

Рекомендована д. фармац. наук. проф. С. О. Васюк  
УДК 615.272.3:543.42.061/062  
DOI 10.11603/2312-0967.2016.2.6645

## РОЗРОБКА УМОВ ІЗОЛЮВАННЯ ТА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ МЕТФОРМІНУ В БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТАХ

© В. Ю. Москаленко, С. І. Мерзлікін

Національний фармацевтичний університет, Харків

**Резюме:** розроблений прийнятний для цілей направленої хіміко-токсикологічного аналізу (ХТА) індивідуальний метод ізолювання метформіну з тканин печінки, що дозволяє виділити дану речовину з об'єкту дослідження при отруєнні до 82 %. Як рідку фазу для виділення метформіну з біологічного об'єкту запропоновано воду, а його екстракції з водної фази в органічну – суміш ізопентанол-бутанол (1:1) при рН 13. Для очищення первинного водного вилучення від співекстрактивних речовин кислотного характеру запропоновано суміш гексан-толуен (1:1), а для очищення вилучення від речовин білкового походження – 25 % розчин NaCl. Розроблені прийнятні для цілей ХТА умови ідентифікації та кількісного визначення метформіну у вилученнях із тканин печінки методом спектрофотометрії при довжині хвилі (236±2) нм. Відносне стандартне відхилення при кількісному визначенні метформіну становить 4,08 %, а відносна невизначеність середнього результату ± 11,36 %.

**Ключові слова:** цукровий діабет, антидіабетичний засіб, метформін, УФ-спектрофотометрія, хіміко-токсикологічний аналіз.

**Вступ.** Враховуючи багатовекторний механізм розвитку цукрового діабету (ЦД) 2 типу, його ефективне медикаментозне лікування базується на застосуванні сучасних фармакотерапевтичних схем, в основу яких покладений антидіабетичний засіб Метформін (Глюкофаж, Сіофор) [1]. Разом із тим, довічне застосування, побічні дії, доступність в аптечній мережі, постійно зростаюча кількість пацієнтів на ЦД (близько 260 млн. у світі) – фактори, що створюють токсикологічну небезпеку при неконтрольованому застосуванні метформіну. Про це свідчить проведений нами інформаційний огляд щодо випадків гострих отруєнь препаратом [2], а також безпосередньо хіміко-токсикологічне дослідження на метформін у практиці Республіканського бюро судово-медичної експертизи МОЗ Республіки Татарстан, м. Казань [3]. У вирішенні питання здійснення направленої хіміко-токсикологічного аналізу (ХТА) на хімічну речовину, яка спричинила отруєння, важливою умовою є використання спеціальних (індивідуальних) методів ізолювання токсиканту з біологічних об'єктів та сучасних інструментальних методів аналізу для його виявлення та кількісного визначення в одержаних вилученнях [4–6].

Мета роботи – розробка умов ізолювання метформіну з тканин печінки при направленому ХТА та визначення токсиканту в одержаних вилученнях методом спектрофотометрії.

**Методи дослідження.** Як об'єкт дослідження використовували метформіну гідрохлорид (субстанція, монографія ЕР 01/2005:0931, виробник Harman Finocem Ltd., серія № 051121) [7]. Ідентифікацію та

кількісне визначення метформіну проводили за допомогою модифікованого спектрофотометра СФ-46 ЛОМО.

**Методика ізолювання метформіну з модельного зразка печінки.** 10,0 г подрібненої свинячої печінки насичують 1,0 мл водного розчину метформіну, що містить 1000,0 мкг препарату, та витримують протягом доби. Додають 20,0 мл води, настоюють двічі новими порціями кожного разу по 2 год. Одержані водні вилучення з біологічного матеріалу зливають, проціджують, додають 5,0 г кристалічного амонію сульфату та центрифугують. Надосадову рідину переносять у ділильну лійку та тричі по 20,0 мл збовтують з новими порціями гексан-толуен (1:1). Органічну фазу відділяють та не досліджують.

