

tions of regional thrombolysis, streptokinase (150,000 IU/kg into the tail vein) has a pronounced fibrinolytic effect. The content of the D-dimer in the blood plasma of untreated animals in the acute stage of thrombosis (after 30 minutes) did not change, and the combination of streptokinase and glucosamine hydrochloride statistically significantly reduces it by 38.3%. Glucosamine hydrochloride (50 mg/kg intragastric) does not enhance the thrombolytic effect of streptokinase, but has a beneficial effect on the state of hemostasis. The results experimentally substantiate the feasibility of a combination of streptokinase with glucosamine hydrochloride to improve the quality of thrombolytic therapy for venous thrombosis.

Key words: *glucosamine hydrochloride, regional thrombolysis, acute venous thrombosis.*

УДК 543.544-415.3

РАЗРАБОТКА УСЛОВИЙ ОБНАРУЖЕНИЯ АНТИДИАБЕТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ПРОИЗВОДНЫХ СУЛЬФОНИЛМОЧЕВИНЫ МЕТОДОМ ТСХ

Мерзликін С. І.¹, Кучер Т. В.²

¹*Національний фармацевтичний університет, г. Харків, Україна*

Кафедра лікарственої та аналітичної токсикології

merzlikinserg07@gmail.com

²*ГВУУ «Тернопільський державний медичний університет*

імені І. Я. Горбачевського МЗ України», г. Тернопіль, Україна

Кафедра фармацевтичної хімії

В статье освещены результаты исследований по разработке условий обнаружения глибенкламида, гликлазида и глимепирида методом ТСХ для целей химико-токсикологического анализа. Предложено подвижную фазу состава метиленхлорид-этилацетат-ледяная уксусная кислота (50: 50: 1), которая надежно обеспечивает селективное разделение глибенкламида, гликлазида и глимепирида в тонком слое сорбента. Показана возможность применения высокочувствительных групповых и специфических реагентов для визуализации зон адсорбции исследуемых производных сульфонилмочевины в тонком слое на двух типах хроматографических пластин Merck и Sorbfil. В качестве элюента для элюирования исследуемых веществ из непроявленной зоны адсорбции (для Merck 0,46-0,48 и Sorbfil - 0,40-0,44) предложен метиленхлорид.

Ключевые слова: *химико-токсикологический анализ, антидиабетические средства, производные сульфонилмочевины, отравления, метод ТСХ.*

Введение. Анализ источников литературы [1, 3, 4] и данных веб-сайтов FDA и patientsville.com свидетельствует об увеличении в последние годы количества отравлений антидиабетическими средствами, в частности производными сульфонилмочевины (ПС): глибенкламидом, гликлазидом и глимепиридом.

Так, в период с 2010 по 2012 гг. в мире общее количество зарегистрированных отравлений ПС составляла 1169 случаев, в том числе 66 – смертельных. Соответственно среди них: глибенкламидом – 588 (22 летальных), гликлазидом – 264 (30 летальных) и глимепиридом – 207 (14 летальных) отравлений. Среди главных причин острых отравлений отмечают побочные действия при лечении в терапевтических дозах, тогда как летальные случаи в основном обусловлены преднамеренной (с суицидальной целью) и непреднамеренной передозировкой препаратами в дозах, превышающих терапевтические в несколько раз в зависимости от обстоятельств. Согласно законодательных актов международной судебной практики при отравлении лекарственным веществом для обнаружения и определения токсиканта в объектах биологического происхождения проводятся судебно-токсикологические исследования. Однако, в доступных нам источниках отсутствуют данные о разработанных методах и методиках химико-токсикологического анализа (ХТА) ПС, в том числе по их обнаружению в биологических объектах методом ТСХ. Известно [2, 5], что данный хроматографический метод, как скрининговый, чаще всего применяется на различных этапах ХТА при отравлении лекарственным веществом.

Цель работы – разработка методики обнаружения антидиабетических средств: глибенкламида, гликлазида и глимепирида в тонких слоях сорбента при отравлении.

