

УДК 615.252.349.7:340.67:54.056:543.422.6:543.544.42

В. Ю. Москаленко, С. І. Мерзлікін

*Національний фармацевтичний університет***ІЗОЛЮВАННЯ МЕТФОРМІНУ З БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТІВ**

Досліджено залежність ступеня екстракції метформіну з біологічних об'єктів від умов ізолювання, природи об'єкта та методу кількісного визначення препарату в одержаних екстрактах. Визначені найприйнятніші умови ізолювання метформіну та біологічні об'єкти для судово-токсикологічних досліджень на токсикант невстановленої будови.

Ключові слова: метформін; ізолювання з печінки, сечі та крові; екстракція; УФ-спектроскопія; високо-ефективна рідинна хроматографія; екстракційна фотометрія

ВСТУП

Антидіабетичний засіб Метформін (Сіофор, Глюкофаг, Diformin, Diguanid та ін.) є основою сучасної фармакотерапевтичної схеми лікування цукрового діабету 2 типу [3]. Його призначають в індивідуальному вигляді та в комбінації з іншими антидіабетичними агентами, що підвищують секрецію ендogenous інсуліну [1, 6, 8, 9-11]. Довічне застосування, побічні дії, доступність в аптечній мережі, постійно зростаюча кількість пацієнтів на діабет (близько 260 млн осіб у світі) – це фактори токсикологічної небезпеки неконтрольованого застосування метформіну, про що свідчить проведений інформаційний огляд щодо гострих отруєнь препаратом [4], а також випадок отруєння метформіном у практиці Республіканського бюро судово-медичної експертизи МОЗ Республіки Татарстан, м. Казань [2]. Проте, у доступних нам джерелах літератури відсутні дані про систематичні судово-токсикологічні дослідження на метформін, у тому числі ефективні методи його ізолювання з біологічних об'єктів.

Мета роботи – дослідження залежності ступеня екстракції метформіну з біологічних об'єктів від умов ізолювання, природи об'єкта та методу кількісного визначення препарату в одержаних екстрактах.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Як об'єкти дослідження використовували робочий стандартний зразок (РСЗ) метформіну г/х (субстанція, монографія EP 01/2005: 0931, виробник Nippon Finocem Ltd., серія № 051121), зразки печінки тваринного походження (свинячої), модельні зразки донорської сечі та крові.

Методика насичення печінки метформіном. Для дослідження *in vitro* близько 50,0 г печінки гомогенізують у гомогенізаторі при 4 °С у 5-ти кратному

об'ємі розчину для гомогенізації (250 мМ сахароза, 20 мМ трисамінометан, 1 мМ ЕДТА, рН розчину 7,4). До 10,0 г подрібненого біологічного матеріалу додають 1,0 мл водного розчину метформіну г/х (1000,0 мкг) та інкубаційну суміш для підтримки активності печінкових ферментів (120 мМ КСІ, 20 мМ трисамінометану, рН розчину 7,4). Дану суміш ретельно перемішують та залишають на добу в термостаті при температурі 37 °С. Паралельно проводять контрольний дослід. Через добу модельні суміші використовують для ізолювання метформіну в різних умовах.

Методика ізолювання метформіну підкисленою водою (модифікація методу О. О. Васильєвої). Одержану модельну суміш біологічного матеріалу вміщують у колбу місткістю 50,0 мл, додають 20,0 мл води, підкисленої насиченим водним розчином кислоти оксалатної до рН 2-3 за універсальним індикатором, та залишають суміш на 2 год при періодичному перемішуванні. Одержане водне вилучення зливають з біологічного матеріалу. Дану операцію повторюють двічі. Одержані водні вилучення об'єднують, проціджують через подвійний шар марлі та центрифугують (3-5 тис. об./хв). Надосадову рідину (центрифугат) переносять у ділильну лійку та тричі по 5,0 мл екстрагують кожного разу новими порціями діетилового ефіру. Одержані ефірні екстракти об'єднують та у подальшому не досліджують.

