



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **109315** (13) **U**
(51) МПК (2016.01)
G01N 30/00
A61K 31/64 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

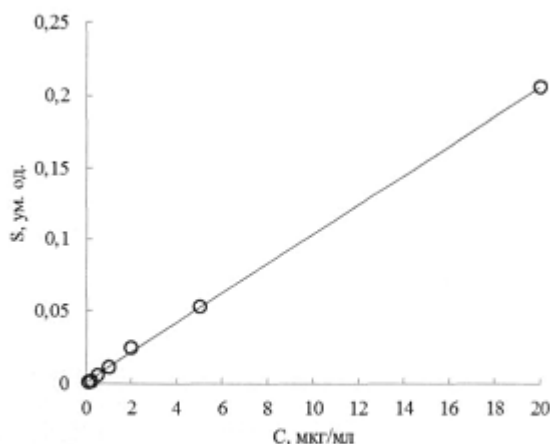
(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2016 01000	(72) Винахідник(и):	Кучер Тетяна Володимирівна (UA), Мерзлікін Сергій Іванович (UA)
(22) Дата подання заявки:	08.02.2016	(73) Власник(и):	НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	25.08.2016		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.08.2016, Бюл.№ 16		

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ГЛІБЕНКЛАМІДУ В БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТАХ

(57) Реферат:

Спосіб визначення глібенкламід у біологічних об'єктах включає ізолювання глібенкламід з біологічних об'єктів підкисленим органічним розчинником, очищення одержаних вилучень та екстрактів від домішок різної природи, виявлення та кількісне визначення глібенкламід у екстрактах, причому ізолювання глібенкламід з біологічних об'єктів проводять ацетонітрилом, підкисленим 6 М розчином кислоти хлоридної до рН 2,0-2,5 з подальшим фільтруванням, очищенням одержаного вилучення від органічних домішок 2,5 % розчином натрію сульфату та н-гексаном з подальшим екстрагуванням хлороформом; виявлення глібенкламід у хлороформному екстракті та очищення екстракту від співекстрактивних речовин проводять методом ТШХ з використанням як систем розчинників: етилацетату, суміші етилацетат-кислота ацетатна льодяна (49.5:0.5), суміші метиленхлорид-етилацетат-кислота ацетатна льодяна (50:50:1), а також специфічних реагентів: 1 % розчину ваніліну та 5 % розчину хлоралгідрату; виявлення глібенкламід та кількісне визначення глібенкламід у екстрактах проводять методом ВЕРХ.



Фиг. 3

UA 109315 U

Корисна модель належить до медицини, зокрема до судово-токсикологічних досліджень і стосується способу визначення глібенкламід у біологічних об'єктах.

Антидіабетичний засіб глібенкламід, який належить до класу похідних сульфонілсечовини, є основою сучасної фармакотерапевтичної схеми лікування цукрового діабету 2 типу [1].

Особливостями застосування глібенкламід є специфічність контингенту (пацієнти похилого віку), доступність через безрецептурний відпуск, поліпрагмазія, побічні дії, зокрема гіпоглікемія при передозуванні викликає порушення функції печінки та інші фактори, що створюють токсикологічну небезпеку [2].

Відомі випадки летальних отруєнь глібенкламідом, переважно при суїцидальному передозуванні [3], які відповідно чинного законодавства мають бути піддані судово-токсикологічним дослідженням з ізолюванням токсиканту з біологічних об'єктів, виявленням та кількісним його визначенням в одержаних вилученнях.

Найближчим аналогом до корисної моделі є спосіб визначення антидіабетичних засобів похідних сульфонілсечовини в біологічних об'єктах (печінка) [4], який включає метод ізолювання похідних сульфонілсечовини з тканин печінки триразовим настоюванням ацетоном, трикратну екстракцію токсикантів з кислих водних вилучень (рН 2,0) хлороформом, очищення одержаних екстрактів від співекстрактивних речовин методом ТТТТХ (система розчинників хлороформ - ацетон (9:1), елюент етанол, загальні та специфічні проявники), виявлення токсикантів методами ТШХ та УФ-спектрофотометрії, а також кількісне їх визначення методом УФ-спектрофотометрії.

