

## СТАНДАРТИЗАЦІЯ ВИЗНАЧЕННЯ ГЛІКЛАЗИДУ В БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТАХ ДЛЯ ЦІЛЕЙ ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНОГО АНАЛІЗУ

Мерзлікін С. І., Кучер Т. В.\*

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

\*ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ  
України", м. Тернопіль

Отруєння хімічного походження є глобальною проблемою охорони здоров'я в світі. Токсикологічна ситуація в Україні відповідає загальному світовому та європейському трендам поширеності та летальності внаслідок гострих інтоксикацій, які часто пов'язані з використанням лікарських речовин при самолікуванні та з суїцидальною метою. За певних обставин практично кожна лікарська речовина може спричинити отруєння.

Так, згідно з даними сайтів FDA і *patientsville.com* у багатьох країнах світу в період 2010-2015 рр. зареєстровано близько 600 випадків отруєнь гліклазидом, *N*-(гексагідроциклопентан[с]пірол-2(1*H*)-ілкарбамоіл)-4-метил-бензенсульфонамід, який є поширеним антидіабетичним засобом для лікування цукрового діабету (ЦД) 2 типу. Серед них, понад 60 випадків – летальні отруєння, які в основному обумовлені навмисним передозуванням препаратом у дозах, що перевищують терапевтичні в десятки та більше разів. Найбільша кількість зареєстрованих отруєнь гліклазидом спостерігається у США та країнах Західної Європи, що насамперед пояснюється доступністю до бази даних FDA. Проте, кількість випадків летальних отруєнь препаратом може бути значно більшою за умов їх реєстрації в інших країнах, зокрема в Україні, що пов'язане з відсутністю методів систематичного хіміко-токсикологічного аналізу (ХТА) в закладах судово-медичної експертизи. Тому, дослідження в даному напрямку є актуальними, а одержані результати сприятимуть якісному проведенню судово-токсикологічних досліджень.

*Мета досліджень* полягає у розробці методології визначення гліклазиду в біологічних об'єктах для аналітичної діагностики летальних передозувань препаратом.

*Матеріали та методи.* Реактиви, що використовувались, відповідали кваліфікації «для ВЕРХ»: ацетонітрил (Sigma-Aldrich Laborchemikallen, GmbH), метанол (Merck, Darmstadt, Germany), літій перхлорат тригідрат (Sigma, Aldrich, США), вода бідистильована (Merck, Darmstadt, Germany). Інші використані реактиви були кваліфікації чда.

Дослідження методом ТШХ проводили на хроматографічних пластинках Merck silica gel 60 F<sub>254</sub> розміром 10×10 см. Рухома фаза – етилацетат. Перед елююванням хроматографічну пластинку попередньо імпрегнують метанолом та активують у сушильній шафі при температурі 110-120 °С протягом 0.5 год. *Методика хроматографування:* пластинку ділять на три частини, на лінію старту якої у вигляді точки в зону 1 наносять 10 мкл (1 мкг/мл) стандартного розчину гліклазиду. У зону 2 смугою завтовшки 2 см наносять 1 мл хлороформного екстракту, одержаного з тканин печінки. У зону 3 смугою завтовшки 2 см наносять 1/3 частини хлороформного екстракту, одержаного з тканин печінки. Після хроматографування пластинку висушують, а зони 1 і 2 обробляють специфічним для гліклазиду проявником: 1% розчином ваніліну або 5% розчином хлоралгідрату. Із зони 3 пластинки, що необроблена проявником, в області відповідного гліклазиду значення R<sub>f</sub> видаляють шар сорбенту площею 3×1 см та поміщають в скляний флакон, що містить 10 мл метанолу. Флакон струшують протягом 5 хв та вміст фільтрують через паперовий фільтр марки «червона стрічка». Одержаний метанольний елюат досліджують методом ВЕРХ.

