

УДК 615.07:615.252.349.7:615.099:54.061:543.544

Т. В. КУЧЕР, С. І. МЕРЗЛІКІН

*Національний фармацевтичний університет, м. Харків***ВИБІР ТА СТАНДАРТИЗАЦІЯ УМОВ СЕЛЕКТИВНОГО РОЗДІЛЕННЯ ГЛІБЕНКЛАМІДУ, ГЛІКЛАЗИДУ ТА ГЛІМЕПІРИДУ В ТОНКОМУ ШАРІ СОРБЕНТУ**

*У статті висвітлено результати досліджень щодо вибору та стандартизації умов селективного розділення глібенкламиду, гліклазиду та глімепіриду у тонкому шарі сорбенту. Одержані результати є підставою для опрацювання запропонованих умов на вилученнях з біологічних об'єктів при отруєнні даними антидіабетичними засобами.*

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

**ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ**

Проведений аналіз джерел літератури [1, 3, 4] та даних веб-сайтів FDA і patientsville.com свідчить про збільшення в останні роки кількості отруєнь антидіабетичними засобами, зокрема похідними сульфонілсечовини (ПСС): глібенкламідом, гліклазидом та глімепіридом. Так, у період з 2010 по 2012 рр. в світі загальна кількість зареєстрованих отруєнь ПСС складала 1169 випадків, у тому числі 66 – летальних. Відповідно серед них: глібенкламідом – 588 (22 летальних), гліклазидом – 264 (30 летальних) та глімепіридом – 207 (14 летальних) отруєнь. Найбільша кількість зареєстрованих отруєнь даними засобами спостерігається у США, що пояснюється доступністю до бази даних FDA та поширенням, особливо в останні роки, їх застосуванням. Високий показник отруєнь у країнах Західної Європи пов'язаний зі «старінням нації», яке, у свою чергу, обумовлене збільшенням кількості хворих на цукровий діабет (ЦД) 2 типу серед пацієнтів похилого віку. За умов реєстрації всіх випадків отруєнь препаратами ПСС в інших країнах, зокрема в Україні, їх кількість може бути значно більшою. Серед головних причин гострих отруєнь відзначають побічні дії ПСС під час лікування у терапевтичних дозах, тоді як летальні випадки в основному обумовлені навмисним (з суїцидальною метою) та ненавмисним передозуванням препаратами у дозах, які перевищують

терапевтичні в декілька разів у залежності від обставин.

**АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ**

Відповідно законодавчих актів міжнародної судової практики при отруєнні хімічною речовиною для виявлення та визначення токсиканту в об'єктах біологічного походження та речових доказах отруєння проводяться судово-токсикологічні дослідження. Проте, в доступних нам джерелах відсутні дані стосовно розроблених методів та методик хіміко-токсикологічного аналізу (ХТА) препаратів ПСС, у тому числі за їх виявленням в біологічних об'єктах методом ТШХ. Відомо [2, 5], що даний хроматографічний метод, як скринінговий, застосовується на попередніх етапах ненаправленого ХТА при отруєнні невідомою речовиною, а також направленого ХТА при отруєнні конкретною лікарською речовиною. Метод ТШХ-скринінгу у короткий термін дозволяє виявити та ідентифікувати токсикант серед певної кількості сполук, які підлягають токсикологічному дослідженню, та зорієнтувати експерта у складанні схеми подальшого ХТА. Але при ізолюванні токсикантів з біологічних об'єктів одержані вилучення, як правило, забруднені ендogenousними та екзогенними домішками, зокрема білкової природи та певною кількістю хімічних речовин відповідно. Їх присутність у вилученнях, безумовно, буде впливати на хроматографічну рухливість дослі-

© Кучер Т. В., Мерзлікін С. І., 2015

джуваних речовин у тонкому шарі, що обґрунтовує необхідність проведення даних ТШХ досліджень у стандартизованих умовах.

### ФОРМУВАННЯ ЦІЛЕЙ СТАТТІ

Тому, метою роботи є підбір та стандартизації умов селективного розділення глібенкламід, гліклазиду та глімепіриду у тонкому шарі сорбенту для ХТА біологічних об'єктів та речових доказів отруєння даними антидіабетичними засобами.