Кислий водний шар, який залишився у ділильній лійці, підлужують 5 М розчином NaOH до рН 9 та тричі по 5,0 мл екстрагують кожного разу новими порціями хлороформу. Одержані хлороформні екстракти об'єднують та у подальшому не досліджують. Лужний водний шар, який залишився у ділильній лійці, підлужують 5 М розчином NaOH до рН 13, 5,0 мл 25 % розчину NaCl та тричі по 5,0 мл екстрагують кожного разу новими порціями суміші ізоаміловий спирт-бутанол (1:1). Одержані спиртові екстракти об'єднують, фільтрують через паперовий фільтр «синя стріч-

© Москаленко В. Ю., Мерзлікін С. І., 2013

ка» та натрію сульфат безводний (5,0 г на фільтрі), упарюють до сухого залишку в потоці холодного повітря та проводять подальші дослідження за визначенням кількісного вмісту.

Методика ізолювання метформіну підкисленим етанолом (модифікація методу Стаса-Отто). Одержану модельну суміш біологічного матеріалу вміщують у колбу місткістю 50,0 мл, додають 20,0 мл етанолу, підкисленого кислотою оксалатною до рН 2-3 за універсальним індикатором і залишають суміш на 15-20 хв при частому перемішуванні. Перевіряють рН суміші універсальним індикатором та при необхідності підкислюють до рН 2-3. Колбу з вмістом встановлюють на електрострушувач на добу. Перевіряють рН середовища, з біологічного матеріалу зливають спиртове вилучення та у колбу з біологічним матеріалом заливають нову порцію етанолу, підкисленого кислотою оксалатною до рН 2-3, і залишають на добу. Дану операцію повторюють ще раз (всього тричі) з контролем рН середовища. Спиртові вилучення об'єднують, центрифугують впродовж 15 хв (3-5 тис. об./хв), центрифугати переносять у порцелянові чашки та випаровують на водяній бані при Т 35-40 °С до густини сиропу. Проводять осадження білків абсолютним етанолом до повного припинення випадання осаду, додають 25,0 мл води очищеної, а одержані вилучення центрифугують (3-5 тис. об./хв) впродовж 10 хв. Центрифугати переносять у ділильну лійку і тричі по 5,0 мл екстрагують кожного разу новими порціями діетилового ефіру. Одержані ефірні екстракти об'єднують та у подальшому не досліджують.

Кислий водний шар, який залишився у ділильній лійці, підлужують 5 М розчином NaOH до рН 9 і тричі по 5,0 мл екстрагують кожного разу новими порціями хлороформу. Одержані хлороформні екстракти об'єднують та у подальшому не досліджують. Лужний водний шар, який залишився у ділильній лійці, підлужують 5 М розчином NaOH до рН 13, додають 5,0 мл 25 % розчину NaCl та тричі по 5,0 мл екстрагують кожного разу новими порціями суміші ізоамілового спирт-бутанол (1:1). Одержані спиртові екстракти об'єднують, фільтрують через паперовий фільтр «синя стрічка» та натрію сульфат безводний (5,0 г на фільтрі), упарюють до сухого залишку в потоці холодного повітря та проводять подальші дослідження за визначенням кількісного вмісту.

Методика ізолювання метформіну з сечі. До 10,0 мл модельного зразка донорської сечі, який містить 100,0 мкг метформіну г/х, додають 0,1 М розчин HCl до рН 2 та у ділильній лійці екстрагують тричі по 5,0 мл кожного разу новими порціями діетилового ефіру. Ефірні екстракти відокремлюють та у подальшому не досліджують.