Водний шар, що залишився у ділильній лійці, підлужнюють 5 М розчином NaOH до рН 13, додають 5,0 мл 25 % розчину NaCl та тричі екстрагують новими порціями суміші ізопентанол-бутанол (1:1) по 20,0 мл. Спиртові екстракти об'єднують, фільтрують через безводний  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  та центрифугують. Одержану надосадову рідину переносять у порцелянову чашку, розчинник випаровують на водяному огрівнику, сухий залишок розчиняють у метанолі та очищують методом ТШХ (система розчинників н-бутанол-кислота ацетатна льод.-вода (60:10:30), елюент метанол, пластинки Merck silica gel). Одержаний метанольний елюат досліджують методом УФ-спектрофотометрії.

**Методика приготування серії розчинів метформіну для побудови градувального графіку.** 250,0 мг метформіну поміщають у мірну колбу місткістю 200,0 мл, додають 10,0 мл метанолу та доводять

об'єм розчину тим самим розчинником до позначки (стандартний розчин, концентрація 1250 мкг/мл). 5,0 мл одержаного стандартного розчину переносять у мірну колбу місткістю 250,0 мл, додають 10,0 мл метанолу та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки (розчин 1, концентрація 25 мкг/мл). У ряд мірних колб місткістю 50,0 мл вносять по 40,0; 30,0; 20,0; 10,0 та 2,0 мл розчину 1 та доводять об'єм розчину тим самим розчинником (розчини 2, 3, 4, 5 та 6; концентрація 20, 15, 10, 5 та 1 мкг/мл відповідно) до позначки.

Вимірюють оптичну густину метанольних розчинів метформіну 1, 2, 3, 4, 5 та 6 на модифікованому спектрофотометрі СФ-46 ЛОМО при довжині хвилі 236 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Як компенсаційний розчин використовують метанол. Експеримент виконують тричі.

**Методика приготування модельних розчинів метформіну для кількісного визначення.** 250,0 мг метформіну поміщають у мірну колбу місткістю 200,0 мл, додають 10,0 мл метанолу та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки (стандартний розчин, концентрація 1250 мкг/мл). У ряд мірних колб місткістю 50,0 мл вносять по 6,0; 5,0; 4,0; 3,0, 1,0 та 0,5 мл стандартного розчину і доводять об'єм розчину тим самим розчинником (розчини 1, 2, 3, 4, 5 та 6; концентрація 150,0; 125,0; 100,0; 75,0; 25,0 та 12,5 мкг/мл відповідно) до позначки.

Вимірюють оптичну густину модельних метанольних розчинів 1, 2, 3, 4, 5 та 6 на модифікованому спектрофотометрі СФ-46 ЛОМО при довжині хвилі 236 нм у кюветі із товщиною шару 10 мм. Як компенсаційний розчин використовують метанол.

**Результати й обговорення.** При розробці методів систематичного ХТА біологічного матеріалу на метформін нами показано, що застосування класичних методів Стаса-Отто та Васильєвої для ізолювання

даної речовини з об'єктів дослідження є мало ефективним [8]. Насамперед, це зумовлено високими гідрофільними властивостями метформіну, а також розчинністю його основи у воді і нерозчинністю в хлороформі та діетиловому етері. Тому як рідку фазу для виділення метформіну з тканин печінки запропоновано воду, а для екстракції його основи з водної фази в органічну – суміш ізопентанол-бутанол (1:1) при рН 13. Для очищення первинного водного вилучення від співекстрактивних речовин кислотного характеру запропоновано суміш гексан-толуен (1:1), а для очищення вилучення від речовин білкового походження – 25 % розчин NaCl. Одержані спиртові вилучення у подальшому очищували методом ТШХ з використанням як рухомої фази суміш *n*-бутанол-кислота ацетатна льод.-вода (60:10:30) та як елюенту – 90 % метанолу [9].

