

УДК 54.061:543.42.061:543.544:547.495.9:547.599

РОЗРОБКА МЕТОДИК ІДЕНТИФІКАЦІЇ НОВОГО АНТИГІПЕРГЛІКЕМІЧНОГО ФАРМАКОЛОГІЧНОГО ЗАСОБУ, СТВОРЕНОГО НА ОСНОВІ ДІАКАМФУ ТА МЕТФОРМІНУ

С.І.Мерзлікін, Д.Г.Подгайний

Національний фармацевтичний університет
61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53. E-mail: toxchem@ukrfa.kharkov.ua

Ключові слова: метаболічний синдром; цукровий діабет 2 типу; діакаμφ; метформін; ідентифікація

Розроблені методики ідентифікації нового антигіперглікемічного фармакологічного засобу, створеного на основі діакаμφ та метформіну з використанням методів тонкошарової хроматографії, спектрофотометрії та хімічних реакцій, які є придатними у процесі стандартизації його якості.

DEVELOPMENT OF THE IDENTIFICATION METHODS FOR A NEW ANTIHYPERGLYCEMIC PHARMACOLOGICAL REMEDY CREATED ON THE BASIS OF DIACAMF AND METFORMIN

S.I.Merzlikin, D.G.Podgayny

The identification methods for a new antihyperglycemic pharmacological remedy created on the basis of diacamf and metformin have been developed using the methods of thin-layer chromatography and spectrophotometry and chemical reactions, which are suitable in the process of its quality standardization.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ИДЕНТИФИКАЦИИ НОВОГО АНТИГИПЕРГЛИКЕМИЧЕСКОГО ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО СРЕДСТВА, СОЗДАННОГО НА ОСНОВЕ ДИАКАМФА И МЕТФОРМИНА

С.И.Мерзликин, Д.Г.Подгайный

Разработаны методики идентификации нового антигипергликемического фармакологического средства, созданного на основе диакамфа и метформина с использованием методов тонкослойной хроматографии, спектрофотометрии и химических реакций, которые являются приемлемыми в процессе стандартизации его качества.

Проблема метаболічного синдрому (МС) відноситься до найбільш актуальних проблем сучасної медицини та фармації. У першу чергу, це обумовлено широкою розповсюдженістю МС — до 20% у популяції. Крім того, виділення МС як окремого захворювання має велике клінічне значення, оскільки, з одного боку, цей стан є зворотним — при відповідному лікуванні можна призупинити розвиток його основних проявів, а з іншого боку, МС у 75% випадків обумовлює розвиток цукрового діабету (ЦД) 2 типу. На сьогодні терапію вищезазначених захворювань здійснюють за допомогою антидіабетичних засобів [1-6].

В основі розвитку ЦД 2 типу та проявів МС лежать такі патогенетичні ланки: зменшення чутливості тканин до інсуліну (інсулінорезистентність), зменшення секреторної функції β-клітин підшлункової залози та збільшення синтезу глюкози в печінці (глюконеогенез). Така гетерогенність вказаних захворювань обумовлює значні труднощі в їх терапії. Тому на теперішній час є актуальним одночасне застосування двох та більше антидіабетичних засобів з різним механізмом фармакологічної дії, що дає змогу позитивно одночасно впливати на декілька патогенетичних ланок захворювання. Як приклад вже створено ряд ком-

бінованих лікарських препаратів з фіксованими дозами: авандамет (метформін / розиглітазон), авандарил (розиглітазон / глібурид), глібомет (глібенкламід / метформін), метагліп (метформін / гліпізид), глюкованс (глібурид / метформін). Однак лікування даними препаратами не в повній мірі вирішує проблему МС та ЦД 2 типу, а високі дози діючих речовин зберігають їх побічні ефекти [7].

Одним з найчастіше призначуваних на сьогодні препаратів для лікування ЦД 2 типу та проявів МС є метформін — антидіабетичний засіб з групи бігуанідів, який застосовується для лікування ЦД 2 типу вже більше 50 років. Препарат збільшує чутливість периферичних тканин до інсуліну, знижує продукцію глюкози печінкою через вплив на глюконеогенез, знижує глікогеноліз [9, 10, 12]. Однак крім позитивної дії, застосування вказаного препарату супроводжується й побічними ефектами, такими як диспептичні розлади, металічний присмак тощо. Лактат-ацидоз розвивається рідко, але є серйозним ускладненням внаслідок прийому метформіну [11].