Методы исследования. Исследования проведены на хроматографических пластинках Merck silica gel 60 F254 (производства Германия) и Sorbfil ПТСХ-II-B (производства РФ) размером 10 × 10 см. Разделительную способность указанных пластин определяли в соответствии методики ГФУ, изд. I. Перед элюированием образцов хроматографические пластинки предварительно отмывали метанолом и активировали в сушильном шкафу при температуре 110-120 °С в течение 0,5 ч.

В качестве подвижных фаз использовали следующие системы растворителей: 1) хлороформ-ацетон (80:20) 2) этилацетат-метанол-25 % раствор аммиака (85: 10: 5) 3) этилацетат; 4) хлороформ-метанол (90:10) 5) хлороформ-этанол (90:10) 6) хлороформ-циклогексан-ледяная уксусная кислота (40:40:20) 7) хлороформ-ацетон (9: 1); 8) метанол-н-бутанол-хлороформ-25 % раствор аммиака (15: 40: 15: 15); 9) толуол-ацетон-метанол-25 % раствор аммиака (50: 20: 10: 2) и 10) толуол-этилацетат-метанол (25: 3: 25). Среди них: системы 1-6 - общие, которые рекомендованы Международной ассоциацией судебных токсикологов (ТИАФТ) и система 7 – общая, которая применяется в практике судебно-токсикологических исследований стран СНГ для ТСХ-скрининга лекарственных веществ кислотного, нейтрального и основного характера; системы 8-10 -

специальные, которые применяются для идентификации лекарственных средств ПС в фармацевтическом анализе и мониторинге сахарного диабета [6-11].

Для визуализации зон адсорбции исследуемых веществ использовали следующие реагенты: железойодидный комплекс, хлорцинкйод, реактив Бушарда, 1 % раствор ванилина, 5 % раствор хлоралгидрата, 12,5 % раствор сульфата меди в щелочной среде, реактив Драгендорфа и серную кислоту [2, 3].

Методика хроматографирования. Стандартную хроматографическую камеру предварительно насыщают парами элюента в течение 30 мин. На линию старта предварительно активированной хроматографической пластинки стеклянным капилляром наносят по 5 мкл (5 мкг) испытуемых растворов глибенкламида, гликлазида, глимепирида и кофеина. Пластинку помещают в камеру с соответствующей смесью растворителей и элюируют. Когда фронт растворителей пройдет 8 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры, высушивают на воздухе, просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм и обрабатывают соответствующими реагентами.

Результаты исследования. Хроматографическую подвижность глибенкламида, гликлазида и глимепирида исследовали в соответствии с методологией ТСХ-скрининга лекарственных веществ [5].

С учетом кислотных свойств ПС (рКа 5,3-6,2) и их растворимости в органических растворителях, в исследованиях использовали общие подвижные фазы (системы 1-7). Они как правило, применяются в судебно-токсикологической практике при отравлении неизвестным веществом для разделения лекарственных веществ кислотного характера в тонком слое по группам с локализацией в соответствующих хроматографических зонах, и специальные (8-10). Для проверки пригодности выбранных систем хроматографирование образцов ПС проводили в присутствии стандартного вещества - кофеина. Подвижность ПС изучали на хроматографических пластинках фирмы Merck, которые для таких целей рекомендуются ТИАФТ и пластинках Sorbfil, которые обычно применяют в подобных случаях в странах СНГ [5]. Для визуализации зон адсорбции ПС использовали предложенные авторами [3] высокочувствительные групповые реагенты: железойодидный комплекс, хлорцинкйод и реактив Бушарда, а для кофеина – последовательную обработку тонкого слоя реактивом Драгендорфа и серной кислотой. Данные исследований приведены в таблице.

Установлено, что исследуемые ПС проявляют удовлетворительную хроматографическую подвижность во всех использованных системах. Однако, при хроматографировании в системах 1, 2, 4-7 адсорбция ПС происходит во второй, четвертой и пятой хроматографических зонах, где в соответствии с данными литературы [5] локализуются токсикологически значимые лекарственные средства производные барбитуровой и салициловой кислот, 1,4-бензодиазепина и пиразолона-5. Наиболее приемлемой для целей ХТА препаратов ПС среди общих подвижных фаз определена система 3.