Недоліком даного способу є використання ацетону як екстрагенту для ізолювання токсикантів з біологічних об'єктів, який є прекурсором; відсутність заходів очищення первинного вилучення від органічних домішок; використання загальної для лікарських речовин кислотного характеру системи розчинників хлороформ-ацетон (9:1), яка є не селективною для похідних сульфонілсечовини; використання УФ-спектрофотометричного методу виявлення та кількісного визначення токсикантів в одержаних екстрактах, який характеризується низькою селективністю.

Завдання корисної моделі полягає в розробці специфічного способу визначення глібенкламід у біологічних об'єктах для судово-токсикологічних досліджень направленою характеру, який включає: індивідуальний метод ізолювання глібенкламід з тканин печінки з використанням доступних екстрагентів; заходи очищення одержаних вилучень від домішок різної природи; виявлення глібенкламід методами ТШХ та ВЕРХ з використанням селективних систем розчинників, специфічних і високочутливих реагентів; кількісне визначення глібенкламід селективним та високочутливим методом ВЕРХ.

Поставлене завдання вирішується тим, що спосіб визначення глібенкламід у біологічних об'єктах включає ізолювання глібенкламід з біологічних об'єктів підкисленим органічним розчинником, очищення одержаних вилучень та екстрактів від домішок різної природи, виявлення та кількісне визначення глібенкламід у екстрактах, згідно з корисною моделлю ізолювання глібенкламід з біологічних об'єктів проводять ацетонітрилом, підкисленим 6 М розчином кислоти хлоридної до рН 2,0-2,5 з подальшим фільтруванням, очищенням одержаного вилучення від органічних домішок 2,5 % розчином натрію сульфату та н-гексаном з подальшим екстрагуванням хлороформом; виявлення глібенкламід у хлороформному екстракті та очищення екстракту від співекстрактивних речовин проводять методом ТШХ з використанням як систем розчинників: етилацетату, суміші етилацетат-кислота ацетатна льодяна (49,5:0,5), суміші метиленхлорид-етилацетат-кислота ацетатна льодяна (50:50:1), а також специфічних реагентів: 1 % розчину ваніліну та 5 % розчину хлоралгідрату; виявлення глібенкламід та кількісне визначення глібенкламід у екстрактах проводять методом ВЕРХ.

Перевагою заявленого способу перед способом-прототипом є застосування індивідуальної методики ізолювання глібенкламід з тканин печінки підкисленим ацетонітрилом та заходів очищення первинного вилучення від органічних домішок 2,5 % розчином натрію сульфату та н-гексаном, а також використання селективних та специфічних умов виявлення та кількісного визначення глібенкламід високочутливими методами ТШХ та ВЕРХ.

Корисна модель ілюструється прикладом.

Приклад 1.

50 г подрібненої печінки поміщають у колбу об'ємом 500 мл, додають 3 мл метанол-метиленхлоридного (1:1) розчину глібенкламід, що містить 20,0 мг речовини, перемішують, витримують протягом 24 год. за кімнатної температури, додають 50 мл ацетонітрилу, підкисленого 6 М розчином кислоти хлоридної до рН 2,0-2,5 (за універсальним індикатором), настоюють протягом 30 хв. при періодичному контролі рН середовища та фільтрують через фільтр марки "червона стрічка" у колбу об'ємом 100 мл. Операцію настоювання біологічного матеріалу підкисленим ацетонітрилом проводять тричі. Одержані вилучення об'єднують та