У Національному фармацевтичному університеті розроблено новий оригінальний антидіабетичний препарат “Діакаμφ” у вигляді таблеток (реєстраційне посвідчення на активну субстанцію

Результати розділення плям діакаμφу та метформіну на хроматографічних пластинках за методом ТШХ

Система розчинників	Показники Rf досліджуваних речовин		
	діакаμφ	метформін	фармацевтична композиція діакаμφу з метформіном
Бутанол - мурашина кислота - вода:*			
40:10:20	0,81	0,30	0,81 / 0,34
10:10:10	0,80	0,57	0,80 / 0,57
20:20:10	0,86	0,53	0,86 / 0,57
20:10:70	0,85	0,42	0,85 / 0,42
30:10:60	0,86	0,35	0,86 / 0,35
40:10:50	0,73	0,22	0,73 / 0,24
50:10:40	0,83	0,26	0,83 / 0,28
60:10:30	0,79	0,30	0,79 / 0,30
70:10:20	0,84	0,30	0,85 / 0,32
80:10:10	0,88	0,31	0,88 / 0,35
80:5:15	0,70	0,15	0,70 / 0,15
90:5:5	0,66	0,20	0,66 / 0,20
Бутанол - оцтова кислота - вода:**			
5:5:10	0,74	0,50	0,78 / 0,50
10:10:10	0,80	0,60	0,80 / 0,50
30:10:10	0,70	0,29	0,73 / 0,27
40:10:50	0,69	0,30	0,70 / 0,25
60:10:30	0,79	0,26	0,78 / 0,29
90:5:5	0,75	0,13	0,75 / 0,13
Етанол - мурашина кислота - вода (40:10:20)**	0,85	0,47	0,85 / 0,47
Ефір - мурашина кислота - етанол (90:7:10)*	0,75	0,07	0,73 / 0,09
Ацетон - мурашина кислота - етанол - вода:*			
10:7:5:3	0,88	0,65	0,88 / 0,65
45:7:10:12	0,92	0,65	0,93 / 0,65
Етанол - 25% р-н аміаку (100:1,5)*	0,12	0	0,12 / 0
Хлороформ - ацетон (2:1)*	0,86	0,27	0,75 / 0,08

Примітка: проявники - * пари йоду, ** розчин калію йодовісмутату Р2.

№UA/3130/01/01). Фармакологічний ефект діакаμφу зумовлений гіпоглікемічною (без ризику розвитку гіпоглікемії), гіполіпідемічною, антиоксидантною дією, здатністю підсилювати чутливість тканин до інсуліну та сприянням відновленню фізіологічної активності панкреатичних β -клітин [8].

У зв'язку з вищенаведеним є актуальним створення нового перорального фармакологічного засобу у вигляді капсул на основі активних речовин діакаμφу та метформіну у співвідношенні 125/250 мг відповідно. Проведені фармакологічні досліджен-

ня виявили, що в експериментальних тварин вказана фармацевтична композиція у порівнянні з монотерапією метформіном позитивно впливає практично на всі вищенаведені патогенетичні ланки ЦД 2 типу та МС при вдвічі менших у порівнянні з терапевтичними дозах активних речовин, що забезпечує зниження ризику розвитку побічних дій метформіну [13].

Метою даної роботи є розробка методик ідентифікації новоствореного фармакологічного засобу на основі діакаμφу та метформіну гідрохлориду