*Об'єкти дослідження:* робочі стандартні зразки (РСЗ) глібенкламід (субстанція, виробник Cadila Pharmaceuticals Limited, Індія), гліклазиду (субстанція, виробник Shandong Keyuan Pharmaceutical Co. Ltd., Китай), глімепіриду (субстанція, виробник Sharon Bio-Medicine Ltd, Індія) та кофеїну (субстанція, виробник Shandong Xinhua Pharmaceutical Co. Ltd, Китай).

*Методика приготування випробуваних розчинів глібенкламід та глімепіриду.* Близько 10,0 мг (точна наважка) РСЗ відповідної речовини поміщають у мірну колбу об'ємом 10 мл, розчиняють у 5,0 мл суміші метанол-метиленхлорид (1:1) та доводять об'єм розчину тією самою сумішшю розчинників до мітки.

*Методика приготування випробуваного розчину гліклазиду.* Близько 10,0 мг (точна наважка) РСЗ гліклазиду поміщають у мірну колбу об'ємом 10 мл, розчиняють у 5,0 мл хлороформу та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до мітки.

*Методика приготування розчину кофеїну.* Близько 10,0 мг (точна наважка) РСЗ кофеїну поміщають у мірну колбу об'ємом 10 мл, розчиняють у 5,0 мл води дистильованої гарячої та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до мітки.

*Умови хроматографічних досліджень.* Дослідження проводили на хроматографічних пластинках Merck silica gel 60 F<sub>254</sub> (виробництва Німеччина) та Sorbfil ПТСХ-П-В (виробництва РФ) розміром 10 10 см. Розділювальну здатність зазначених пластин визначали відповідно методики ДФУ (вид.1., розд. 4.1.1.). Перед елюванням зразків хроматографічні пластинки попередньо відмивали метанолом та активували у сушильній шафі при температурі 110-120 °С протягом 0,5 год.

Як рухомі фази використовували такі системи розчинників: 1) хлороформ-ацетон (80:20); 2) етилацетат-метанол-25% розчин амоніаку (85:10:5); 3) етилацетат; 4) хлороформ-метанол (90:10); 5) хлороформ-етанол (90:10); 6) хлороформ-циклогексан-кислота ацетатна льодяна

(40:40:20); 7) хлороформ-ацетон (9:1); 8) метанол-*n*-бутанол-хлороформ-25% розчин амоніаку (15:40:15:15); 9) толуен-ацетон-метанол-25% розчин амоніаку (50:20:10:2); 10) толуен-етилацетат-метанол (25:3:25); 11) хлороформ-толуен-кислота ацетатна льодяна-етанол (45:45:10:10); 12) толуен-етилацетат-метанол (50:45:5); 13) толуен-етилацетат-метанол-кислота ацетатна льодяна (70:15:10:5); 14) етанол-кислота ацетатна льодяна-циклогексан-метиленхлорид (5:5:45:45); 15) ацетон-бензен-кислота ацетатна льодяна (45:5:1); 16) хлороформ-етилацетат-кислота ацетатна льодяна (50:50:1); 17) етилацетат-кислота ацетатна льодяна (49,5:0,5); 18) метиленхлорид-етилацетат-кислота ацетатна льодяна (50:50:1). Серед них: системи 1-6 – загальні системи, які рекомендовані Міжнародною асоціацією судових токсикологів (ТІАФТ) та система 7 – загальна система, яка застосовується у практиці судово-токсикологічних досліджень країн СНД для ТШХ-скринінгу лікарських речовин кислотного, нейтрального та основного характеру; системи 8-16 – спеціальні системи, які застосовуються для ідентифікації лікарських засобів ПСС у фармацевтичному аналізі та моніторингу ЦД [6-11], а також системи 17 та 18, котрі запропоновані авторами.

Для візуалізації зон адсорбції досліджуваних речовин використовували такі реагенти: залізоїодидний комплекс, хлорцинкйод, реактив Бушарда, 1 % розчин ваніліну, 5 % розчин хлоралгідрату, 12,5 % розчин міді сульфату в лужному середовищі, реактив Драгендорфа та кислоту сульфатну [2, 3].