переносять у колбу об'ємом 1000 мл, що містить 300 мл 2,5 % розчину натрію сульфату. Вміст колби ретельно перемішують, підкислюють 6 М розчином кислоти хлоридної до рН 2,0-2,5, фільтрують через фільтр марки "червона стрічка" у ділильну колбу та двічі по 100 мл екстрагують н-гексаном по 10 хв. з використанням механічного струшувача. Після розшарування вміст колби переносять у ділильну лійку та відділяють органічний шар, який у подальшому не досліджують. Одержані водно-ацетонітрильні вилучення об'єднують, поміщають у ділильну колбу та тричі по 100 мл екстрагують хлороформом по 10 хв з використанням механічного струшувача. Після розшарування вміст колби переносять у ділильну лійку, органічний шар відділяють, фільтрують через паперовий фільтр з вмістом 5,0 г безводного натрію сульфату. Одержані хлороформні екстракти об'єднують, упарюють в потоці теплого повітря до об'єму 25 мл та використовують для досліджень.

Виявлення глібенкламід у одержаному екстракті проводять методом ТШХ на хроматографічних пластинках Merck silica gel 60 F₂₅₄ (Німеччина) розміром 10×10 см з використанням етилацетату, як загальної для похідних сульфонілсечовини системи розчинників, а також суміші етилацетат-кислота ацетатна льодяна (49,5:0,5) та суміші метилхлорид-етилацетат-кислота ацетатна льодяна (50:50:1), як індивідуальних для глібенкламід систем розчинників, а також специфічних реагентів: 1 % розчину ваніліну та 5 % розчину хлоралгідрату. Перед елююванням хроматографічні пластинки попередньо відмивають метанолом та активують в сушильній шафі при температурі 110-120 °С протягом 0,5 год. Висушену хроматографічну пластинку ділять на три частини, на лінію старту якої у вигляді точки в зону 1 та 2 наносять 10 мкл (1 мкг/мл) стандартних розчинів глібенкламід та кофеїну. У зону 3 смугою завтовшки 2 см наносять 1/4 частини хлороформного екстракту глібенкламід, одержаного з тканин печінки. При обробці 2-ої та 3-ої зон хроматографічної пластинки 1 % розчином ваніліну або 5 % розчином хлоралгідрату на хроматографічній пластинці візуалізуються індивідуальні плями зі значеннями R_f, співставними зі стандартним зразком глібенкламід (табл. 1). При цьому, в першому випадку забарвлення плями має бути фіолетовим, а в другому - зелено-коричневим.

Таблица 1

Параметри хроматографічної рухливості досліджуваних речовин

Система	Стандартна речовина глібенкламід	Хлороформний екстракт	Кофеїн*
Етилацетат	0,47	0,46	0,15
Етилацетат-кислота ацетатна льодяна (49,5:0,5)	0,64	0,63	0,23
Метилхлорид-етил ацетат-кислота ацетатна льодяна (50:50:1)	0,56	0,56	0,26

Примітка: * - хроматографічна система вважається придатною, якщо на хроматограмі чітко видно пляму кофеїну.

Очищення екстракту проводять методом ТШХ на хроматографічних пластинках Merck silica gel 60 F₂₅₄ (Німеччина) розміром 10×10 см. Хроматографічну пластинку ділять на три частини, на лінію старту якої у вигляді точки в зону 1 наносять 10 мкл (1 мкг/мл) стандартного розчину глібенкламід. У зони 2 і 3 смугою завтовшки 2 см наносять 1/4 частини хлороформного екстракту глібенкламід, одержаного з тканин печінки. Після хроматографування в етилацетаті пластинку висушують, а зони 1 і 2 обробляють специфічними проявниками: 1 % розчином ваніліну або 5 % розчином хлоралгідрату. У необробленій проявником зоні 3, в області відповідного глібенкламід значення R_f з пластинки скальпелем знімають шар сорбенту площею 3×1 см, який поміщають в скляний флакон, що містить 10 мл метилового спирту, струшують протягом 5 хв. і фільтрують через фільтр марки "червона стрічка". Одержаний елюат використовують для ВЕРХ досліджень.