З метою розробки умов виявлення та кількісного визначення метформіну в одержаних вилученнях із біологічного матеріалу методом УФ-спектрофотометрії нами виміряні спектри його водного, метанольного та лужного розчинів. Так, УФ-спектри водного та метанольного розчинів метформіну (рис. 1) характеризуються максимумами поглинання при довжині хвиль  $(232 \pm 2)$  нм та  $(236 \pm 2)$  нм відповідно, що збігається з даними літератури [10, 11], тоді як УФ-спектр його лужного розчину має два максимума поглинання при довжині хвиль  $(218 \pm 2)$  нм та  $(230 \pm 2)$  нм.

З урахуванням результатів за розробкою методу ізолювання метформіну з біологічних об'єктів та проведених спектрофотометричних вимірювань для його ідентифікації в одержаних вилученнях запропоновано довжину хвилі  $(236 \pm 2)$  нм, а метанольний розчин метформіну – для подальших досліджень за його кількісним визначенням.

З метою розробки методики кількісного визначення метформіну методом спектрофотометрії побудо-

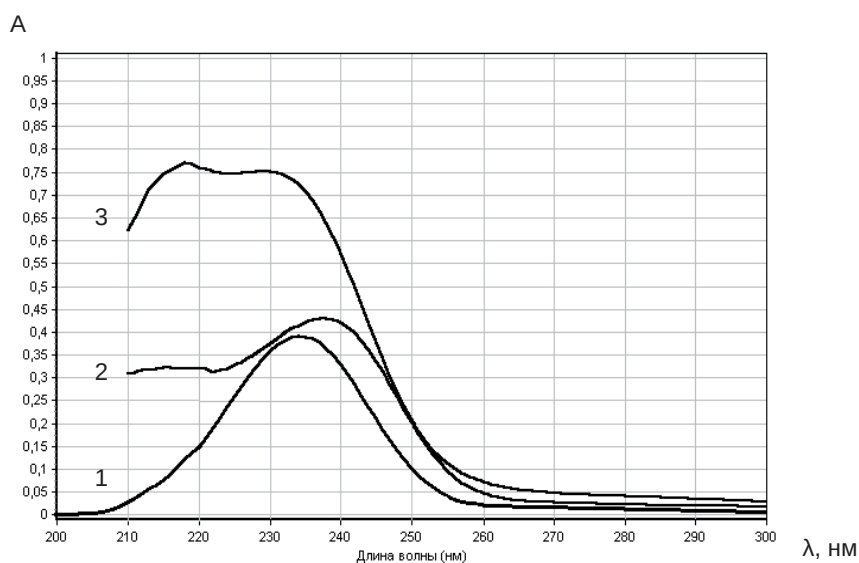


Рис. 1. УФ-спектри метформіну у воді (1), метанолі (2) та 0,1 М NaOH (3).

ваний градувальний графік залежності оптичної густини від концентрації препарату на основі приготуваної серії розчинів метформіну в метанолі у концентраціях 25, 20, 15, 10, 5 та 1 мкг/мл. Оптичну густину кожного приготованого розчину препарату вимірювали тричі. Одержаний за результатами вимірювання графік виявлений лінійним у діапазоні відповідних концентрацій. За даним графіком виведене рівняння прямої, яке відповідає рівнянню прямої вигляду  $y = bx + a$ :

$$A = 0,029 \cdot C + 0,22, (1),$$

де  $A$  – оптична густина розчину;

$C$  – концентрація метформіну, мкг/мл.

Метрологічні характеристики результатів вимірювання наведено в таблиці 1.

Для опрацювання розроблених умов вимірювання оптичної густини 6 модельних розчинів метформіну з різною концентрацією речовини. За допомогою рівняння (1) визначено кількісний вміст метформіну у кожному досліджуваному розчині. Результати визначення наведено в таблиці 2.

Встановлено, що відносна невизначеність середнього результату за кількісним визначенням метформіну в модельних розчинах становить  $\pm 2,40 \%$ , а стандартне відносне відхилення –  $2,29 \%$ , що свідчить про достовірність та належну відтворюваність одержаних результатів аналізу.

