хроматографічну поведінку метформіну в умовах загального ТШХ-скринінгу лікарських речовин. Визначено найприйнятніші системи розчинників для хроматографування та специфічні реагенти для виявлення зон адсорбції метформіну на різних етапах скринінгових досліджень.

Ключові слова: метформін, антидіабетичні засоби, ТШХ-скринінг, хіміко-токсикологічний аналіз, виявлення.

Вступ. Відповідно до статистичних даних у США щорічно реєструють близько 5 млн гострих отруєнь різноманітними хімічними речовинами, у тому числі лікарськими засобами. Серед них 72,5 % складають ненавмисні, 2,5 % – навмисні та 2 % – професійні отруєння [1]. Основними причинами отруєнь лікарськими препаратами є передозування (випадкові, кримінальні та ін.) та наслідки їх побічних дій. Так, щорічно у світі від суїцидального передозування лікарськими засобами помирають близько 800 тис. осіб [2, 3], а внаслідок побічних дій комбінованих препаратів тільки у США щорічно госпіталізують близько 9 млн пацієнтів, серед яких 1 % – смертельні випадки [4].

Відомо, що практично кожна лікарська речовина за певних обставин може стати отрутою [2-4]. Це також стосується пероральних антидіабетичних засобів для лікування цукрового діабету (ЦД) 2 типу. Вони характеризуються довичним призначенням, доступністю до придбання через безрецептурний відпуск в аптечній мережі та небезпечними побічними діями. Наприклад, на сайті FDA (Food and Drug Administration) у період з 2002 по 2008 рр. висвітлено 78 випадків смертельного отруєння метформіном, який є основою сучасної фармакотерапевтичної схеми лікування ЦД 2 типу. Серед них внаслідок передозування – 32 випадки та внаслідок побічних дій – 46 випадків отруєння [5].

У практиці судово-токсикологічних досліджень на попередньому етапі хіміко-токсикологічного аналізу щодо виявлення токсиканту невідомого походження та аналітичної діагностики гострих отруєнь лікарськими речовинами у більшості випадків застосовують метод ТШХ-скринінгу з рекомендованими Міжнародною асоціацією судових токсикологів (TIAFT) умовами [6, 7].

Враховуючи велику кількість пацієнтів на ЦД, яка на сьогодні у світі складає близько 260 млн

та кожні 10 років подвоюється [8], а також вищенаведене, метою роботи було дослідження хроматографічної поведінки метформіну в умовах загального ТШХ-скринінгу лікарських речовин.

Методи дослідження. Як об'єкт дослідження використовували робочий стандартний зразок (РСЗ) метформіну гідрохлориду (субстанція, монографія EP 01/2005:0931, виробник Harman Finocem Ltd., серія № 051121), як стандартну речовину – РСЗ кофеїну (ГОСТ 19885-74).

Дослідження проводили на хроматографічних пластинках Merck (виробництво Німеччина): сорбент – силікагель 60 F254 (немодифікований силікагель), товщина шару сорбенту – 0,25 мм, тип підкладки – алюмінієва фольга, зв'язуюча речовина – силіказоль, додаткова речовина – люмінофор F₂₅₄, розмір пластини – 10×10 см та високоефективних пластинках Sorbfil ПТСХ-П-В-УФ (ТУ 26-11-17-89, виробництво РФ): сорбент – силікагель СТХ-1BE, фракція – 8-12 мкм, товщина шару сорбенту – 100 мкм, тип підкладки – ПЕТФ, зв'язуюча речовина – силіказоль, додаткова речовина – люмінофор F₂₅₄, розмір пластини 10×10 см.

Як рухомі фази використовували такі системи: 1) метанол-25 % амоніак (100:1,5) – система ТА; 2) циклогексан-толуен-діетиламін (75:15:10) – система ТВ; 3) хлороформ-метанол (90:10) – система ТС; 4) ацетон – система ТЛ; 5) метанол – система ТАЕ; 6) метанол-н-бутанол (60:40) – система ТАФ; 7) хлороформ-етанол (90:10) – система ТАІ; 8) хлороформ-циклогексан-кислота ацетатна льод. (40:40:20) – система ТАК; 9) хлороформ-метанол-кислота пропіонова (72:18:10) – система ТАЛ; 10) хлороформ-діоксан-ацетон-25 % амоніак (47,5:45:5:2,5); 11) ацетон-толуен-25 % амоніак-етанол (45:45:2,5:7,5); 12) н-бутанол-кислота ацетатна льод.-вода (60:10:30).