*Методика хроматографування.* Стандартну хроматографічну камеру попередньо насичують парами елюенту протягом 30 хв. На лінію старту попередньо активованої хроматографічної пластинки скляним капіляром наносять по 5 мкл (5 мкг) випробовуваних розчинів глібенкламід, гліклазиду, глімепіриду та кофеїну. Пластинку поміщають у камеру із відповідною сумішшю розчинників та елюють. Коли фронт розчинників пройде 8 см від лінії старту, пластинку виймають із камери, висушують на повітрі, переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм та обробляють відповідними реагентами.

### ВИКЛАД ОСНОВНОГО МАТЕРІАЛУ ДОСЛІДЖЕННЯ

Хроматографічну рухливість антидіабетичних засобів ПСС досліджували відповідно методології ТШХ-скринінгу лікарських речовин у два етапи [5]. З урахуванням кислотних властивостей ПСС (рКа 5,3-6,2) та їх розчинності в органічних розчинниках, на першому етапі

досліджень використовували загальні рухомі фази (системи 1-7), котрі, як правило, застосовуються у судово-токсикологічній практиці при отруєнні невідомою речовиною для розділення токсикологічно важливих лікарських речовин кислотного, нейтрального та слабоосновного характеру в тонкому шарі сорбенту по групах, з локалізацією у відповідних хроматографічних зонах. Для перевірки придатності використаних систем, хроматографування випробуваних зразків ПСС проводили у присутності стандартної речовини – кофеїну. Хроматографічну рухливість вищезазначених речовин досліджували на хроматографічних пластинках фірми Merck, які для даних цілей рекомендовані TIAFT та пластинках Sorbfil, які зазвичай застосовують у подібних випадках в країнах СНД [5]. З метою забезпечення відтворюваності одержаних результатів було досліджено розділювальну здатність використаних хроматографічних пластин. Встановлено, що вони є придатними, оскільки розбіжність величин Rf в межах однієї пластинки не перевищувала 0,02. Для візуалізації зон адсорбції ПСС використовували визначені нами [3] високочутливі групові реагенти: залізюодидний комплекс, хлорцинкїод та реактив Бушарда, а для кофеїну – послідовну обробку

тонкого шару реактивом Драгендорфа та кислотою сульфатною. Результати досліджень наведено в таблиці.

Встановлено, що досліджувані ПСС проявляють задовільну хроматографічну рухливість у всіх використаних системах. Однак, при хроматографуванні у системах 1, 2, 4-7 адсорбція ПСС відбувається у другій, четвертій та п'ятій хроматографічних зонах, де відповідно даних джерел [5] локалізуються токсикологічно важливі лікарські засоби похідні барбітурової та саліцилової кислот, 1,4-бенздіазепіну та піразолону-5. Найбільш придатною для цілей ХТА препаратів ПСС серед загальних рухомих фаз визначено систему 3. Адсорбція випробуваних зразків глібенкламід, гліклазиду та глімепіриду в даних умовах відбувається у вільній від вищезазначених токсикантів хроматографічній зоні (між четвертою та п'ятою) зі значення Rf для Merck 0,46-0,48 та Sorbfil – 0,40-0,44. Після обробки відповідних зон вищезазначеними груповими для ПСС реагентами, продукти візуалізації глібенкламід виявляються за коричневим, гліклазиду – оранжевим та коричневим, а глімепіриду – оранжевим забарвленням, тоді як при обробці зон адсорбції ПСС 12,5 % розчином міді сульфату в лужному середовищі продукти візуалізації