**ПАРАМЕТРЫ ЗОН АДСОРБЦИИ
ИССЛЕДУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ В ТОНКОМ СЛОЕ**

| Система № * | Значение R_f исследуемых веществ | | | | | | | |
|----------------|------------------------------------|---------|-----------|---------|------------|---------|-----------|---------|
| | Глибенкламид | | Гликлазид | | Глимепирид | | Кофеин ** | |
| | Merck | Sorbfil | Merck | Sorbfil | Merck | Sorbfil | Merck | Sorbfil |
| 1. | 0,38 | 0,40 | 0,36 | 0,43 | 0,35 | 0,42 | 0,20 | 0,30 |
| 2. | 0,09 | 0,13 | 0,08 | 0,12 | 0,10 | 0,14 | 0,57 | 0,52 |
| 3. | 0,47 | 0,42 | 0,48 | 0,44 | 0,46 | 0,40 | 0,15 | 0,13 |
| 4. | 0,61 | 0,70 | 0,62 | 0,67 | 0,57 | 0,68 | 0,57 | 0,54 |
| 5. | 0,58 | 0,67 | 0,58 | 0,67 | 0,56 | 0,69 | 0,56 | 0,54 |
| 6. | 0,60 | 0,70 | 0,62 | 0,73 | 0,59 | 0,71 | 0,18 | 0,26 |
| 7. | 0,13 | 0,11 | 0,14 | 0,10 | 0,12 | 0,10 | 0,24 | 0,21 |
| 8. | 0,63 | 0,66 | 0,65 | 0,68 | 0,60 | 0,67 | 0,78 | 0,76 |
| 9. | 0,33 | 0,36 | 0,35 | 0,37 | 0,34 | 0,36 | 0,52 | 0,50 |
| 10. | 0,80 | 0,82 | 0,78 | 0,78 | 0,81 | 0,82 | 0,74 | 0,73 |

Примечания: * - нумерация систем согласно перечню, приведенного в «условиях хроматографических исследований»; ** - хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограмме четко видно пятно кофеина.

Адсорбция образцов глибенкламида, гликлазида и глимепирида в данных условиях происходит в свободной от вышеупомянутых токсикантов хроматографической зоне (между четвертой и пятой) со значения R_f для Merck 0,46 - 0,48 и Sorbfil - 0,40-0,44. После обработки соответствующих зон вышеупомянутыми групповыми для ПС реагентами, продукты визуализации глибенкламида проявляются коричневым, гликлазида - оранжевым и коричневым, а глимепирида - оранжевым цветом, тогда как при обработке зон адсорбции 12,5% раствором меди сульфата в щелочной среде продукты визуализации ПС проявляются зеленым цветом на синем фоне.

Полученные результаты так же свидетельствуют о том, что после хроматографирования испытуемого образца кофеина в указанных общих подвижных фазах, окраска его пятна (коричневые) на пластинке и значение R_f совпадают с данными источников [2, 5]. Это свидетельствует не только о пригодности использованных хроматографических систем, но и о корреляции между полученными результатами по распределению ПС и данными литературы по распределению токсикантов кислотного, нейтрального и слабоосновного характера в тонком слое по хроматографическим зонам. Следует отметить, что пластинки Sorbfil так же могут быть приемлемыми для элюирования ПС в системах ТИАФТ при проведении ТСХ-скрининговых исследований. В качестве элюента для

элюирования исследуемых ПС из непроявленной зоны адсорбции (для Merck 0,46-0,48 и Sorbfil - 0,40-0,44) предложен метиленхлорид.