Системи № 1–6 – загальні системи, рекомендовані TIAFT для виявлення лікарських речовин

основного характеру; системи № 7–9 – загальні системи, рекомендовані ТІАFT для виявлення лікарських речовин кислого, нейтрального та основного характеру; системи № 10, 11 – загальні системи ТШХ-скринінгу лікарських речовин основного характеру, які застосовують у практиці судово-токсикологічних досліджень країн СНД; № 12 – спеціальна система для виявлення метформіну.

Розчини реагентів для виявлення зон адсорбції метформіну та кофеїну: суміш 12,5 % CuSO_4 та 10 М NaOH ; суміш 10 % натрій нітропрусида, 10 % калій фериціаніду та 10 % NaOH (1:1:1); реактив Драгендорфа; реактив Драгендорфа (у модифікації Мун'є) + H_2SO_4 конц.; 0,5 % кобальту роданід; 10 % FeCl_3 .

Для виявлення зон адсорбції досліджуваних речовин хроматографічні пластинки після елюювання та висушування перед обробкою розчинами реагентів переглядають в УФ-світлі.

Методика приготування випробуваного розчину РСЗ метформіну. 100 мг РСЗ метформіну розчиняють в 5 мл води дистильованої і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100 мл.

Методика приготування випробуваного розчину РСЗ кофеїну. 100 мг РСЗ кофеїну розчиняють в 5 мл води дистильованої гарячої і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100 мл.

Методика приготування розчину РСЗ метформіну для дослідження стабільності. 200 мг метформіну розчиняють в 5 мл води дистильованої і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100 мл.

Методика приготування розчинів барвників для перевірки розділюючої здатності (придатності) хроматографічних пластин. Судан червоний у толуолі (Б1) із концентрацією 0,5 г/л, метиловий оранжевий в етанолі (Б2) із концентрацією 0,1 г/0,1 л, метиловий червоний в ацетоні (Б3) із концентрацією 0,25 г/л та бромкрезоловий зелений в ацетоні (Б4) із концентрацією 0,5 г/0,1 л готують згідно з методиками ДФУ [9].

Методика дослідження стабільності випробуваного розчину метформіну. Випробуваний розчин РСЗ метформіну для дослідження стабільності розділяють на дві частини: першу частину піддають опроміненню УФ-світлом, другу – нагріванню до 50 °С по 2 години протягом 7 днів. Надалі 10 мкл досліджуваних розчинів наносять на пластинку Sorbfil ПТСХ-П-В-УФ або Merck та хроматографують у системах № 1 та № 12. Як розчин порівняння використовують свіжоприготовлений водний розчин РСЗ метформіну. Після елюювання пластинку виймають з камери та висушують при температурі від 100 до 110 °С у су-

шильній шафі, переглядають в УФ-світлі та проявляють парами йоду. Значення R_f досліджуваних зразків метформіну повинно збігатися зі значенням R_f контрольного зразка.

Методика визначення розділюючої здатності (придатності) хроматографічних пластинок. Хроматографування досліджуваних зразків проводять у камері об'ємом 500 см³, в яку вносять 50 мл елюентів. Попередньо хроматографічну камеру насичують парами відповідного елюенту протягом 30 хв, а пластинки Sorbfil ПТСХ-П-В-УФ та Merck активують нагріванням у сушильній шафі при 110 °С протягом 30 хв.

На лінію старту хроматографічної пластинки Sorbfil ПТСХ-П-В-УФ або Merck на відстані 2 см від краю наносять по 5 мкл Судану червоного в толуолі (Б1), метилового оранжевого в етанолі (Б2), метилового червоного в ацетоні (Б3) та бромкрезолового зеленого в ацетоні (Б4) та елюють в системі розчинників метанол-толуен (20:80). Довжина шляху пробігу розчинників складає 8 см. Після елюювання пластинку виймають з камери та висушують у сушильній шафі при температурі від 100 до 110 °С. Детектування зон адсорбції барвників Б1-Б4 здійснюють візуально при денному світлі.