Дослідження методом ВЕРХ проводили на рідинному хроматографі «Міліхром-А-02» з УФ-детектуванням (РФ). Для розділення речовин використовували обернено-фазову колонку Prontosil-120-5-C18-AQ розміром Ø2×75 мм, зерніння 5 мкм («Bischoff Analysetechnik

und Geräte GmbH», Німеччина). Градієнтне елюювання виконували шляхом змішування двох елюентів: елюент А – (0.2 М розчин  $\text{LiClO}_4$  – 0.005 М розчин  $\text{HClO}_4$ ) та елюент Б - ацетонітрил кваліфікації «для ВЕРХ». Швидкість рухомої фази - 100 мкл/хв. Температура термостата колонки – 35 °С. УФ-спектрофотометричне детектування проводили одночасно при 8 довжинах хвиль: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 і 300 нм. Аналіз та обробку хроматограм здійснювали за допомогою програми «Аналітика-Chrom». Правильність методики періодично контролювали шляхом хроматографування спеціального контрольного багатокomпонентного розчину, що складається з бромід-іона, уридину, кофеїну, прозерину, *m*-нітроаніліну, *n*-нітроаніліну і трифтазину. *Методика хроматографування*: Елюент А готували з використанням розчину 1 та розчину 2. *Приготування розчину 1* (4.1 М водний розчин  $\text{LiClO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ ): близько 330.0 г  $\text{LiClO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$  (точна наважка) поміщають в мірну колбу об'ємом 500 мл і розчиняють в 450.0 мл бідистильованої води.

Отриманий розчин перемішують при 50 °С до повного розчинення, охолоджують до кімнатної температури, доводять об'єм тим самим розчинником до мітки та фільтрують через мембранний фільтр з розміром пор 0.45 мкм. *Приготування розчину 2* (4 М водний розчин  $\text{LiClO}_4$  в 0.1 М  $\text{HClO}_4$ ): у мірну колбу об'ємом 250 мл відмірюють 2.20 мл 0.1 М  $\text{HClO}_4$  і доводять об'єм розчином 1 до мітки. *Приготування елюенту А*: у мірну колбу об'ємом 200 мл відмірюють 10.00 мл розчину 2 і доводять об'єм бідистильованою водою до мітки. *Приготування випробуваних розчинів гліклазиду*: близько 10.0 мг (точна наважка) гліклазиду поміщають в мірну колбу об'ємом 100 мл, розчиняють у 10.0 мл метанолу та доводять об'єм тим самим розчинником до мітки (*стандартний розчин 1*, концентрація речовини 100.0 мкг/мл).

У мірну колбу об'ємом 100 мл вносять 20.0 мл *стандартного розчину 1* та доводять об'єм тим самим розчинником до мітки (*випробуваний розчин 1*, концентрація речовини 20.0 мкг/мл). У мірну колбу об'ємом 100 мл вносять 10.0 мл *стандартного розчину 1* та доводять об'єм тим самим розчинником до мітки (*стандартний розчин 2*, концентрація речовини 10.0 мкг/мл).

У дві мірні колби об'ємом 100 мл почергово вносять 20.0 та 5.0 мл *стандартного розчину 1* та доводять об'єми тим самим розчинником до мітки (*випробувані розчин 1 та 2*, концентрація речовини 20.0 та 5.0 мкг/мл). У три мірні колби об'ємом 100 мл почергово вносять 20.0, 10.0 та 5.0 мл *стандартного розчину 2* та доводять об'єми тим самим розчинником до мітки (*випробувані розчини 3, 4 та 5* відповідно, концентрація речовини 2.0, 1.0 та 0.5 мкг/мл). У дві мірні колби об'ємом 100 мл почергово вносять 10.0 та 5.0 мл *випробуваного розчину 3* та доводять об'єми тим самим розчинником до мітки (*випробуваний розчин 6 та 7* відповідно, концентрація речовини 0.2 та 0.1 мкг/мл).