Кислий водний шар, який залишився у ділильній лійці, підлужують 5 М розчином NaOH до рН 9 та тричі по 5,0 мл екстрагують кожного разу новими

порціями хлороформу. Одержані хлороформні екстракти об'єднують та у подальшому не досліджують. Лужний водний шар, який залишився у ділильній лійці, підлужують 5 М розчину NaOH до рН 13, додають 5,0 мл 25 % розчину NaCl та тричі по 5,0 мл екстрагують кожного разу новими порціями суміші ізоамілового спирт-бутанол (1:1). Одержані спиртові екстракти об'єднують, фільтрують через паперовий фільтр «синя стрічка» та натрію сульфат безводний (5,0 г на фільтрі), упарюють до сухого залишку в потоці холодного повітря та проводять подальші дослідження за визначенням кількісного вмісту.

Методика ізолювання метформіну з крові. До 10,0 мл модельного зразка донорської сечі, який містить 100,0 мкг метформіну г/х, додають 5 мл 10 % водного розчину кислоти трихлороацетатної до рН 2, перемішують та залишають на годину при постійному перемішуванні. Суміш центрифугують протягом 5 хв при 5000 об./хв, зливають надосадову рідину та тричі екстрагують діетиловим ефіром кожного разу новими порціями по 5 мл. Ефірні екстракти відокремлюють та в подальшому не досліджують.

Кислий водний шар, який залишився у ділильній лійці, підлужують 5 М розчином NaOH до рН 9 і тричі екстрагують кожного разу новими порціями хлороформу по 5 мл (при утворенні стійких емульсій застосовують центрифугування протягом 5 хв при 5000 об./хв). Хлороформні екстракти об'єднують та у подальшому не досліджують.

Лужний водний шар, який залишився у ділильній лійці, підлужують 5 М розчином NaOH до рН 13, додають 5,0 мл 25 % розчину NaCl та тричі по 5,0 мл екстрагують кожного разу новими порціями суміші ізоамілового спирт-бутанол (1:1). Одержані екстракти об'єднують, фільтрують через паперовий фільтр «синя стрічка» та натрію сульфат безводний (5,0 г на фільтрі), упарюють до сухого залишку в потоці холодного повітря та проводять подальші дослідження за визначенням кількісного вмісту.

Методика спектрофотометричного визначення метформіну.

Приготування випробуваного розчину. Сухий залишок метформіну, одержаний після ізолювання з біологічного об'єкту, розчиняють у 10,0 мл метанолу і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 200,0 мл (розчин 1). 2,0 мл розчину 1 переносять у мірну колбу, додають 10,0 мл метанолу і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100,0 мл (розчин 2). 2,5 мл розчину 2 переносять у мірну колбу і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10,0 мл (розчин 3).

Приготування розчину РСЗ метформіну г/х. 250,0 мг РСЗ метформіну г/х розчиняють у 10,0 мл метанолу і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 200,0 мл (розчин 1). 2,0 мл розчину 1 переносять у мірну колбу, додають 10,0 мл метанолу і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100,0 мл

РЕЗУЛЬТАТИ ІЗОЛЮВАННЯ МЕТФОРМІНУ З ТКАНИН ПЕЧІНКИ

Ізолювання	Внесено речовини, мкг	Виділено речовини					
		УФ-спектрофотометрія		ВЕРХ		екстракційна спектрофотометрія	
		мкг	%	мкг	%	мкг	%
Підкисленою водою (модифікація методу О.О. Васильєвої)	1000,0	710	71,0	648	64,8	650	72,0
	1000,0	612	61,2	725	72,5	720	65,0
	1000,0	634	63,4	630	63,0	715	71,5
	1000,0	715	71,5	648	64,8	678	67,8
	1000,0	654	65,4	716	71,6	643	64,3
Підкисленим етанолом (модифікація методу Стаса-Отто)	1000,0	446	44,6	492	49,2	505	50,5
	1000,0	438	43,8	502	50,2	426	42,6
	1000,0	497	49,7	439	43,9	452	45,2
	1000,0	490	49,0	464	46,4	489	48,9
	1000,0	483	48,3	445	44,5	475	47,5

(розчин 2). 2,5 мл розчину 2 переносять у мірну колбу і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10,0 мл (розчин 3).