Таблиця

## ПАРАМЕТРИ ХРОМАТОГРАФІЧНОЇ РУХЛИВОСТІ ДОСЛІДЖУВАНИХ РЕЧОВИН

Система № *	Значення Rf досліджуваних речовин							
	Глібенкламід		Гліклазид		Глімепірид		Кофеїн **	
	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
11	0,70	0,81	0,70	0,78	0,68	0,76	0,60	0,56
12	0,55	0,49	0,60	0,53	0,56	0,50	0,34	0,32
13	0,66	0,67	0,64	0,70	0,66	0,65	0,40	0,42
14	0,51	0,58	0,53	0,61	0,48	0,60	0,36	0,34
15	0,82	0,76	0,83	0,77	0,80	0,79	0,50	0,43
16	0,37	0,39	0,46	0,45	0,34	0,35	0,15	0,20
17	0,64	0,63	0,73	0,74	0,66	0,67	0,23	0,22
18	0,56	0,56	0,66	0,68	0,50	0,52	0,26	0,28

Примітки: \* - нумерація систем згідно переліку наведеного в «умовах хроматографічних досліджень»; \*\* - хроматографічна система вважається придатною, якщо на хроматограмі чітко видно пляму кофеїну.

виявляються за зеленим забарвленням на синьому фоні. Одержані результати також свідчать про те, що після хроматографування випробуваного зразку кофеїну в зазначених загальних рухомих фазах, забарвлення його плями (коричневе) на пластинці та значення  $R_f$  співпадають з даними джерел [2, 5]. Це свідчить не тільки про придатність використаних хроматографічних систем, але й про кореляцію між одержаними результатами за розподілом ПСС та даними джерел за розподілом токсикантів кислотного, нейтрального та слабоосновного характеру в тонкому шарі по хроматографічних зонах. Також слід відмітити, що пластинки Sorbfil нами визначено теж придатними для елюювання ПСС у системах ТІАФТ при проведенні ТШХ-скринінгових досліджень. Як елюент для видалення досліджуваних ПСС з непроявленої зони їх адсорбції (для Merck 0,46-0,48 та Sorbfil – 0,40-0,44) запропоновано метиленхлорид.

Метою другого етапу даних досліджень було селективне розділення та ідентифікація кожного досліджуваного препарату ПСС у вилученні, одержаному метиленхлоридом з необробленої реагентами зони тонкого шару. Підбір умов хроматографування нами був розпочатий зі спеціальних систем розчинників, що застосовуються у фармацевтичному аналізі, виявленні фальсифікатів та моніторингу даної групи препаратів [5-11]. Як видно з одержаних результатів (див. табл.), у рухомих фазах (системи 8-15) дані за селективним розділенням препаратів ПСС мають неоднозначний характер. Встановлено, що при хроматографуванні у системах 10-15 значення  $R_f$  досліджуваних речовин є близькими, а у джерелах [6, 11] для систем 10 та 14 значення  $R_f$  не відповідають значенням, які одержані нами. У працях [9-11] наведені дані стосовно хроматографічної рухливості лише для глімепіриду, тоді як у джерелах [6-8] – тільки для глібенкламіду. Окрім зазначеного, у джерелах [7, 8] не наведено даних щодо детектуючих реагентів за виявленням ПСС. Цікавою у цьому аспекті виявлено спеціальну систему хлороформ-етилацетат-кислота ацетатна льодяна [8], в якій авторами досліджено хроматографічну рухливість низки антидіабетичних засобів різного походження, зокрема піоглітазону, метформіну, глібенкламіду та ін. При використанні даної рухомих фази у власних дослідженнях встановлено задовільну хроматографічну рухливість досліджуваних препаратів ПСС, хоча значення  $R_f$  глібенкламіду та глімепіриду на пластинках обох використаних типів є також близькими. Враховуючи одержані результати, підбір спеціальних хроматографічних систем для досліджуваних речовин проводили