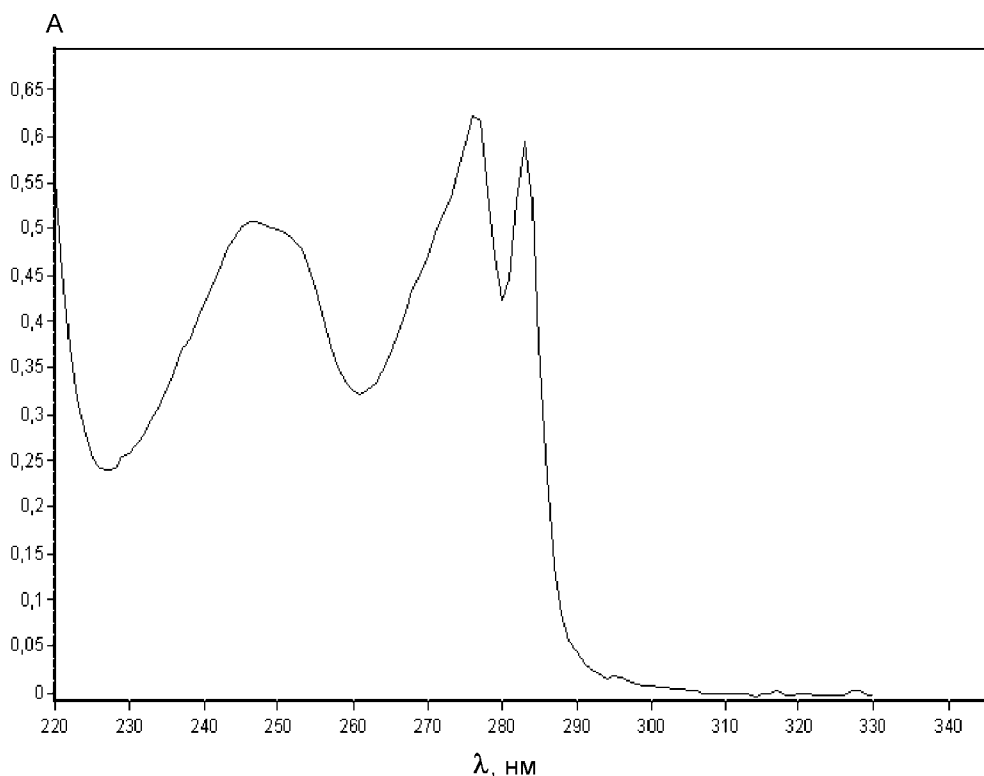


Рис. Уф-спектр поглинання 0,001% етанольного розчину діакаμφу.

із застосуванням хімічних та фізико-хімічних методів.

Для ідентифікації діакаμφу та метформіну гідрохлориду, що містяться в лікарській формі, використовували метод тонкошарової хроматографії (ТШХ). Зазначені дослідження проводили з використанням таких хроматографічних пластинок: “Сорбфіл ПТСХ-П-В” (силікагель СТХ-1ВЕ, фракція 8-12 мкм, тип основи — ПЕТФ, розмір пластинки — 10×15 см), “Merck” (силікагель G F₂₅₄) та на скляних пластинках для високоефективної ТШХ виробництва Естонії (силікагель — КСКГ, фракція — 5-20 мкм, товщина шару — 130±25 мкм, розмір пластинки — 20×20 см). Як рухомі фази використовували різні елююючі системи нейтрального, основного та кислотного характеру.

За результатами проведених досліджень виявлено, що з наведених хроматографічних пластинок більш придатною є Сорбфіл ПТСХ-П-В, при використанні якої було досягнуто достовірного розділення плям досліджуваних речовин та отримані надійні значення величин R_f. Одержані дані наведені в таблиці.

Встановлено, що в системі бутанол — оцтова кислота — вода (елюент на метформін, ЕР) при збільшенні об’ємного співвідношення бутанолу від 5 до 90 та води від 5 до 50 суттєвих змін величини R_f діакаμφу не відзначено, а співвідношення становило від 0,70 до 0,80. Значення величини R_f метформіну зменшилось від 0,60 до 0,13. При зменшенні вдвічі об’ємного співвідношення оцтової кислоти з 10 до 5 спостерігали зменшення R_f метформіну. Виявлено, що в даній системі

пляма метформіну у парах йоду майже не проявляється. При застосуванні калію йодовісмутату розчину Р2 плями діакаμφу та метформіну проявляються коричневим кольором протягом декількох секунд, після чого зникають. У системі бутанол — мурашина кислота безводна — вода при збільшенні об’ємного співвідношення бутанолу від 10 до 90 значення R_f діакаμφу суттєво не змінювалось, тоді як значення R_f метформіну зменшилось. Також при зменшенні об’ємного співвідношення води з 70 до 5 спостерігали зменшення R_f метформіну. Збільшення об’ємного співвідношення води в зазначеній системі призводило до збільшення значення R_f діакаμφу.