Для встановлення різниці R_f барвників Б1-Б4 у межах однієї пластинки, що відповідає вимогам ДФУ [10], наносять паралельно 5 зразків одного розчину для перевірки розділюючої здатності барвників Б1-Б4 та хроматографують у вищевказаних умовах.

Методика хроматографічного дослідження об'єктів. Хроматографування досліджуваних зразків проводять у герметичній камері об'ємом 500 см³, в яку вносять 50 мл елюенту. Попередньо хроматографічну камеру насичують парами відповідного елюенту протягом 30 хв, пластинки активують нагріванням у сушильній шафі при 110 °С протягом 30 хв та поділяють на декілька зон залежно від етапів дослідження. На лінію старту відповідних зон хроматографічної пластинки Sorbfil ПТСХ-П-В-УФ або Merck наносять 5 мкл (5 мкг) випробуваного розчину метформіну, 5 мкл (5 мкг) розчину РСЗ кофеїну та елюють в системах розчинників № 1–12. Довжина шляху пробігу розчинників складає 8 см. Після елюювання пластинку виймають з камери, висушують у сушильній шафі при температурі від 100 до 110 °С, переглядають в УФ-світлі та відповідні зони обробляють відповідними реагентами.

Методика визначення чутливості реагентів. Різні аліквоти (30 мкл-0,1 мкл) випробуваного розчину РСЗ метформіну (концентрація 1000 мкг/мл) мікрокапіляром наносять на пластинку Sorbfil ПТСХ-П-В-УФ розміром 2×2 см. Після висушування плями пластинку переглядають в

УФ-світлі, а потім у місце нанесення реагенту краплинно наносять відповідний реактив.

Результати й обговорення. Для стандартизації умов даних досліджень проведено перевірку розділяючої здатності (придатності) використаних хроматографічних пластинок. При

хроматографуванні досліджуваних зразків барвників Б1-Б4 у вищенаведених умовах значення їх Rf знаходились у межах допустимого діапазону значень Rf за вимогами ДФУ, що свідчить про придатність використаних у дослідженні хроматографічних пластинок (табл. 1).

Таблиця 1. Результати перевірки придатності хроматографічних пластинок

Rf індикатора	Rf за вимогами ДФУ			
	Судан червоний (Б1)	Метилловий оранжевий (Б2)	Метилловий червоний (Б3)	Бромкрезоловий зелений (Б4)
	0,75-0,98	0,10-0,25	0,35-0,55	<0,15
Merck	0,95	0,17	0,55	0,08
Sorbfil	0,97	0,18	0,52	0,08

За результатами дослідження стабільності випробуваного розчину РСЗ метформіну встановлено, що даний розчин є стабільним за певних умов, оскільки значення його Rf не змінюється та збігається зі значеннями Rf контрольного розчину РСЗ метформіну (Sorbfil 0,11 та 0,28; Merck 0,07 та 0,20).

У таблиці 2 наведено результати дослідження специфічності використаних реагентів для

виявлення зон адсорбції метформіну на хроматографічних пластинках Sorbfil та Merck, а також результати граничного визначення метформіну даними реагентами. Встановлено, що реактив Драгендорфа у різних модифікаціях, який застосовується для виявлення більшості органічних речовин, не може бути використаний для виявлення метформіну за відсутності утворення забарвлення.