Розроблені спектрофотометричні умови опрацьовані нами в дослідженнях за кількісним визначенням метформіну у вилученнях із біологічного матеріалу, відповідно одержаних за розроблених умов його ізолювання. Результати за виділенням метформіну з тканин печінки та його кількісним вмістом в одержаних вилученнях наведено в таблиці 3.

Встановлено, що запропоновані умови дозволяють виділити метформін з біологічних об'єктів у діапазоні 77 – 82 %. При цьому відносна невизначеність середнього результату за кількісним визначенням метформіну методом спектрофотометрії становить  $\pm 11,36 \%$ , а відносне стандартне відхилення –  $4,08 \%$ , що у підсумку свідчить про придатність розроблених умов для цілей направленої ХТА при отруєнні даною речовиною.

**Таблиця 1.** Метрологічні характеристики градувальної залежності оптичної густини від концентрації метформіну ( $\lambda = 236 \text{ нм}$ ;  $l = 10 \text{ мм}$ ;  $n = 18$ ;  $P = 0,95$ )

$r$	$b$	$a$	$S^2$	$S$	$\Delta b$	$\Delta a$
0,9996	$0,029 \pm 0,004$	0,22	$2,53 \cdot 10^{-9}$	$5,03 \cdot 10^{-5}$	$4,24 \cdot 10^{-4}$	$6,43 \cdot 10^{-3}$

**Таблиця 2.** Результати кількісного визначення метформіну в модельних розчинах методом спектрофотометрії

Концентрація метформіну, мкг/мл	Оптична густина	Визначено метформіну		Метрологічні характеристики ( $n = 6$ ; $P = 0,95$ )
		мкг	%	
150,0	4,55	149,31	99,54	$\bar{X} = 100,06$ $\Delta \bar{X} = 2,40$ $\varepsilon = \pm 2,40\%$ $RSD = 2,29\%$
125,0	3,86	125,52	100,42	
100,0	3,21	103,10	103,10	
75,0	2,33	72,76	97,01	
25,0	0,96	25,52	102,08	
12,5	0,57	12,28	98,24	

**Таблиця 3.** Результати ізолювання та спектрофотометричного визначення метформіну у вилученнях з тканин печінки

Внесено метформіну, мкг на 10,0 г печінки	Вилучено метформіну		Метрологічні характеристики ( $n=5$ , $P=0,95$ )
	мкг	%	
1000,0	816,0	81,60	$\bar{X} = 824,0$ $\Delta \bar{X} = 41,85$ $\varepsilon = \pm 11,36 \%$ $RSD = 4,08 \%$
	855,0	85,50	
	847,0	84,70	
	832,0	83,20	
	770,0	77,00	

**Висновки.** 1. Розроблено прийнятний для цілей направленої ХТА індивідуальний метод ізолювання метформіну з тканин печінки, що дозволяє виділити дану речовину з об'єкту дослідження від 77 до 82 %.

Розроблено прийнятну для цілей ХТА методику ідентифікації та кількісного визначення метформіну у вилученнях з тканин печінки методом спектрофотометрії.

