

В.Ю. Москаленко, С.І. Мерзлікін

РОЗРОБКА УМОВ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ ДЛЯ ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНОГО АНАЛІЗУ МЕТФОРМІНУ

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Ключові слова: протидіабетичні засоби, метформін, високоефективна рідинна хроматографія, хіміко-токсикологічний аналіз.

Ключевые слова: противодиабетические препараты, метформин, высокоэффективная жидкостная хроматография, химико-токсикологический анализ.

Key words: antidiabetic drugs, metformin, high-efficient liquid chromatography, chemical-toxicological analysis.

Запропоновано умови виявлення та кількісного визначення метформіну методом ВЕРХ. Прийнятність методики для хіміко-токсикологічного аналізу зумовлена відносною невизначеністю середнього результату при кількісному визначенні досліджуваної речовини, що складає $\pm 5,15\%$.

Предложены условия идентификации и количественного определения метформина методом ВЭЖХ. Пригодность методики для химико-токсикологического анализа обусловлена относительной неопределенностью среднего результата при количественном определении исследуемого вещества, которая составляет $\pm 5,15\%$.

Conditions of the identification and quantitative determination method of metformin by HPLC method were offered. The availability of method for aims of chemical and toxicological analysis was stipulated with a relative error of the quantitative determination of metformin, which is $\pm 5,15\%$.

Похідне бігуаніду метформіну гідрохлорид (метформін, сіофор) як протидіабетичний засіб є основою багатьох терапевтичних схем лікування цукрового діабету 2 типу [1–3]. Проте відомо, що наслідками передозування метформіном є зареєстровані у багатьох країнах світу гострі отруєння, що є підставою для розробки методології хіміко-токсикологічних досліджень біологічного матеріалу на вміст цієї речовини [4–9].

У вирішенні питання здійснення хіміко-токсикологічного аналізу (ХТА) на хімічну речовину, що спричинила отруєння, важливою умовою є використання сучасних аналітичних методів, у тому числі ВЕРХ [10,11]. Однак, застосування відомих ВЕРХ-методик визначення метформіну [12–15] у ситуації неспрямованого ХТА (на невідому речовину) потребує значних кількостей експериментів і матеріалів.

На наш погляд, розв'язання цієї наукової задачі можливе за рахунок використання ВЕРХ-аналізатора, розробленого ЗАТ «ЕкоНова», м. Новосибірськ, РФ [16], що вже зарекомендував себе для ХТА лікарських речовин [17–20].

МЕТА РОБОТИ

З'ясування можливості використання ВЕРХ-аналізатора ЗАТ «ЕкоНова» (м. Новосибірськ, РФ) для виявлення та кількісного визначення метформіну методом ВЕРХ, прийнятних для цілей ХТА.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження виконували на хроматографі «Міліхром А-02» (ЗАТ «ЕкоНова, м. Новосибірськ) на базі НВФ «Аналітика» у наступних умовах: оберненофазна колонка № 000000 ProntoSIL-120-5-C18-AQ розміром $\varnothing \times 75$ мм, зерніння – 5 мкм («Bischoff Analysetechnik und Geräte GmbH», Німеччина). Градієнтне елюювання проводили сумішшю 2 елюентів: елюент А – $[0,2 \text{ M LiClO}_4 - 0,005 \text{ M HClO}_4] - \text{H}_2\text{O}$ у відношенні (5:95); елюент Б – ацетонітрил

100% ступеня «для ВЕРХ»; лінійний градієнт складав від 2 до 100% ацетонітрилу за 40 хв, потім 100% ацетонітрилу протягом 3 хв; швидкість потоку – 100 мкл/хв; температура колонки – 40°C , максимальний тиск – 4,0 МПа. Об'єм проби інжектора – 4,0 мкл. Зазначені елюенти мають високу прозорість у короткохвильовій області УФ-спектру, не містять УФ-поглинаючих домішок, що забезпечує чистоту проведення аналізу. УФ-детектування проводили при довжинах хвиль 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280, 300 нм, що відображалось на хроматограмі відповідними спектрами з однаковим часом утримання, але з різними спектральними характеристиками. Для попереднього контролю розчинника проводили його хроматографування. Правильність методики аналізу періодично контролювали шляхом хроматографування стандартного розчину бромід-іону, урідину, кофеїну, прозерину, м-нітроаніліну, п-нітроаніліну та трифтазину [16]. Аналіз та обробку хроматограм проводили за допомогою програми «Аналітика-Chrom», розробленою НВФ «Аналітика».