Виявлення глібенкламід в метанольному елюаті та його кількісне визначення проводять методом ВЕРХ з УФ-детектуванням на рідинному хроматографі "Міліхром-А-02" з УФ-детектуванням (ЗАТ "Еконова", Новосибірськ). Для розділення речовин використовують обернено-фазову колонку Prontosil-120-5-C18-AQ розміром Ø2×75 мм, зерніння 5 мкм ("Bischoff Analysetechnik und Gerate GmbH", Німеччина). Градієнтне елюювання виконують шляхом змішування двох елюентів: елюент А - [0,2М LiClO₄-0,005М HClO₄], елюент Б - ацетонітрил кваліфікації "для ВЕРХ". Швидкість рухомої фази - 100 мкл/хв. Температура термостата колонки

-35 °С. УФ-спектрофотометричне детектування проводять одночасно при 8 довжинах хвиль: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 і 300 нм. Аналіз та обробку хроматограм здійснюють програмою "Аналітика-Chrom". Правильність методики періодично контролюють шляхом хроматографування спеціального контрольного багатокомпонентного розчину, що складається з бромід-іона, уридину, кофеїну, прозерину, м-нітроаніліну, п-нітроаніліну і трифтазину.

Виявлення глібенкламідів здійснюють за часом утримування. На фігурах 1 та 2 наведено хроматограми метанольного розчину стандартного зразка глібенкламідів та метанольного елюату, одержаного з тонкого шару. Піки речовин на відповідних хроматограмах мають бути співвідносними за часом утримування (t_R -9,99).

Для кількісного визначення глібенкламідів будують градувальний графік (Фіг. 3) залежності площі піку метанольного розчину стандартного зразка глібенкламідів від концентрації (мкг/мл), визначеної за довжини хвилі 230 нм.

Лінійність наведеного градувального графіку в координатах (S, ум. од.) - (C, мкг/мл) має бути в інтервалі 0,1-20,0 мкг/мл.

Методом лінійної регресії одержано рівняння градувальної прямої залежності площі піка (Y) від концентрації (X) загального вигляду: $y = bx + a$.

Метрологічні характеристики одержаної градувальної залежності наведено в таблиці 2.

Таблиця 2

Метрологічні характеристики градувальної залежності площі піку від концентрації

R	b	a	S^2	S	Δb	Δa
0,9997	0,0102	0,0013	$8,3803 \times 10^{-12}$	$2,895 \times 10^{-6}$	$1,175 \times 10^{-4}$	$9,440 \times 10^{-4}$

Методом найменших квадратів розраховані коефіцієнти регресії градувального графіка:

$$S = 0,0102 \times C + 0,00133,$$

де S - площа піку, ум. од.;

C - концентрація речовини, мкг/мл.

Встановлено, що вільний член рівняння градувального графіка при визначенні значущості істотно не відрізняється від нуля. Це обумовлює перехід рівняння до вигляду: $y = b \times x$. Тому, для визначення концентрації глібенкламідів в об'єктах дослідження застосовують рівняння вигляду: $S = 0,0102 \times C$. Результати кількісного визначення глібенкламідів в екстрактах, одержаних з тканин печінки, наведено в таблиці 3.

Таблиця 3

Метрологічні характеристики ізолювання глібенкламідів з тканин печінки (n = 5, P = 0,95)

\bar{x}	S	S_x	$\Delta \bar{x}$	ϵ	RSD, %
8,86	0,73	$3,29 \times 10^{-1}$	0,91	10,31	8,31

Таким чином, заявлений спосіб визначення глібенкламідів в біологічних об'єктах є більш специфічним для систематичних судово-токсикологічних досліджень направленою характеру при отруєнні даною речовиною, який включає: індивідуальний метод ізолювання глібенкламідів з тканин печінки доступним екстрагентом ацетонітрилом; заходи очищення первинних вилучень від домішок різної природи 2,5 % розчином натрію сульфату та н-гексаном; виявлення глібенкламідів методами ТШХ та ВЕРХ з використанням селективних для токсиканту систем розчинників: етилацетату, суміші етилацетат-кислота ацетатна льодяна (49,5:0,5) та суміші метиленхлорид-етилацетат-кислота ацетатна льодяна (50:50:1), а також специфічних і високочутливих реагентів: 1 % розчину ваніліну та 5 % розчину хлоралгідрату; кількісне визначення глібенкламідів селективним та високочутливим методом ВЕРХ.