В інших системах, зазначених у таблиці, були одержані незадовільні значення R_f досліджуваних речовин та при проявленні хроматограм отримували плями продовгуватої форми. Так, у системі етанол — 25% розчин аміаку (100:1,5) метформін залишався на лінії старту. У системі ацетон — мурашина кислота — етанол — вода отримували незначне розділення речовин та надто великі значення R_f діакаμφу.

Найбільш оптимальні результати були одержані при хроматографуванні досліджуваних зразків у системі розчинників бутанол — мурашина кислота — вода (60:10:30) із значеннями R_f діакаμφу 0,79 та метформіну 0,30.

Для ідентифікації діакаμφу та метформіну вказані речовини необхідно було попередньо виділити з лікарської форми в індивідуальному вигляді. Відомо, що на відміну від діакаμφу метформін добре розчинний у воді. Тому для їх розділення

використовували саме воду. Одержаний водний розчин досліджували на наявність у ньому метформіну. Одержаний осад розчиняли в етанолі, який досліджували на наявність діакаμφу. Кольорову реакцію з розчином α -нафтолу Р на метформін та осадову на хлорид-іон метформіну гідрохлориду проводили згідно з ЕР [12]. Для ідентифікації метформіну запропоновано також біуретову реакцію. Для ідентифікації діакаμφу використовували реакцію утворення комплексної амонійної солі діакаμφу з розчином сульфату міді Р [14].

Спектрофотометричне виявлення діакаμφу проводили на спектрофотометрі СФ-46. Ультрафіолетовий спектр поглинання 0,001% етанольного розчину діакаμφу в діапазоні від 220 нм до 330 нм має три максимуми поглинання за довжин хвиль 247 ± 2 нм, 276 ± 2 нм і 283 ± 2 нм (рис.).

Експериментальна частина

Дослідження ТШХ-методом

Хроматографування досліджуваних зразків проводять у камері об'ємом 500 см^3 , в яку вносять 50 мл елюентів. Камеру насичують протягом 30 хв. Пластинки активують нагріванням при 110°C протягом 30 хв, 100 мг вмісту капсули вміщують у пробірку місткістю 20 мл, додають 5 мл 96% спирту етилового Р і збовтують протягом 10 хв. Фільтрують через паперовий фільтр "синя стрічка" в мірну колбу місткістю 10 мл та доводять об'єм розчину 96% спиртом етиловим Р до позначки (випробуваний розчин).

На лінію старту хроматографічної пластинки Сорбфіл ПТСХ-П-В на відстані 2 см від краю наносять 4 мкл (10 мкг діакаμφу та 20 мкг метформіну) випробуваного розчину, в другу точку — 4 мкл (10 мкг) розчину стандартного зразка речовини свідка (СЗРС) діакаμφу, в третю точку — 4 мкл (20 мкг) розчину СЗРС метформіну гідрохлориду та елюють у системі розчинників бутанол — мурашина кислота — вода (60:10:30). Довжина шляху пробігу розчинників складає 10 см. Після елюювання пластинку виймають з камери, висушують при температурі від 100 до 110°C та проявляють. Плями діакаμφу та метформіну виявляють парами йоду. Чутливість парів йоду для досліджуваних речовин становить 1 мкг у пробі.

На хроматограмі випробуваного розчину мають бути плями: на рівні плями розчину СЗРС діакаμφу та на рівні плями розчину СЗРС метформіну гідрохлориду відповідні їм за розміром та забарвленням.

Приготування розчину СЗРС діакаμφу. Близько 25 мг діакаμφу (точна наважка) розчиняють у 5 мл 96% спирту етилового Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

Приготування розчину СЗРС метформіну гідрохлориду. Близько 50 мг (точна наважка) метформіну гідрохлориду розчиняють у 5 мл 96% спирту етилового Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

Ідентифікація метформіну та діакаμφу хімічними реакціями

Вміст капсули (500 мг) вміщують у хімічний стакан місткістю 200 мл, додають 100 мл води, перемішують та відфільтровують через паперовий фільтр "синя стрічка". Одержаний фільтрат досліджують на метформін, а осад — на діакаμφу.

А. Ідентифікація метформіну гідрохлориду

1. 2 мл одержаного водного розчину доводять водою Р до 100 мл. До 2 мл отриманого водного розчину додають 0,25 мл натрію гідроксиду розчину концентрованого Р та 0,10 мл розчину α -нафтолу Р, перемішують та відстоюють у холодній воді протягом 15 хв. До розчину додають 0,50 мл розчину натрію гіпоброміту Р та перемішують. Розчин забарвлюється у рожевий колір (реакція на гуанідин). Чутливість реакції — 0,01 мг/мл.