Выводы. В результате проведенных исследований подвижную фазу состава метиленхлорид-этилацетат-ледяная уксусная кислота (50: 50: 1) было определено системой растворителей, которая надежно обеспечивает селективное разделение глибенкламида, гликлазида и глимепирида в тонком слое сорбента. Показана возможность применения высокочувствительных групповых и специфических реагентов для визуализации зон адсорбции исследуемых ПС в тонком слое на двух типах хроматографических пластин Merck и Sorbfil. Разработанные условия ТСХ метода для обнаружения глибенкламида, гликлазида и глимепирида могут быть использованы для ХТА биологических объектов при отравлении.

Перечень использованных источников информации:

1. Александров А. А. Сердечно-сосудистые последствия современного алгоритма сахароснижающей терапии: «Флорентийская гипотеза» / А. А. Александров, С. С. Кухаренко, М. Н. Ядрихинская // Сахарный диабет. – 2010. – № 4. – С. 31-37.
2. Крамаренко В. Ф. Токсикологическая химия / В. Ф. Крамаренко – К.: Высшая школа, 1989. – 272с.
3. Кучер Т. В. Идентификация производных сульфонилмочевины цветными реагентами / Т. В. Кучер, С. И. Мерзликин // Фармация Казахстана. – 2014. – № 7. – С. 35-37.
4. Пигарова Е. А. Увеличение общего риска смертности у пациентов с сахарным диабетом 2 типа, получающих глипизид, глибенкламид или глимепирид в сравнении с монотерапией метформином: ретроспективный анализ / Е. А. Пигарова // Ожирение и метаболизм. – 2012. – №4. – С. 58.
5. ТСХ-скрининг токсикологически значимых соединений, изолируемых экстракцией и сорбцией / Г. В. Раменская, Г.М. Родионова, Н.И. Кузнецова [и др.]; под ред. А. П. Арзамасцева. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 240 с.
6. Bhushan R. TLC supplemented by UV spectrophotometry compared with HPLC for separation and determination of some antidiabetic drugs in pharmaceutical preparations / R. Bhushan, D. Gupta, A. Jain // J. Planar Chromatography. – 2006. – Vol. 19. – P. 288-296.
7. British Pharmacopoeia 2009. – Volume I & II. – Monographs: medicinal and pharmaceutical substances. Glibenclamide. – P. 2757-2760.
8. Gumieniczek A. Normal and reversed-phase thin-layer chromatography of seven oral antidiabetic agents / A. Gumieniczek, H. Hopkala, A. Berecka // J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC. – 2003. – Vol. 16. – P. 271-275.

9. Patel J. R. Simultaneous estimation of glimepiride and pioglitazone in bulk and in pharmaceutical formulation by HPTLC method / J. R. Patel, B.N. Suhagia, M. M. Patel // Asian J. Chem. – 2006. – Vol. 18. – P. 2873-2878.
10. Parthiban C. Simultaneous determination and validation of pioglitazone and glimepiride in tablet dosage form by HPTLC method / C. Parthiban, M. Bhagavan Raju, M. Sudhakar // Int. J. Pharm. Pharm. Sci. – 2013. – Vol 5. – P. 619-622.
11. Rezk M. R. Simultaneous determination of pioglitazone and glimepiride in their pharmaceutical formulations / M. R. Rezk, S. 'aM. Riad, G. Y. Mahmoud // Der Pharma Chemica. – 2011. – Vol. 3. – P. 176-184.

РОЗРОБКА УМОВ ВИЯВЛЕННЯ АНТИДІАБЕТИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ ПОХІДНИХ СУЛЬФОНІЛСЕЧОВИНИ МЕТОДОМ ТСХ

Мерзлікін С. І., Кучер Т. В.

У статті висвітлено результати досліджень по розробці умов виявлення глібенкламіду, гліклазиду та глімепіриду методом ТШХ для цілей хіміко-токсикологічного аналізу. Запропоновано рухливу фазу складу метиленхлорид-етілацетат-крижана кислота оцтова (50: 50: 1), яка надійно забезпечує селективне розділення глібенкламіду, гліклазиду та глімепіриду в тонкому шарі сорбенту. Показана можливість застосування високочутливих групових і специфічних реагентів для візуалізації зон адсорбції досліджуваних похідних сульфонілсечовини в тонкому шарі на двох типах хроматографічних пластин Merck і Sorbfil. Як елюент для елюювання досліджуваних речовин з непроявленої зони адсорбції (для Merck 0,46-0,48 і Sorbfil - 0,40-0,44) запропонований метиленхлорид.