за двома напрямками: шляхом додавання до складу рухомих фази додаткового розчинника та заміни одного з розчинників у складі системи іншим, близьким за властивостями розчинником. В основу першого напрямку досліджень покладено загальну систему 3 (ТІАФТ), у котрій етилацетат запропоновано підкислювати кислотою ацетатною льодяною з відповідним одержанням нової системи з співвідношенням даних розчинників 49,5:0,5 (система 17). За одержаними результатами було досягнуто розділення досліджуваних представників ПСС на пластинках Merck в межах значення  $R_f$  0,02-0,07 та Sorbfil 0,04-0,07 відповідно. При цьому значення  $R_f$  на пластинках Merck для глібенкламіду та глімепіриду є близькими, що може стати причиною одержання невірнопозитивного результату при проведенні судово-токсикологічних досліджень. В основу другого напрямку досліджень покладено спеціальну систему 16. Внаслідок заміщення в її складі хлороформу на менш токсичний метиленхлорид, одержано систему 18, котру виявлено нами як найбільш придатну. Зокрема, селективне розділення досліджуваних ПСС у даних умовах для Merck складає 0,06 та 0,10, а для Sorbfil – 0,04 та 0,12. Візуалізацію зон адсорбції досліджуваних речовин проводили шляхом обробки тонкого шару специфічними реагентами [3]. При цьому, 1 % розчин ваніліну з глібенкламідом утворює фіолетове, гліклазидом – темно-синє, а глімепіридом – оранжеве, що переходить в коричневе, забарвлення. При обробці хроматографічної пластинки 5 % розчином хлоралгідрату глібенкламіду утворює зелено-коричневе, гліклазид – темно-коричневе, а глімепірид – червоне, що переходить в рожеве забарвлення.

## ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ РОЗВІДОК

1. Підбірано етилацетат, як рухомих фази, в котрій адсорбція глібенкламіду, гліклазиду та глімепіриду селективно відбувається у вільній від інших токсикологічно важливих лікарських речовин кислотного, нейтрального та слабоосновного характеру хроматографічній зоні. Запропоновано елюент – метиленхлорид для видалення досліджуваних речовин з непроявленої детектуючими реагентами хроматографічної зони.

2. Запропоновано рухомих фази складу метиленхлорид-етилацетат-кислота ацетатна льодяна (50:50:1), яка надійно забезпечує селективне розділення глібенкламіду, гліклазиду та глімепіриду в тонкому шарі.

3. Показано можливість застосування високочутливих групових та специфічних реагентів для візуалізації зон адсорбції глібенкламіду,

гліклазиду та глімепіриду в тонкому шарі на двох типах пластин Merck та Sorbfil.

4. Підібрані та стандартизовані умови ТШХ глібенкламиду, гліклазиду та глімепіриду можуть бути використані для токсикологічного дослідження біологічних об'єктів та речових доказів отруєння даними ПСС.

#### ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

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. – 272 с.
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, глібенкламид или глімепірид 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.

**УДК 615.07:615.252.349.7:615.099:54.061:543.544**

**Т. В. Кучер, С. І. Мерзликін**

**ВЫБОР И СТАНДАРТИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ СЕЛЕКТИВНОГО РАЗДЕЛЕНИЯ  
ГЛИБЕНКЛАМИДА, ГЛИКЛАЗИДА И ГЛИМЕПИРИДА В ТОНКОМ СЛОЕ СОРБЕНТА**

В статье освещены результаты исследований по выбору и стандартизации условий селективного разделения глибенкламида, гликлазида и глимепирида в тонком слое сорбента. Полученные результаты являются основанием для отработки предложенных условий на извлечениях из биологических объектов при отравлении данными антидиабетическими средствами.

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

**UDC 615.07:615.252.349.7:615.099:54.061:543.544**

**T. V. Kucher, S. I. Merzlikin**

**THE CHOICE AND STANDARDIZATION OF THE CONDITIONS FOR SELECTIVE  
SEPARATION OF GLIBENCLAMIDE, GLICLAZIDE AND GLIMEPIRIDE IN A THIN LAYER**

In this paper the results of research relating for choosing and standardization of the conditions for the selective separation of glibenclamide, gliclazide and glimepiride in a thin layer has been presented. The obtained results are in the basis of the development of the proposed conditions in the extracts from biological objects for poisoning of this anti-diabetic drug.

**Key words:** standardization, anti-diabetic drug, sulphonylurea derivatives, poisoning, chemical-toxicological analysis, TLC

*Адреса для листування:*

м. Харків, вул. Блюхера, 4.

Кафедра токсикологічної хімії НФаУ.

Тел. (0572) 67-91-92

E-mail: lesja\_2384@mail.ru

Надійшла до редакції:

01.12.2014