Оптичну густину випробуваного розчину метформіну вимірюють за довжини хвилі 236 ± 2 нм. Як розчин порівняння використовують водний розчин РСЗ метформіну г/х (концентрація речовини 6,25 мкг), прилад спектрофотометр СФ-46 ЛОМО модифікований.

Методика проведення високоефективної рідинної хроматографії. Кількісне визначення метформіну в одержаних екстрактах з біологічних об'єктів проводять за методикою [5].

Методика екстракційно-фотометричного визначення метформіну. Сухий залишок метформіну, одержаний після ізолювання з біологічного об'єкту, розчиняють у 10,0 мл води дистильованої. У ділительну лійку вносять 5,0 мл фосфатного буферного розчину (рН 7,8), 5,0 мл 0,02 % розчину бромтимолового синього, 5,0 мл розчину метформіну, одержаного після ізолювання, та 10,0 мл метиленхлориду. Суміш струшують протягом 5 хв на механічному струшувачі та залишають на 10 хв для розділення шарів. Збирають 8,0 мл органічного шару, відкидаючи перші та останні порції (до 1 мл), додають 2,0 мл 25 % розчину тетрабутиламонію гідроксиду в метанолі, ретельно перемішують та вимірюють оптичну густину одержаного розчину на КФК-2 в кюветі завтовшки 5 мм за довжини хвилі 630 нм.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При хіміко-токсикологічному аналізі на токсикант невстановленої будови для ізолювання лікарських речовин із біологічних об'єктів застосовують загальні методи, які включають рідинно-рідинну екстракцію речовин хлороформом та діетиловим ефіром в залежності від їх фізико-хімічних властивостей та рН середовища водного вилучення [7]. Зважаючи на високі гідрофільні властивості метформіну, ми модифікували умови загальних методів ізолювання лікарських речовин (Стаса-Отто та О. О. Васильєвої).

Тобто після екстрагування токсикантів з лужного середовища при рН 9 хлороформом запропоновано водний шар додатково підлужити до рН 13, а подальшу екстракцію метформіну проводити сумішню ізоаміловий спирт-бутанол (1:1) у присутності 25 % розчину NaCl. Для кількісного визначення метформіну в одержаних екстрактах використовували методи: спектрофотометричний, екстракційно-фотометричний та ВЕРХ.

Результати ізолювання метформіну з тканин печінки модифікованими методами наведені у табл. 1.

За результатами табл. 1 встановлено, що в умовах використання модифікованого методу О. О. Васильєвої з тканин печінки у середньому ізолюється до 67 % метформіну, тоді як при ізолюванні модифікованим методом Стаса-Отто – до 45 %. Середній показник відносного стандартного відхилення кількісного визначення застосованими методами не перевищує 7,0 %, а розбіжність результатів між методами є незначною.

Метрологічні характеристики результатів кількісного визначення метформіну в одержаних екстрактах наведені у табл. 2.

Для виділення метформіну з біологічних рідин (крові і сечі) застосовували аналогічну методику щодо ізолювання препарату з тканин печінки підкисленою водою (модифікація методу О. О. Васильєвої). Результати досліджень наведені у табл. 3.

За результатами табл. 3 встановлено, що із модельного зразка сечі виділено у середньому до 72 % метформіну, тоді як із модельного зразка крові – до 53 %. Зниження ступеня екстракції в останньому випадку обумовлено втратами метформіну при осадженні із крові білків, оскільки препарат активно з ними зв'язується.

У табл. 4 наведені результати кількісного визначення метформіну в одержаних екстрактах з біорідин різними методами.