Методика побудови градуювального графіка для метформіну гідрохлориду

Для побудови градуювального графіка 100 мг (точна навеска) метформіну гідрохлориду вміщували в мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняли у воді очищеній бідистильованій і доводили об'єм розчину тим самим розчинником до позначки (розчин 1, концентрація 1000 мкг/мл). У мірну колбу місткістю 100 мл вміщували 40 мл розчину 1 та доводили об'єм до позначки водою очищеною бідистильованою (розчин 2, концентрація 400 мкг/мл). У 2 мірні колби на 100 мл вміщували по 50 і 25 мл розчину 2 та доводили об'єм розчинів до позначки водою бідистильованою (розчини 3 і 4, концентрація 200 і 100 мкг/мл відповідно). У мірну колбу місткістю 100 мл вміщували 25 мл розчину 3 та доводили до позначки водою очищеною бідистильованою (розчин 5,



Таблиця 1

Основні хроматографічні параметри метформіну гідрохлориду при виявленні

Речовина	R(S _х /S ₂₁₀)							
	210 нм	220 нм	230 нм	240 нм	250 нм	260 нм	280 нм	300 нм
Метформіну гідрохлорид	1,0000	0,8930	1,0700	0,9010	0,3000	0,0361	0,0013	0,0008

Таблиця 2

Залежність площі піку розчинів метформіну гідрохлориду від його концентрації (λ=210 нм, об'єм проби 4 мкл)

Концентрація розчину метформіну гідрохлориду, мкг/мл	Площа піку		Час утримування, хв	RSD, %
	S _i	\bar{S}		
200,0	0,4961	0,4992	2,42	0,69
	0,4986			
	0,5029			
100,0	0,2566	0,2497	2,41	2,63
	0,2435			
	0,2490			
50,0	0,1268	0,1262	2,42	0,39
	0,1260			
	0,1259			
10,0	0,0235	0,0240	2,43	2,01
	0,0245			
	0,0239			
1,0	0,0024	0,0024	2,42	0,68
	0,0024			
	0,0024			

Таблиця 3

Метрологічні характеристики градувальної залежності площі піку від вмісту речовини (y = bx + a)

R	b	a	S ²	S	Δb	Δa
0,999	2,50•10 ⁻³	-1,7•10 ⁻⁵	6,4•10 ⁻¹¹	8,0•10 ⁻⁶	2,13•10 ⁻⁵	2,18•10 ⁻³

Таблиця 4

Результати кількісного визначення метформіну гідрохлориду

Концентрація розчину метформіну гідрохлориду, мкг/мл	Середня площа піку	Знайдено метформіну гідрохлориду		Метрологічна характеристика (P=0,95; n=3)
		мкг/мл	%	
200,0	0,4986	199,44	99,72	$\bar{X} = 98,16$ $S^2 = 10,08$ $S = 3,17$ $S_{\bar{X}} = 1,59$ $\Delta X = 5,05$ $\epsilon = \pm 5,15\%$ $\bar{X} \pm \Delta X = 98,16 \pm 5,05$
100,0	0,2435	97,40	97,40	
50,0	0,1268	50,72	101,44	
10,0	0,0235	9,41	94,10	

концентрація 50 мкг/мл). У мірну колбу місткістю 100 мл вмішували 10 мл розчину 4 і доводили водою очищеною бідистильованою до позначки (розчин 6, концентрація 10 мкг/мл). У мірну колбу місткістю 100 мл вмішували 10 мл розчину 6 і доводили до позначки водою очищеною бідистильованою (розчин 7, концентрація 1 мкг/мл). Усі розчини готували за кімнатної температури за 10 хв до проведення аналізу.

Водні розчини метформіну гідрохлориду 3, 4, 5, 6 і 7 хроматографували тричі кожний за наведених умов; об'єм проби складав 4 мкл.

Методика визначення метформіну гідрохлориду у модельних розчинах

Приготування модельних розчинів метформіну гідро-

хлориду з концентрацією 10; 50; 100 та 200 мкг/мл проводили згідно з методикою, наведеною вище. Хроматографування модельних розчинів метформіну гідрохлориду проводили за зазначених умов; об'єм проби складав 4 мкл.

