

ПРИМЕНЕНИЕ ВЭЖХ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЛИБЕНКЛАМИДА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ

Кучер Т.В., Мерзликин С.И., Коваленко Е.В.

*Национальный фармацевтический университет,
кафедра токсикологической химии,
г. Харьков, Украина*

Ключевые слова: глибенкламид, изолирование, биологические объекты, идентификация, ВЭЖХ.

Резюме: в статье освещены результаты исследований по выбору условий ВЭЖХ для идентификации глибенкламида в извлечениях, выделенных из биологических объектов. Полученные результаты могут быть использованы для обнаружения данного токсиканта при проведении судебно-токсикологических исследований.

Resume: in this paper the results of the research relating for choosing of the HPLC conditions for the identification of glibenclamide in the extracts, isolated from the biological objects has been presented. The obtained results can be used for the detection of this toxicant in the forensic toxicology investigations.

Актуальность. Согласно законодательным актам международной судебной практики, при отравлении химическим веществом, в том числе лекарственным, с целью установления причины отравления и природы токсиканта проводятся судебно-токсикологические исследования [1]. Препараты производные сульфонилмочевины – Глибенкламид, Гликлазид и Глимепирид являются основой фармакотерапевтической схемы лечения сахарного диабета 2 типа. Среди них препарат второй генерации Глибенкламид производится в большинстве стран под разными торговыми названиями: Бетаназ, Гламид, Глибекс, ГлибOMET, Глибофор, Гликрон, Глюкобене, Глюкованс, Глюконорм, Даон, Даонил, Диабета, Дуотрол, Эуглюкон, Манинил, Микроназе и др. [2, 4]. Пожизненное применение, растущее число больных сахарным диабетом 2 типа, побочные действия, комбинированная терапия, безрецептурный отпуск – факторы токсикологической опасности его неконтролируемого применения [4]. По данным веб-сайтов FDA и patientsville.com в период 2008-2014 гг. зарегистрировано 773 случая отравлений глибенкламидом. Среди них 68 летальных, из которых 27 – суициды [6]. Согласно данным [5, 7], летальные отравления данным лекарственным средством в основном связаны с суицидальными передозировками, при которых использованные дозы в зависимости от обстоятельств превышали терапевтические от 5 до 10 раз.

Цель работы: выбор условий ВЭЖХ для идентификации глибенкламида в извлечениях из биологических объектов, приемлемых для судебно-токсикологических исследований.

Задачи: 1. Провести изолирование глибенкламида из биологических объектов с применением общего для лекарственных веществ метода Стаса-Отто. 2.

Предложить условия идентификации глибенкламида в извлечениях из биологических объектов методом ВЭЖХ.

Материалы и методы

Методика моделирования отравления. 50 г измельченной свиной печени помещают в колбу, добавляют 3 мл метанол-метилхлоридного раствора (1:1) глибенкламида, содержащего 20 мг вещества. Смесь тщательно перемешивают и оставляют на 24 ч при комнатной температуре. Изолирование токсиканта из тканей печени проводят этанолом, подкисленным щавелевой кислотой до pH=2 (метод Стаса-Отто), согласно методики [3]. Полученные хлороформные экстракты хроматографируют в условиях методов ТСХ и ВЭЖХ.

Условия ТСХ исследований. Исследования проводят на хроматографических пластинках Merck silica gel 60 F₂₅₄ (производства Германии) и Sorbfil ПТСХ-II-B (производства РФ) размером 10×10 см. Перед элюированием образцов хроматографические пластинки предварительно отмывают метанолом и активируют в сушильном шкафу при температуре 110-120 °С в течение 0,5 ч.