Приготовані випробувані розчини хроматографували тричі, кожен за вищенаведених умов Детектування сигналу гліклазиду проводили за довжини хвилі 230 нм. Об'єм проби складав 20 мкл.

*Результати досліджень*. Методологія досліджень відповідає міжнародній практиці ХТА на хімічну речовину, що спричинила отруєння, і включає розробку ефективного методу ізолювання гліклазиду з біологічного матеріалу, а також чутливих, специфічних та селективних методик виявлення та кількісного визначення токсиканту в одержаних вилученнях.

Моделювання гострої інтоксикації гліклазидом проводили згідно загальноприйнятої практики експериментальної токсикології, а саме шляхом насичення зразка «свіжої» свинячої печінки летальними дозами препарату.

Розрахунок уведених доз токсиканту здійснювали з врахуванням результатів аналізу його суїцидальних передозувань, токсикокінетики та результатів за моделюванням гострої інтоксикації у щурів. У перерахунку на 50 г біологічного об'єкту уведена доза гліклазиду стано-

вила 20 мг. Для ізолювання гліклазиду з біологічного об'єкту використовували ацетонітрильний метод, який застосовується при направленому ХТА на деякі лікарські речовини, в тому числі похідні сульфонілсечовини. Одержаний за даним методом хлороформний екстракт досліджували методом ТШХ. Хроматографічні зони 1 та 2 тонкого шару використовували для ідентифікації гліклазиду, а зону 3 – для очищення 1/3 частини хлороформного екстракту від співекстрактивних речовин.

Встановлено, що після обробки хроматографічних зон 1 та 2 специфічним реагентом 1% розчином ваніліну або 5% розчином хлоралгідрату на хроматограмі ідентифікувались за б

а з метою підтвердження результатів за ідентифікацією гліклазиду та для кількісного визначення токсиканту в хлороформному екстракті метанольний елюат, що одержаний з невробленої проявниками хроматографічної зони 3 тонкого шару, досліджували методом ВЕРХ. Наявність гліклазиду в пробі визначали за параметрами часу утримування токсиканту та спектральними характеристиками.

Встановлено, що час утримування гліклазиду в досліджуваному елюаті співпадає з часом утримування стандартного зразка гліклазиду (рис. 1) та складає 7.80 хв (RSD=0.13%).

П  
Л  
Я  
М  
И  
  
(  
С  
И  
Н  
Є  
  
Т  
А  
  
К  
О  
Р  
И  
Ч  
  
Н  
Е  
В  
В  
Е  
  
І  
Д  
П  
О  
В  
І  
Д  
Н  
О

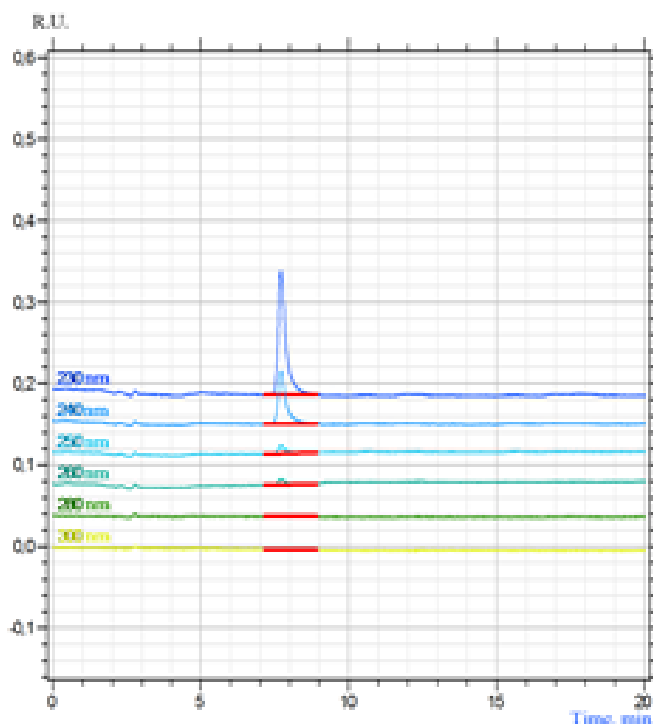


Рис. 1. Хроматограма стандартного зразка гліклазиду.