Для розрахунку вмісту метформіну гідрохлориду використовували рівняння прямої градувального графіку.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті дослідження встановлено, що максимальна площа піку метформіну гідрохлориду на хроматограмі (R(S_х/S₂₁₀)=1,000) спостерігається за довжини хвилі 210 нм, що обрано як аналітичну. Час утримування досліджуваної речовини складав 2,4 хв. Основні хроматографічні параметри метформіну гідрохлориду наведено в табл. 1 і 2, хроматограма – на рис. 1.

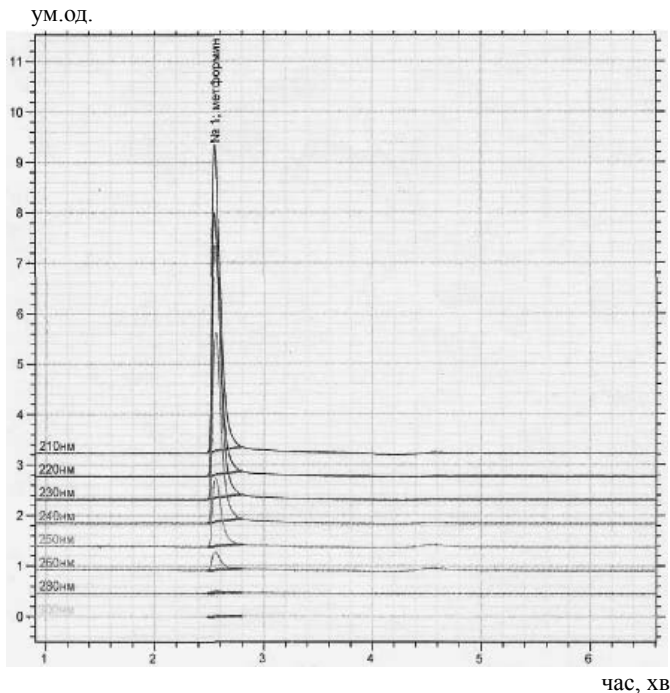


Рис. 1. Хроматограма водного розчину метформіну гідрохлориду ($C=200$ мкг/мл, $\lambda=210$ нм, об'єм проби 4 мкл).

Побудованому за отриманими даними градувальному графіку відповідає рівняння прямої виду $y = bx + a$ [10]:

$$S = (2,50 \pm 0,02) \cdot 10^{-3} \cdot C, \quad (1)$$

де S – площа піку, ум. од.;

C – концентрація речовини, мкг/мл.

Метрологічні характеристики отриманої градувальної залежності наведено в табл. 3.

Встановлено, що площі піків розчину метформіну гідрохлориду лінійно залежать від концентрацій останнього і знаходяться в діапазоні 1–200 мкг/мл, що відповідає вмісту речовини у пробі від 2 до 400 нг відповідно.

Рівняння прямої (1) використано для розрахунку концентрації досліджуваної речовини у модельних розчинах. Результати цих досліджень наведено в табл. 4.

у модельних розчинах ($\lambda=210$ нм; об'єм проби 4 мкл)

ВИСНОВКИ

В уніфікованих умовах виконання ВЕРХ-аналізу розроблено методику виявлення та кількісного визначення метформіну гідрохлориду, прийнятної для хіміко-токсикологічного дослідження.