Таблиця 2. Результати дослідження специфічності та чутливості реагентів виявлення метформіну

№ з/п	Проявник	Результати виявлення метформіну	
		забарвлення	межа виявлення
1	УФ-світло	темне на світлому фоні	5 мкг
2	10 % FeCl ₃	жовте	20 мкг
3	реагент Драгендорфа	відсутнє	-
4	реагент Драгендорфа (за Мун'є) + обробка пластинок H ₂ SO ₄ конц.	відсутнє	-
5	12,5 % CuSO ₄ + 10 М NaOH	рожево-фіолетове	0,25 мкг
6	0,5 % кобальту роданід	синьо-зелене	1 мкг
7	суміш 10 % натрій нітропрусида, 10 % калій фериціаніду та 10 % NaOH	червоне	0,5 мкг

Одержане забарвлення з 10 % FeCl₃ свідчить, що порівняно з іншими реагентами він є менш чутливим, неспецифічним для метформіну і може бути використаний тільки на 2-му етапі ТШХ-скринінгу як підтверджувальний тест. Достатньо чутливим способом виявлення метформіну є попереднє переглядання хроматографічної пластинки в УФ-світлі (темна пляма на світлому фоні) до обробки реагентами. Це може бути корисним для застосування на 1-му етапі ТШХ-скринінгу.

Найчутливішим реагентом визначено лужний розчин 12,5 % CuSO₄ (0,25 мкг), який є специфічним для бігуанідів [11, 12] і може бути використаний на 2-му етапі ТШХ-скринінгу. Достатньо чутливим реагентом визначено також суміш 10 % натрій нітропрусида, 10 % калій фериціаніду та 10 % NaOH (0,5 мкг), який також є специфічним для метформіну.

У таблиці 3 наведено результати хроматогра-

фічної поведінки метформіну в умовах загального ТШХ-скринінгу лікарських речовин. Для стандартизації умов досліджень (перевірки придатності хроматографічної системи) як стандартну речовину використовували РСЗ кофеїну.

Відповідно стандартної процедури ТШХ-скринінгу лікарських речовин дослідження проводили у два етапи. На першому етапі хроматографічні пластинки поділяли на чотири зони (А, В, С, D). На лінії старту хроматографічної пластинки зон А, В та С наносили відповідні концентрації випробуваного розчину РСЗ метформіну, а на лінію старту зони D – відповідні концентрації випробуваного розчину РСЗ кофеїну. Після елюювання у системах № 1–11 зони метформіну А та В обробляли відповідними загальними та специфічними реагентами (див. табл. 2), а зону D – реактивом Драгендорфа. Зона С залишалась необробленою.

Таблиця 3. Результати хроматографічної поведінки метформіну

№ системи	Метформін		Кофеїн		Rs	
	Sorbfil	Merck	Sorbfil	Merck	Sorbfil	Merck
1	0,11±0,01	0,07±0,01	0,92±0,01	0,80±0,01	0,12	0,09
2	На старті	На старті	На старті	На старті	0,0	0,0
3	На старті	На старті	На старті	На старті	-/-	-/-
4	На старті	На старті	0,82±0,01	0,54±0,01	-/-	-/-
5	На старті	На старті	0,59±0,01	0,73±0,01	-/-	-/-
6	На старті	На старті	0,47±0,01	0,46±0,01	-/-	-/-
7	На старті	На старті	0,87±0,01	0,61±0,01	-/-	-/-
8	На старті	На старті	0,66±0,01	0,39±0,01	-/-	-/-
9	На старті	На старті	0,81±0,01	0,82±0,01	-/-	-/-
10	На старті	На старті	0,79±0,01	0,52±0,01	-/-	-/-
11	На старті	На старті	0,75±0,01	0,56±0,01	-/-	-/-
12	0,28±0,01	0,20±0,01	0,82±0,01	0,82±0,01	0,34	0,24

Встановлено, що на 1-му етапі досліджень найприйнятнішою визначено систему розчинників № 1. На 2-му етапі досліджень з місця адсорбції метформіну на необробленій реагентами зони С видаляли шар сорбенту (1×1 см) та відповідну речовину елюювали 90 % метанолом. Частину одержаного елюату хроматографували у системі розчинників № 12, яку визначено спеціальною для виявлення метформіну та обробляли відповідними специфічними реагентами (див. табл. 2). Для підтвердження одержаних результатів за виявленням метформіну другу частину елюату хроматографува-

ли в умовах ВЕРХ [13]. Час утримування метформіну з елюату збігався з часом утримування РСЗ метформіну (2,4 хв).