Як видно з результатів табл. 4, середній показник відносного стандартного відхилення при ви-

Таблиця 2

МЕТРОЛОГІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ РЕЗУЛЬТАТІВ ІЗОЛЮВАННЯ МЕТФОРМІНУ З ТКАНИН ПЕЧІНКИ

Метод визначення	Метрологічні характеристики					
	\bar{X}	S	$S_{\bar{x}}$	$\Delta\bar{X}$	ϵ	RSD, %
При ізолюванні підкисленою водою						
УФ-спектроскопія	655	45,86	0,03	127,51	19,2	6,9
ВЕРХ	673,4	43,73	0,03	121,58	18,0	6,5
Екстракційна фотометрія	681,2	35,67	0,02	99,17	14,56	5,2
При ізолюванні підкисленим етанолом						
УФ-спектроскопія	470,8	26,90	0,02	74,78	15,88	5,7
ВЕРХ	468,4	27,91	0,03	77,61	16,57	5,9
Екстракційна фотометрія	469,4	31,10	0,03	86,46	18,42	6,6

Примітка: критерій Стьюдента при P=95 % становить $t(P, v)=2,78$; n=5, v=4.

Таблиця 3

РЕЗУЛЬТАТИ ІЗОЛЮВАННЯ МЕТФОРМІНУ З БІОЛОГІЧНИХ РІДИН

Біологічна рідина	Внесено речовини, мкг	Виділені речовини					
		УФ-спектрофотометрія		ВЕРХ		екстракційна спектрофотометрія	
		мкг	%	мкг	%	мкг	%
Сеча	100,0	69,0	69,0	81,6	81,6	69,0	69,0
	100,0	66,2	66,2	71,2	71,2	71,6	71,6
	100,0	71,5	71,5	68,3	68,3	75,5	75,5
	100,0	68,3	68,3	73,3	73,3	73,1	73,1
	100,0	75,5	75,5	76,0	76,0	72,0	72,0
Кров	100,0	48,8	48,8	50,1	50,1	51,6	51,6
	100,0	51,4	51,4	56,6	56,6	50,2	50,2
	100,0	49,7	49,7	53,8	53,8	57,5	57,5
	100,0	54,0	54,0	59,2	59,2	53,0	53,0
	100,0	53,6	53,6	58,7	58,7	55,8	55,8

Таблиця 4

МЕТРОЛОГІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ РЕЗУЛЬТАТІВ ІЗОЛЮВАННЯ МЕТФОРМІНУ З БІОЛОГІЧНИХ РІДИН

Метод визначення	Метрологічні характеристики					
	\bar{X}	S	$S_{\bar{x}}$	$\Delta\bar{X}$	ϵ	RSD, %
При ізолюванні з сечі						
УФ-спектроскопія	70,1	3,56	0,02	9,90	14,13	5,08
ВЕРХ	74,08	5,06	0,03	6,29	19,00	6,8
Екстракційна фотометрія	72,24	2,36	0,01	6,56	9,09	3,3
При ізолюванні з крові						
УФ-спектроскопія	51,5	2,30	0,02	2,82	14,42	4,5
ВЕРХ	55,68	3,77	0,03	4,69	18,85	6,7
Екстракційна фотометрія	53,62	2,99	0,02	3,72	15,54	5,6

Примітка: критерій Стьюдента при P=95 % становить $t(P, v)=2,78$; n=5, v=4.

значенні не перевищує 7,0 %. При цьому розбіжність результатів за використаними методами є незначною.

ВИСНОВКИ

Таким чином, одержані результати свідчать про переважне застосування модифікованого методу

О. О. Васильєвої для ізолювання метформіну з тканин печінки у судово-токсикологічних дослідженнях на токсикант невстановленої будови. Запропоновані умови ізолювання метформіну з біорідин також є прийнятними для зазначених цілей. Проте з модельного зразка сечі метформін екстрагується з більш високим показником. Прийнятними також були ви-

користанні інструментальні методи аналізу для визначення кількісного вмісту метформіну в одержаних екстрактах.

**ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ
ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ**

1. Аметов А. С. Эффективность и безопасность перевода больных сахарным диабетом 2 типа, не полностью контролируемых монотерапией метформином, на комбинированную терапию метформином и Диабетоном МВ / А. С. Аметов, Л. Н. Богданова // Сахарный диабет. – 2009. – № 4. – С. 68-71.
2. Изолирование метформина из биологического материала и его идентификация / Р. Г. Мансурова, Н. В. Кубасова, З. А. Газизова // Судебно-мед. журн. – 2010. – № 1. – С. 5.
3. Кондратьева Л. В. Метформин – испытание временем / Л. В. Кондратьева // Рус. мед. журн. Эндокринолог. – 2007. – Т. 15, № 27. – С. 2098.
4. Мерзлікін С. І. Інформаційний огляд щодо обґрунтування хіміко-токсикологічного дослідження на метформін / С. І. Мерзлікін, В. Ю. Москаленко // Фармакол. та лікарська токсикол. – 2010. – № 1-2 (14-15). – С. 3-10.
5. Москаленко В. Ю. Розробка умов рідинної хроматографії для хіміко-токсикологічного аналізу метформіну / В. Ю. Москаленко, С. І. Мерзлікін // Запорожский мед. журн. – 2011. – Т. 13, № 3. – С. 86-88.
6. Смирнова О. М. Преимущества комбинированной терапии в лечении сахарного диабета 2 типа / О. М. Смирнова // Фарматека. – 2008. – № 3. – С. 48-51.
7. Токсикологическая химия: учеб. / Т. Х. Вергейчик; под ред. проф. Е. Н. Вергейчика. – М.: МЕДпресс-информ, 2009. – 400 с.
8. Belsey J. Glycaemic control and adverse events in patients with type 2 diabetes treated with metformin + sulfonylure: a meta-analysis / J. Belsey, G. Krishnarajah // Diabetes Obesity Metabolism. – 2008. – Vol. 10, suppl. 1. – P. 1-7.
9. Carbonell B. Long-term efficacy and tolerability of add-on pioglitazone therapy to falling monotherapy compared with addition of gliclazide or metformin in patients with type 2 diabetes / [Carbonell B., Scherthaner G., Brunetti P. et al.] // Diabetol. – 2005. – № 48. – P. 1093-1094.
10. Metformin-glibenclamide versus metformin plus rosglitazone in patients with type 2 diabetes inadequately controlled on metformin monotherapy / [A. Garber, E. Klein, S. Bruce et. al.] // Diabetes Obesity Metabolism. – 2006. – № 8. – P. 156-163.
11. Scheen A. J. Drug interactions of clinical importance with antihyperglycaemic agents: an update / A. J. Scheen // Drug Safety. – 2005. – № 28. – P. 601-631.

УДК 615.252.349.7:340.67:54.056:543.422.6:543.544.42

В. Ю. Москаленко, С. І. Мерзликін

ИЗОЛИРОВАНИЕ МЕТФОРМИНА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Исследована зависимость степени экстракции метформина из биологических объектов от условий изолирования, природы объекта и метода количественного определения препарата в полученных экстрактах. Определены наиболее приемлемые условия изолирования метформина и биологические объекты для судебно-токсикологических исследований на токсикант неизвестной структуры.

Ключевые слова: метформин; изолирование из печени, мочи и крови; экстракция; УФ-спектроскопия; высокоэффективная жидкостная хроматография; экстракционная фотометрия

UDC 615.252.349.7:340.67:54.056:543.422.6:543.544.42

V. Yu. Moskalenko, S. I. Merzlikin

ISOLATION OF METFORMIN FROM BIOLOGICAL OBJECTS

The dependence of the extraction degree of metformin from biological objects on isolation conditions, nature of the object and the method of quantitative determination of the drug in the extracts received has been researched. The most acceptable conditions of metformin isolating and biological objects for forensic toxicology research of unknown toxicant structure have been identified.

Key words: metformin; isolation from the liver, urine and blood; extraction; UV-spectroscopy; high-performance liquid chromatography; extractive photometry

Адреса для листування:
61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.
Національний фармацевтичний університет,
кафедра токсикологічної хімії.
Тел.: (0572) 67-91-92, тел./факс (057) 714-25-40,
моб. тел.: 8-096-734-78-93. E-mail: diacamph@mail.ru.

Надійшла до редакції:
15.11.2013 р.