Высушенную хроматографическую пластинку делят на три части, на линию старта которой в виде точки в зону 1 наносят 10 мкл (1 мкг/мл) стандартного раствора глибенкламида. В зоны 2 и 3 полосой шириной 2 см наносят ¼ часть хлороформного экстракта, полученного из тканей печени. После хроматографирования в этилацетате пластинку высушивают, а зону 1 и 2 обрабатывают специфическим для глибенкламида проявителем: 1% раствором ванилина или 5% раствором хлоралгидрата. В необработанной проявителем зоне 3, в области соответствующего глибенкламиду значения R_f с пластинки скальпелем снимают слой сорбента площадью 3×1 см, который помещают в стеклянный флакон, содержащий 10 мл метилового спирта, встряхивают в течение 5 мин и фильтруют через фильтр «красная лента». Полученный элюат используют для ВЭЖХ исследований.

Условия ВЭЖХ исследований. Хроматографирование полученных элюатов проводят на жидкостном микроколоночном хроматографе "Милихром-А-02" с УФ-детектированием (ЗАО «Еконова» Новосибирск, РФ). Для разделения веществ используют обратно-фазовую колонку Prontosil -120 - 5 - C18 - AQ размером Ø2 × 75 мм, зерна 5 мкм («Bischoff Analysetechnik und Geräte GmbH», Германия). Градиентное элюирование выполняют путем смешивания двух элюентов: элюент А - [4М LiClO₄ - 0,1М HClO₄] - H₂O (5:95), элюент Б - ацетонитрил квалификации «для ВЭЖХ». Элюирование – линейный градиент от 5% до 100% ацетонитрила за 40 мин, затем 100% ацетонитрил в течение 3 мин. Скорость подвижной фазы – 100 мкл/мин. Температура термостата колонки – 35°С. УФ-спектрофотометрическое детектирование проводят одновременно при 8 длинах волн: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 и 300 нм. Анализ и обработку хроматограмм осуществляют программой «Аналитика-Chrom». Исследуемые растворы глибенкламида с концентрацией 2,0 мкг/мл. Объем пробы 20 мкл. Правильность методики периодически контролируют путем хроматографирования специального контрольного

многокомпонентного раствора, состоящего из бромид-иона, уридина, кофеина, прозерина, *m*-нитро-анилина, *n*-нитроанилина и трифтазина.

Результаты исследований и их обсуждение

С целью моделирования отравлений глибенкламидом измельченную свиную печень в течение суток насыщали раствором глибенкламида в токсических концентрациях. Для выделения (изолирования) токсиканта из данного биологического объекта применяли общий для химико-токсикологического анализа (ХТА) лекарственных веществ метод Стаса-Отто.

В соответствии с методологией ХТА, полученный в результате изолирования хлороформный экстракт глибенкламида был исследован на предмет идентификации токсиканта в тонком слое сорбента, с последующей очисткой экстракта от биогенных примесей. Было установлено, что при обработке первой и второй хроматографических зон специфическими проявителями: 1% раствором ванилина или 5% раствором хлоралгидрата на хроматографической пластинке визуализировались индивидуальные пятна со значением R_f 0.45-0.47, соответствующие стандартному образцу глибенкламида. При этом, в первом случае пятно было окрашено в фиолетовый цвет, а в другом – зелено-коричневый. Для подтверждения результатов по идентификации глибенкламида методом ТСХ полученный с третьей непроявленной хроматографической зоны метанольный элюат токсиканта был исследован методом ВЭЖХ.

Идентификацию пиков образца, данного вещества, выделенного из биологического материала (Рис. 1), проводили путем сравнения его времени удерживания (t_R) и спектральных характеристик в области УФ-спектра с параметрами, заранее полученными для стандартного образца глибенкламида (Рис. 2). УФ-детектирование проводили одновременно при 8 длинах волн: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 и 300 нм. Для каждого пика рассчитывали 7 характерных нормированных спектральных параметров – отношение площадей пиков при длинах волн $\lambda_2 - \lambda_8$ к площади пика при длине волны $\lambda_1 = 210$ нм ($R = S_\lambda / S_{210}$). Совокупность этих спектральных отношений R вместе с величиной объема удерживания использовали для идентификации пика данного образца на хроматограмме. Максимальную площадь пика, как стандартного образца глибенкламида и образца данного вещества, выделенного из биологического материала, наблюдали при длине волны 230 нм. Значение времени удерживания для стандартного образца глибенкламида ($t_R=9,999$), совпадало с соответствующими параметрами, полученными для образца данного вещества, выделенного из биологического материала. Минимальная концентрация стандартного образца глибенкламида составила 0,1 мкг/мл. Концентрация для образца данного вещества, выделенного из биологического материала, составила 0,113 мкг/мл.