Висновки. Експериментально доведено придатність використаних хроматографічних пластинок Sorbfil та Merck для скринінгових досліджень метформіну. Визначено загальні та специфічні реагенти для виявлення зон адсорбції метформіну на відповідних хроматографічних пластинках. Визначено найприйнятніші системи розчинників, які можуть бути використаними для виявлення метформіну на різних етапах загального ТШХ-скринінгу лікарських речовин.

Література

1. Вергейчик Т. Х. Токсикологическая химия: учеб. / Т. Х. Вергейчик; под ред. проф. Е. Н. Вергейчика. – М. : МЕДпресс-информ, 2009. – 400 с.
2. Hawton K. Suicide / K. Hawton, K. van Heeringen // The Lancet. – 2009. – Vol. 373, № 9672. – P. 1372–1381.
3. V?rnik P. Suicide in the world / P. Varnik // International journal of environmental research and public health. – 2012. – Vol. 9, № 3. – P. 760–771.
4. Токсикологическая химия: учеб. для вузов / под ред. Т. В. Плетеневой. – 2-е изд., испр. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 512 с.
5. Мерзлікін С. І. Інформаційний огляд щодо обґрунтування хіміко-токсикологічного дослідження на метформін / С. І. Мерзлікін, В. Ю. Москаленко // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2010. – № 1-2 (14-15). – С. 3-10.
6. ТСХ-скринінг токсикологически значимых соединений, изолируемых экстракцией и сорбцией: уч. пособие / Раменская Г. В., Родионова Г. М., Кузнецова Н. И., Петухов А. Е. – М. : "ГЭОТАР-Медиа", 2010. – С. 61-66.
7. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons: 3-d edition. – London: Pharmaceutical Press, electronic version, 2005.
8. Уильямс Г. Руководство по диабету: рук-во. – 2-е

изд. / Г. Уильямс, Д. Пикап. – М. : МЕДпресс-информ, 2003. – 248 с.

9. Державна Фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". – 1-ше вид. – Харків : Рирег, 2001. – 531 с.

10. Державна Фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". – 1-ше вид. – Доповнення 2. – Харків : Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр", 2008. – 620 с.

11. Ray Ranajit Kumar Metal and non-metal biguanide complexes / Ranajit Kumar Ray, George B Kauffman, Ranajit Kumar Ray. – New-Delhi: New Age International. – 1999. – 176 p.

12. Barman Tannistha R. Mixed-ligand complex formation equilibria of Cu (II) with biguanide in the presence of glycine as the auxiliary ligand / Tannistha R. Barman, G. N. Mukherjee // Journal of chemical science. – 2006. – Vol. 118, № 5. – P. 411–418.

13. Москаленко В. Ю. Розробка умов рідинної хроматографії для хіміко-токсикологічного аналізу метформіну / В. Ю. Москаленко, С. І. Мерзлікін // Запорозький медичний журнал. – 2011. – Т. 13, № 3. – С. 86-88.

ИССЛЕДОВАНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ПОВЕДЕНИЯ МЕТФОРМИНА В УСЛОВИЯХ ОБЩЕГО ТСХ-СКРИНИНГА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

В. Ю. Москаленко, С. И. Мерзликин

Национальный фармацевтический университет, Харьков

Резюме: исследовано хроматографическое поведение метформина в условиях общего ТСХ-скрининга лекарственных веществ. Определены наиболее приемлемые системы растворителей для хроматографирования и специфические реагенты для обнаружения зон адсорбции метформина на различных этапах скрининговых исследований.

Ключевые слова: метформин, антидиабетические средства, ТСХ-скрининг, химико-токсикологический анализ, обнаружение.

RESEARCH OF METFORMIN CHROMATOGRAPHIC BEHAVIOUR UNDER TLC-SCREENING CONDITIONS OF DRUGS

V. Yu. Moskalenko, S. I. Merzlikin

National University of Pharmacy, Kharkiv

Summary: the chromatographic behavior of metformin under general TLC-screening conditions of drugs was researched. The most suitable solvent systems for chromatography and specific reagents for the detection of metformin zones absorption at various stages of TLC-screening were determined.

Key words: metformin, antidiabetic drugs, TLC-screening, chemical-toxicological analysis, determination.