ЛІТЕРАТУРА

1. Уильямз Г. Руководство по диабету / Г. Уильямз, Д. Пикап. – 2-е изд. – М.: МЕДпресс-информ, 2003. – 248 с.
2. Аметов А. С. Метформин – основа терапии пациентов с метаболическим синдромом / А.С. Аметов, Л.В. Кондратьева // Русский медицинский журнал – Эндокринология. – 2006. – Т. 14, №26. – С. 1905.
3. Зилов А. В. Метформин – 50 лет в клинической практике / А.В. Зилов, А.Л. Терехова // Лечащий врач. – 2008. – №3. – С. 16–19.
4. Carnicer J. Ortega. Pancreatitis aguda, fallo renal agudo, intoxicación por metformina y adenoma vellosos rectal / Carnicer J. Ortega., Ambrós Checa A., Diarte de Miguel J. // Medicina Intensiva. – 2006. – V. 30. – P. 409–410.
5. Carnicer J. Ortega. Overdose of metformin secondary to acute renal insufficiency: a report of six cases / Carnicer J. Ortega // Medicina Intensiva. – 2007. – V. 31, №9. – P. 521–525.
6. Holanda P. Severe lactic acidosis associated to metformin intoxication / P. Holanda // Nutricion hospitalaria: organo oficial de la Sociedad Espanola de Nutricion Parenteral y Enteral. – 2007. – V. 22, № 1. – P. 124–125.
7. De Pont A.C. Fatal autointoxication with metformin / A.C. De Pont // Nederlands tijdschrift voor geneeskunde. – 2007. – V. 151, №17. – P. 981–984.
8. Gambaro V. A case of fatal intoxication from metformin / V. Gambaro // Journal of forensic sciences. – 2007. – V. 52, №4. – P. 988–991.
9. Мерзлікін С.І. Інформаційний огляд щодо обґрунтування хіміко-токсикологічного дослідження на метформін / С.І. Мерзлікін, В.Ю. Москаленко // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2010. – № 1–2 (14–15). – С. 3–10.
10. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний Фармакопейний центр» – 1-е вид. – Харків: PIPEГ. – Доповнення 2. – 2008. – 620 с.
11. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons: 3rd edition. – London: Pharmaceutical Press, electronic version, 2005.
12. Tache F. Specificity of an analytical HPLC assay method of metformin hydrochloride / F. Tache, M. Albu // Review of roumanian chemistry. – 2007. – V. 052, №6. – P. 603–609.
13. HPLC-UV determination of metformin in human plasma for application in pharmacokinetics and bioequivalence studies / V. Porta, S.G. Schramm, E.K. Kano, E.E. Koono et al. // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2008. – V. 46, №1. – P. 143–147.
14. Amini Hossein. Determination of metformin in human plasma by high-performance liquid chromatography / Amini Hossein, Ahmadiani Abolhassan, Gazerani Parisa // J Chromatogr. B. – 2005. – V. 824, № 1-2. – P. 319–322.
15. Arayne M.S. Development and validation of RP-HPLC method for the analysis of metformin / M.S. Arayne, N. Sultana, M.H. Zuberi // Journal of Pharmaceutical Science. – 2006. – V. 19. – P. 231–235.
16. Барам Г.И. Высокоэффективная жидкостная хроматография в контроле качества лекарственных средств / Г.И. Барам, Д.В. Рейхарт, Е.Д. Гольдберг, Б.Н. Изотов, М.О. Родинко, В.А. Хазанов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2003. – Т. 135, №1. – С. 75–79.
17. Шовкова З.В. Хіміко-токсикологічний аналіз біологічного матеріалу на каптоприл: Метод. реком. / З.В. Шовкова. – Х.: Вид-во НФаУ, 1998. – 23 с.
18. Шовкова З.В. Високоєфективна рідинна хроматографія в аналізі каптоприлу / З.В. Шовкова, С.І. Мерзлікін, В.В. Болотов // Вісник фармації. – 2006. – №3 (47). – С. 31–34.
19. Болотов В.В. Застосування методу високоєфективної рідинної хроматографії для кількісного визначення каптоприлу в хіміко-токсикологічному аналізі / В.В. Болотов, З.В. Шовкова, С.І. Мерзлікін // Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів: матер. І Міжнар. наук.-практ. конф., м. Тернопіль, 6–7 квіт. 2006 р. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2006. – С. 86–87.
20. Вивчення зопіклону за допомогою методу високоєфективної рідинної хроматографії / В.В. Болотов, Л.Ю. Клименко, В.Ф. Першин, С.М. Кузнецова та ін. // Матер. наук.-практ. конф. з міжнар.участю «Стан, перспективи судово-токсикологічної служби та наукових досліджень». 9–10 листопада 2005 р. – Харків. – С. 25–26.

Відомості про авторів:

Москаленко В.Ю., аспірант каф. токсикологічної хімії НФаУ.
Мерзлікін С.І., д. фарм. н., професор каф. токсикологічної хімії НФаУ.

Адреса для листування:

Москаленко Валерія Юріївна. 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, буд. 53.
Тел.: (0572) 67 91 92, (057) 714 25 40, (096) 734 78 93.

E-mail: diacamph@mail.ru