

УДК 615.272.3:543.544:54.061

**РАЗРАБОТКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ
ОБНАРУЖЕНИЯ ДЕРИВАТА МЕТФОРМИНА В МОЧЕ**

Мерзликин С.И., Москаленко В.Ю.

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков, Украина

Актуальность. Производное бигуанида метформин (Глюкофаж) – пероральное антидиабетическое средство, широко применяемое для лечения сахарного диабета 2 типа. Вместе с тем, пожизненное его применение, побочные действия, доступность в аптечной сети, постоянно растущее число пациентов с сахарным диабетом – факторы, определяющие токсикологическую опасность при неконтролируемом применении препарата.

Проведенный информационный обзор случаев острых отравлений метформином, позволил определить их основные причины, которые в основном обусловлены умышленной и неумышленной передозировкой. Важным условием осуществления судебно-токсикологических исследований, проводимых в рамках судебно-медицинской экспертизы на химическое вещество, ставшее причиной отравления, является применение эффективных методов для изолирования токсиканта из биологических объектов, а также современных селективных и высокочувствительных аналитических методов для его обнаружения и количественного определения в полученных извлечениях.

Цель исследований. Разработка методики хроматографического обнаружения деривата метформина в моче для аналитической диагностики острых отравлений препаратом.

Методы исследований. В качестве вещества-маркера использовали триацетил-1,1-диметилбигуанид (триацетилметформин), полученный путем ацетилирования основания метформина. Исследования методом ВЭЖХ проводили на хроматографе «Милихром А-02» (ЗАО «ЭкоНова, г. Новосибирск) на базе НВП «Аналитика», г. Харьков [1].

Методика приготовления серии растворов триацетилметформина для построения градуировочного графика: 100,0 мг триацетилметформина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 10,0 мл метанола и доводят объем раствора тем же растворителем до метки (стандартный раствор, концентрация 1000 мкг/мл). В ряд мерных колб вместимостью 100 мл вносят по 12,0; 10,0; 8,0; 6,0; 5,0 и 4,0 мл стандартного раствора и доводят объем растворов тем же растворителем до метки (растворы 1, 2, 3, 4, 5 и 6; концентрация 120, 100, 80, 60, 50 и 40 мкг/мл, соответственно). Все растворы готовят при комнатной температуре за 10 минут до проведения анализа. Метанольные растворы триацетилметформина 1-6 хроматографируют трижды; объем пробы составляет 4 мкл.

Методика изолирования деривата метформина из мочи: к 10,0 мл модельного образца мочи добавляли 100,0 мкг метформина и 2,0 г сульфата аммония. Смесь перемешивают, центрифугируют, надосадочную жидкость трижды экстрагируют новыми порциями по 10,0 мл смеси гексан-толуол (1:1).

Органический слой не исследуют. К оставшемуся водному слою добавляют 4,0 мл ацетилхлорида и 4,0 мл уксусной кислоты ледяной. Полученную смесь нагревают на водяной бане при $T\ 60\ ^\circ\text{C}$ в течение 2 часов, охлаждают и центрифугируют. Надосадочную жидкость переносят в делительную колбу и трижды экстрагируют новыми порциями по 20,0 мл метиленхлорида, отделяя водный слой в делительной воронке. Полученные экстракты объединяют, центрифугируют, надосадочную жидкость упаривают, сухой остаток очищают методом ТСХ (элюент для выделения вещества из тонкого слоя сорбента – метанол). Полученный элюат исследуют методом ВЭЖ на предмет обнаружения и количественного содержания деривата метформина в полученном извлечении.

Результаты исследований. С целью повышения эффективности экстракции гидрофильного метформина из мочи проведено дериватизацию его молекулы путём ацетилирования аминогрупп смесью ацетилхлорид-уксусная кислота (1:1) с соответствующим получением триацетил-1,1-диметилбигуанида (триацетилметформина) [2]. Установлено, что триацетилметформин легко растворяется в органических растворителях, поэтому в качестве экстрагента для его изолирования из мочи нами предложен метиленхлорид при рН 9. Для очистки извлечения от белков использовали 20% раствор сульфата аммония и центрифугирование, а очистку извлечения от соэкстрактивных липофильных веществ проводили экстракцией смесью гексан-толуол (1:1). Для разработки методики количественного определения триацетилметформина в моче методом ВЭЖХ предварительно строили график зависимости площади пика от концентрации исследуемого вещества на основе приготовленной серии его метанольных растворов. В диапазоне соответствующих концентраций наблюдалась линейность полученного графика. Исходя из данного графика выводили уравнение прямой, которое в дальнейшем использовали для расчёта концентрации исследуемого вещества в извлечениях из мочи. По результатам исследования установлено, что при изолировании деривативата метформина из мочи в органический слой в среднем экстрагируется 85,05 %. Относительное стандартное отклонение при этом не превышает 7,4 %.

Выводы. Разработана методика хроматографического обнаружения и количественного определения деривативата метформина в моче для аналитической диагностики острых отравлений препаратом.

Список литературы

1. Москаленко, В. Ю. Розробка та стандартизація умов аналітичної діагностики гострих отруєнь метформіном / В. Ю. Москаленко, С. І. Мерзлікін // Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. – 2013. – № 6 (32). – С. 15-20.
2. Москаленко, В. Ю. Ізолювання метформіну з біологічних об'єктів / В. Ю. Москаленко, С. І. Мерзлікін // Український біофармацевтичний журнал. – 2013. – № 6 (29). – С. 70-74.