Кількісний вміст гліклазиду визначали за градуовальною залежністю площі піку метанольного розчину стандартного зразка гліклазиду від концентрації (мкг/мл), визначеної за довжини хвилі 230 нм (рис. 2).

Методом найменших квадратів розраховано коефіцієнти регресії градуовального графіка:

$$S = 0.0089 \times C + 0.0001,$$

де  $S$  – площа піку, ум. од.;

$C$  – концентрація речовини, мкг/мл.

Встановлено, що вільний член рівняння градуовального графіка при визначенні значущості істотно не відрізняється від нуля. Це обумовлює перехід рівняння до вигляду:  $y = b \times x$ .

Тому, для визначення концентрації гліклазиду в об'єктах дослідження застосовували рівняння вигляду:

$$S = 0.0089 \times C$$

Лінійність наведеного градуувального графіку в координатах (S, ум. од) - (C, мкг/мл) знаходиться в діапазоні 0.1-20.0 мкг/мл.

Визначено валідаційні характеристики методики: межа виявлення гліклазиду становить 0.050 мкг/мл, межа кількісного визначення - 0.157 мкг/мл.

Методом найменших квадратів розраховано коефіцієнти регресії градуувального графіка:

$$S = 0.0089 \times C + 0.0001, \text{ де}$$

S – площа піку, ум. од.;

C – концентрація речовини, мкг/мл.

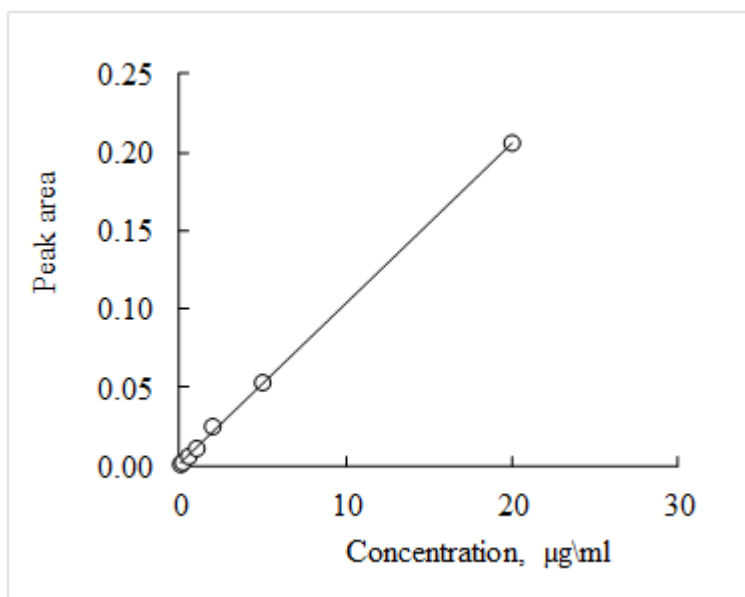


Рис. 2. Графік градуувальної залежності площі піку метанольного розчину стандартного зразка гліклазиду від концентрації

Результати за кількісним визначенням гліклазиду в пробах метанольного елюату, одержаних з тонких шарів, наведено в табл. 1.

Таблиця 1

Результати за кількісним визначенням гліклазиду (n=5, P=0.95)

$\bar{X}$ , мкг/мл	S	$S_{\bar{X}}$	$\Delta\bar{X}$	$\epsilon$	RSD, %
17.48	1.06	$4.74 \times 10^{-1}$	1.32	7.53	6.06

Одержані результати за кількісним визначенням гліклазиду в біологічних об'єктах та розрахований % відносного стандартного відхилення свідчать, що дана методика є придатною для вирішення поставленої задачі.