***Ключові слова:** хіміко-токсикологічний аналіз, антидіабетичні засоби, похідні сульфонілсечовини, отруєння, метод ТШХ.*

DEVELOPMENT OF CONDITIONS FOR DETECTION OF ANTIDIABETIC DRUGS OF SULFONYL UREA DERIVATIVES BY TLC METHOD

Merzlikin S. I., Kucher T. V.

The article highlights the results of studies on the development of conditions for the detection of glibenclamide, glyclazide and glimepiride by TLC for the purpose of chemical toxicological analysis. A mobile phase of the composition methylene chloride-ethyl acetate-glacial acetic acid (50: 50: 1) is proposed, which reliably provides selective separation of glibenclamide, glyclazide and glimepiride in a thin sorbent layer. The possibility of using highly sensitive group and specific reagents to

visualize the adsorption zones of the studied sulfonylurea derivatives in a thin layer on two types of Merck and Sorbfil chromatographic plates is shown. Methylene chloride was proposed as an eluent for the elution of the test substances from the undeveloped adsorption zone (for Merck 0.46-0.48 and Sorbfil 0.40-0.44).

Key words: *chemical-toxicological analysis, antidiabetic drug, sulphonylurea derivatives, poisoning, TLC.*

УДК 615.322: 615.015.35: 576.08: 612.086.2

**ДОСЛІДЖЕННЯ ТОКСИЧНОСТІ СУХОГО ЕКСТРАКТУ ІЗ ТРАВИ
ЖОРЖИНИ СОРТА KEN'S FLAME НА МОДЕЛІ КЛІТИН ЧЕРВОНОГО
КІСТКОВОГО МОЗКУ ЩУРІВ *IN VITRO***

Шакіна Л. О., Малоштан Л. М.

Національний фармацевтичний університет, м Харків, Україна

Кафедра фізіології та анатомії людини

lyubovz2003@gmail.com

Мета. Визначення наявності і вираженості базової цитотоксичної активності водних розчинів екстракту, отриманого з трави жоржини сорту *Ken's Flame*, на моделі клітин червоного кісткового мозку щурів *in vitro*.

Матеріали та методи. Експериментальне дослідження сухого екстракту з трави жоржини сорту *Ken's Flame* проведено з використанням нативних клітин червоного кісткового мозку щурів. Досліджували екстракт в концентрації 1%; 0,5%; 0,25%; 0,125%; 0,0625% при експозиції 15, 45, 90 хвилин. Для визначення життєздатності клітин використовували метод мікроскопії після фарбування розчином трипанового синього. Відмінності вважали достовірними при $p < 0,05$.

Результати. Розчин сухого екстракту з трави жоржини в концентрації 0,063% не чинить істотного ефекту на життєздатність клітин червоного кісткового мозку щурів у всіх вивчених експозиціях і є потенційно не токсичним. В концентраціях 0,125 – 1,00 % розчин сухого екстракту з трави жоржини володіє базовим цитотоксичним ефектом, величина якого залежить від експозиції.

Висновки. Цитотоксичність досліджуваного екстракту, отриманого з трави жоржини сорту *Ken's Flame*, носить дозо- і часозалежний характер.

Ключові слова: *сухий екстракт, жоржина, трава, антоціани, цитотоксична дія.*

Вступ. Антоціани – фенольні речовини групи флавоноїдів, що забарвлюють плоди, листя і пелюстки рослин у кольори від рожевого до чорнофіолетового та мають широкий спектр біологічної активності. Актуальною проблемою сучасної фармації є пошук перспективних рослин з високим вмістом антоціанів для створення рослинних лікарських засобів на їх основі. Науковий інтерес представляють рослини роду жоржини з сімейства Айстрові