## Список літератури

1. Соколова Л. К. Метформин: более 50 лет достижений и успехов / Л. К. Соколова // Эндокринология. – 2013. – Т. 18, № 1. – С. 59–63.
2. 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.
3. Мансурова Р. Г. Изолирование метформина из биологического материала и его идентификация / Р. Г. Мансурова, Н. В. Кубасова, З. А. Газизова // Судебно-медицинский журнал. – 2010. – № 1. – С. 5.
4. Болотов В. В. Применение УФ- и ИК-спектроскопии, иммунохимических методов анализа при химико-токсикологических исследованиях: метод. разработки / В. В. Болотов, Э. И. Стадниченко, В. С. Бондар. – Харьков: УкрФА, 1992. – 24 с.
5. Вергейчик Т. Х. Определение карбамазепина в трупном материале с использованием производной спектрофотометрии / Т. Х. Вергейчик, С. В. Шабалин // Судебно-медицинская экспертиза. – 1993. – Т. 36, № 1. – С. 32–34.
6. Вергейчик Т. Х. Особенности спектрофотометрического определения лекарственных препаратов при химико-токсикологических и судебно-химических исследованиях / Т. Х. Вергейчик, В. А. Линникова, Г. Б. Гуськова // Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Технические науки. – 1993. – № 1–2. – С. 38–44.
7. European Pharmacopoeia. – 5th ed. – Strasbourg: Council of Europe, 2008. – 3086 p.
8. Москаленко В. Ю. Ізолювання метформіну з біологічних об'єктів / В. Ю. Москаленко, С. І. Мерзлікін // Український біофармацевтичний журнал. – 2013. – № 6 (29). – С. 70–74.
9. Москаленко В. Ю. Дослідження хроматографічної поведінки метформіну в умовах загального ТШХ-скринінгу лікарських речовин / В. Ю. Москаленко, С. І. Мерзлікін // Фармацевтичний часопис. – 2013. – № 4 (29). – С. 58–62.
10. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons: 3<sup>rd</sup> edition. – London: Pharmaceutical Press, electronic version, 2005.
11. British Pharmacopoeia, 2009 / Her Majesty's Stationary Office, London. – 2009. – V. 1 & 2. – P. 3813–3816.

## РАЗРАБОТКА УСЛОВИЙ ИЗОЛИРОВАНИЯ И СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТФОРМИНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ

© В. Ю. Москаленко, С. И. Мерзликін

Национальный фармацевтический университет, Харьков

**Резюме:** разработан приемлемый для целей направленного химико-токсикологического анализа (ХТА) индивидуальный метод изолирования метформина из тканей печени, позволяющий выделить данное вещество из объекта исследования при отравлении до 82 %. В качестве жидкой фазы для выделения метформина из биологического объекта предложено воду, а его экстракции из водной фазы в органическую – смесь изопентанол-бутанол (1:1) при pH 13. Для очистки первичного водного извлечения от соэкстрактивных веществ кислотного характера предложена смесь гексан-толуол (1:1), а для очистки от веществ белкового происхождения – 25 % раствор NaCl. Разработаны приемлемые для целей ХТА условия идентификации и количественного определения метформина в извлечениях из тканей печени методом спектрофотометрии при длине волны (236±2) нм. Относительное стандартное отклонение при количественном определении метформина составляет 4,08 %, а относительная неопределенность среднего результата ± 11,36 %.

**Ключевые слова:** сахарный диабет, антидиабетическое средство, метформин, УФ-спектрофотометрия, химико-токсикологический анализ.

## THE DEVELOPMENT OF CONDITIONS OF ISOLATION AND SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF METFORMIN IN BIOLOGICAL OBJECTS

© V. Yu. Moskalenko, S. I. Merzlikin

National University of Pharmacy, Kharkiv

**Summary:** individual method of isolation of metformin from liver tissues, acceptable for aims of directed chemical-toxicological analysis, was developed. This method allows isolating up to 82 % of the drug from investigated object in case of poisoning. As the liquid phase for isolation of metformin from biological object proposed water, and for its extraction from aqueous phase into organic – mixture of isopentanol-*n*-butanol (1:1) at pH 13. There was proposed the purification of primary aqueous extract from co-extractive substances of acid character by mixture hexane-toluene (1:1); proposed purification of extract from proteins by 25 % solution of sodium chloride. Developed conditions of identification and quantitative determination of metformin in extracts from liver tissues by spectrophotometry at wavelength 236±2 nm were acceptable for chemical-toxicological analysis. The relative standard deviation at quantitative determination of metformin was 4,08 %, and the relative uncertainty of the average value was ± 11,36 %.

**Key words:** diabetes mellitus, antidiabetic drug, metformin, UV-spectrophotometry, chemical-toxicological analysis.

Отримано 05.04.2016