

СТАНДАРТИЗАЦІЯ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ГЛІКЛАЗИДУ, ПРИЙНЯТНОЇ ДЛЯ АНАЛІТИЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ПЕРЕДОЗУВАНЬ

Мерзлікін С. І.¹⁾, Кучер Т. В.²⁾

¹⁾Національний фармацевтичний університет, м. Харків

²⁾ДВНЗ “Тернопільський державний медичний університет
імені І. Я. Горбачевського МОЗ України”, м. Тернопіль

merzlikinserg07@gmail.com

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. Так, згідно з даними сайтів FDA і *patientsville.com* у багатьох країнах світу в період 2010-2015 рр. зареєстровано близько 600 випадків отруєнь гліклазидом, який є поширеним антидіабетичним засобом для лікування цукрового діабету 2 типу.

Тому метою досліджень становило розробка та стандартизація методики визначення гліклазиду в біологічних об'єктах для аналітичної діагностики летальних передозувань препаратом.

Дослідження 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 LiClO₄ – 0.005 М розчин HClO₄) 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 багатокомпонентного розчину, що складається з бромід-іона, уридину, кофеїну, прозерину, *m*-нітроаніліну, *n*-нітроаніліну і трифтазину.

Методологія досліджень відповідала 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 становила 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 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%). 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.

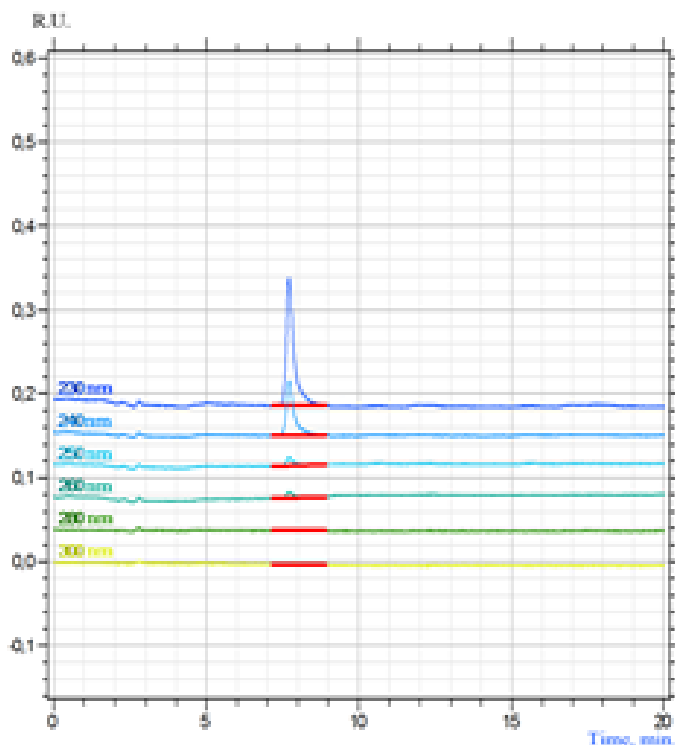


Рис. 1. Хроматограма стандартного зразка гліклазиду

Встановлено, що вільний член рівняння градуувального 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.

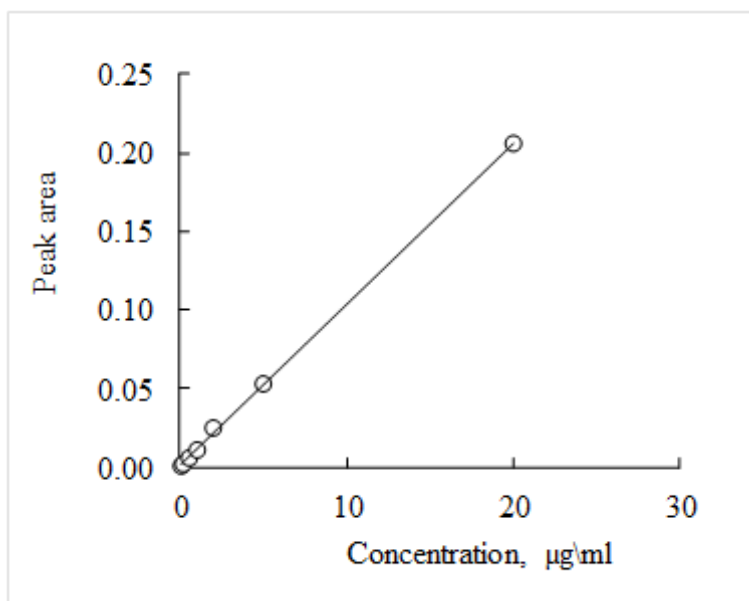


Рис. 2. Графік градуовальної залежності площі піку метанольного розчину стандартного зразка гліклазиду від концентрації

Результати за кількісним визначенням гліклазиду наведено в табл. 1.

Таблиця 1

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

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

Висновки. 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.

Використана література:

1. Кучер Т. В. Идентификация производных сульфонилмочевины цветными реагентами / Т. В. Кучер, С. И. Мерзликин // Фармация Казахстана. – 2014. – № 7. – С. 35-37.
2. Кучер, Т. В. Дослідження розподілу глібенкламіду в органах тварин при моделюванні гострої інтоксикації / Т. В. Кучер, С. І. Мерзлікін, С. Ю. Штриголь // ScienceRise. – 2016. - № 3. – С. 7-12.