2. До 2 мл одержаного водного розчину додають краплями натрію гідроксиду розчин концентрований Р з рН 10-11 та одну краплю купруму (II) сульфату розчин Р. З'являється рожево-фіолетове забарвлення (утворення комплексної мідної солі метформіну). Чутливість реакції — 0,5 мг.

3. 2 мл одержаного водного розчину підкислюють кислотою азотною розведеною Р, додають 0,4 мл розчину срібла нітрату Р1, перемішують та відстоюють. Спостерігають утворення білого сироподібного осаду, який розчиняється при додаванні 1,5 мл розчину аміаку Р (реакція на хлорид-іон).

Б. Ідентифікація діакаμφу

До одержаного осаду додають 10 мл 96% спирту етилового Р та збовтують протягом 10 хв. Осад відфільтровують, а етанольний розчин досліджують на діакаμφу.

1. До 2 мл одержаного розчину додають 2 мл розчину аміаку розведеного Р. Нагрівають до повного видалення запаху аміаку (червоний лакмусовий папір, змочений водою не повинен синіти в парах) та продовжують нагрівати ще протягом 4 хв, охолоджують та додають 1 краплю купруму (II) сульфату розчин Р. Утворюється осад блакитного кольору. Чутливість реакції — 5 мкг (реакція на карбоксильну групу).

2. 1 мл одержаного розчину доводять 96% спиртом Р до об'єму 10 мл. Ультрафіолетовий спектр поглинання одержаного розчину в області від 220 нм до 330 нм повинен мати три максимуми поглинання за довжин хвиль 247 ± 2 нм, 276 ± 2 нм і 283 ± 2 нм.

Висновки

1. Запропоновані хімічні реакції ідентифікації діакаμφу та метформіну гідрохлориду, а також метод спектрофотометрії для визначення діакаμφу, які придатні для стандартизації якості створеного комбінованого фармакологічного засобу.

2. Розроблено методику ідентифікації діакаμφу та метформіну гідрохлориду за методом ТШХ з отриманням достовірних значень R_f досліджуваних речовин.

Література

1. Brunzell J.D., Ayyubi A.F. // *Am J. Med.* — 2003. — №8. — P 24-28.
2. Парфенова Н.С. // *Росс. кардиол. журн.* — 1998. — №2. — С. 42-48.
3. Reaven G.M. // *Diabetes.* — 1988. — №37. — P. 1595-607.
4. Lopez-Candales A. // *J. Med.* — 2001. — №32. — P. 283-300.
5. Szapary P.O., Hark L.A., Burke F.M. // *Patient Care.* — 2002. — №36. — P. 75-88.
6. Darwin Deen M.D., M.S. // *American Family Physician.* — 2004. — Vol. 69, №12. — P. 2875-2882.
7. Пат. WO 2005/065663 A1 (2005). США. — Опубл. 21.07.2005.
8. Пат. 2205826 (2000). Рос. Федер. — Опубл. 10.06.03. — Бюл. №16.
9. Kenneth Cusi, De Fronzo R.A. // *Diabetes Reviews.* — 1998. — №6. — P. 89-131.
10. Giannarelli R., Aragona M., Coppelli A., Del Prato S. // *Diabetes Metabolism.* — 2003. — Vol. 29 — P. 6S28-6S35.
11. Misbin R.I., Green L., Stadel B.V. et al. // *New Engl. J. Med.* — 1998. — Vol. 338. — P. 265-266.
12. *European Pharmacopoeia.* — 4-th ed. — Strasbourg: Council of Europe, 2001. — P. 1548-1549.
13. Мерзликін С.І., Соколюк Т.В. // *Фармакологія 2006 — крок у майбутнє: Тези доп. III Нац. з'їзду фармакологів України 17-20 жовтня 2006 р.* — Одеса: Одеський медичний університет, 2006. — С. 222.
14. Мерзликін С.И., Черных В.П., Болотов В.В. и др. // *ФАР.* — 2000. — №1 (29). — С. 32-34.

Надійшла до редакції 13.05.2008 р.