Джерела інформації:

1. Паньків В.І. Глібенкламід в XXI веке: хорошо не забытое старое / В.І. Паньків // International journal of endocrinology. - 2010. - № 7 (31). - С. 63-70.

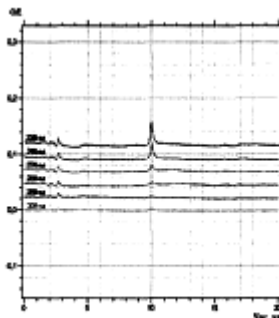
2. Решедько Г.К. Клиническое применение глибенкламида: вопросы безопасности и эффективности / Г.К. Решедько, Е.В. Хайкина // Проблемы эндокринологии. - 2012. - №3. - С. 65-69.

3. Usage the analytical screening of glibenclamide for chemical-toxicological analysis / T.V. Kucher, S.I. Merzlikin // Actual questions of development of new drugs. - X.: НФаУ, 2014. - С. 68.

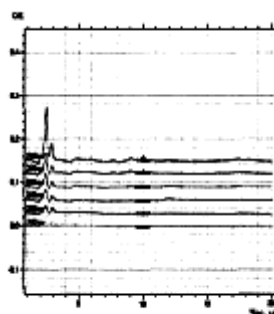
4. Ибрагимова М.М. К вопросу химико-токсикологического анализа гликлазида и метформина при их совместном применении // Астана медициналык, журналы. - 2014. - № 2. - С. 152-158.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

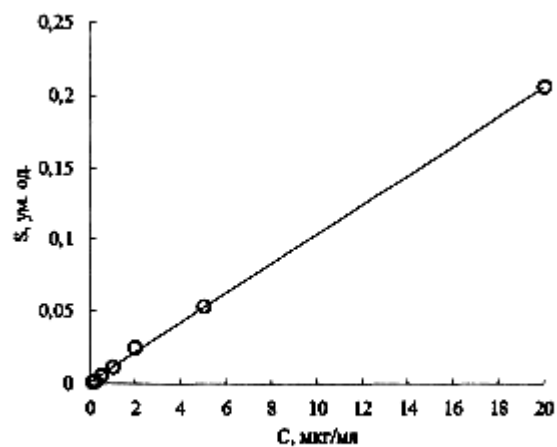
Спосіб визначення глібенкламід у біологічних об'єктах включає ізолювання глібенкламід з біологічних об'єктів підкисленим органічним розчинником, очищення одержаних вилучень та екстрактів від домішок різної природи, виявлення та кількісне визначення глібенкламід у екстрактах, який **відрізняється** тим, що ізолювання глібенкламід з біологічних об'єктів проводять ацетонітрилом, підкисленим 6 М розчином кислоти хлоридної до рН 2,0-2,5 з подальшим фільтруванням, очищення одержаного вилучення від органічних домішок 2,5 % розчином натрію сульфату та н-гексаном з подальшим екстрагуванням хлороформом; виявлення глібенкламід у хлороформному екстракті та очищення екстракту від співекстрактивних речовин проводять методом ТШХ з використанням як систем розчинників: етилацетату, суміші етилацетат-кислота ацетатна льодяна (49.5:0.5), суміші метилхлорид-етилацетат-кислота ацетатна льодяна (50:50:1), а також специфічних реагентів: 1 % розчину ваніліну та 5 % розчину хлоралгідрату; виявлення глібенкламід та кількісне визначення глібенкламід у екстрактах проводять методом ВЕРХ.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фіг. 3

Комп'ютерна верстка О. Рябко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601