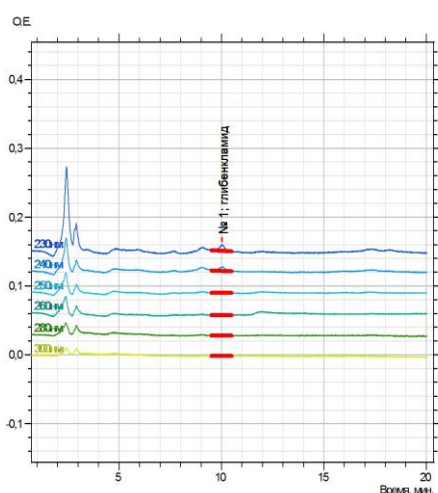


Рис. 1 - Хроматограмма элюата из биологического материала

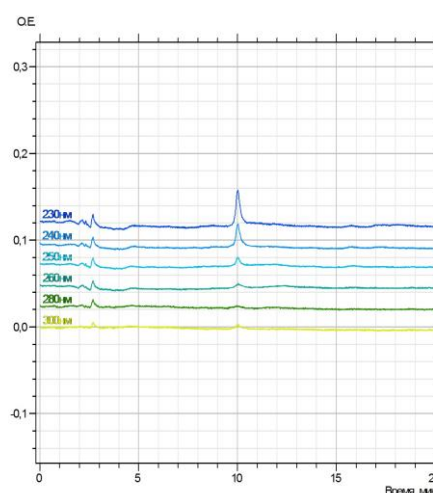


Рис. 2 - Хроматограмма стандартного образца глибенкламида (2 мкг)

В результате исследований было установлено, что время удерживания стандартного образца глибенкламида и образца данного вещества, выделенного из биологического материала, являются сопоставимыми. При этом, на хроматограмме элюата, полученного из тонкого слоя сорбента, не обнаруживаются пики примесей, мешающие идентификации глибенкламида.

Выводы:

1. Предложены условия ТСХ-очистки хлороформного экстракта глибенкламида, полученного из тканей печени в результате изолирования токсиканта из биологического объекта общим для лекарственных веществ методом Стаса-Отто.
2. Выбраны условия для идентификации глибенкламида в извлечениях из биологических объектов методом ВЭЖХ.
3. Полученные результаты могут быть использованы для обнаружения глибенкламида в биологических объектах при проведении судебно-токсикологических исследований.

Литература

1. Карташов, В.А. Химико-токсикологический анализ: в 2 ч. / ч. 1. Выделение токсических веществ из биологических объектов. - Майкоп: ООО «Качество», 2008. – 188 с.
2. Каджарян, В. Г. Новое в лечении сахарного диабета 2 типа / В. Г. Каджарян, Н.И. Капшитарь // Запорожский медицинский журнал. – 2014 – №1 (82) – С. 74-79.
3. Крамаренко, В. Ф. Токсикологическая химия / В. Ф. Крамаренко – К.: Высшая школа, 1989. – 272с.
4. Решедько, Г.К. Клиническое применение глибенкламида: вопросы безопасности и эффективности / Г.К. Решедько, Е.В. Хайкина // Проблемы эндокринологии. – 2012. – № 3. – С.65-69.
5. Completed suicide [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.ehealthme.com/ds/completed+suicide>
6. Side effects [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://patientaville.com>.

7. Spiller, H.A. Toxicology of oral antidiabetic medications / H.A. Spiller, T.S. Sawyer // Am. J. Health Syst. Pharm. – 2006. – Vol. 63(10). – P. 929-938.

Репозиторий БГМУ