

К ВОПРОСУ СУДЕБНО-ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА РЯДА АНТИДИАБЕТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

М.М. ИБРАГИМОВА

Государственное казенное учреждение «Республиканское бюро судебно-медицинской экспертизы» Министерства здравоохранения Чеченской Республики, Российская Федерация

Данная работа посвящена разработке методик изолирования ряда антидиабетических препаратов – производных сульфонилмочевины (ПСМ) – глибенкламида, глимепирида, гликлазида, гликвидона и глипизиды из биологических объектов (крови, мочи и внутренних органов). В связи с тем, что ПСМ обладают кислотными свойствами, методика их изолирования основывается на экстракции хлороформом из кислых растворов. В качестве метода очистки предложена хроматография в тонком слое сорбента (ТСХ). Для обнаружения ПСМ применили методы: ТСХ, ТСХ в системе ТОХИ-LAB АВ, УФ-спектрофотометрию)

Ключевые слова: сахарный диабет, судебно-химический анализ, токсикология, производные сульфонилмочевины.

TO THE ISSUE OF FORENSIC CHEMICAL ANALYSIS OF A NUMBER OF ANTIDIABETIC DRUGS

М.М. IBRAGIMOVA

State Treasury Institution "Republican Bureau of Forensic Medical Examination" of the Ministry of Health of the Chechen Republic, Russian Federation

This study focuses on the development of methods for the isolation of a number of anti-diabetic drugs - sulfonylureas - glyburide, glimepiride, gliclazide, glipizide and gliquidone from biological specimens (blood, urine, and internal organs). Due to the fact that sulfonylureas have acidic properties, methods of isolation based on chloroform extraction from acidic solutions. As an elimination method thin-layer chromatography (TLC) is suggested. TLC, TLC in system of TOXI-LAB АВ, UV-spectrophotometry were used for the detection of sulfonylureas.

Key words: diabetes mellitus, forensic chemical analysis, toxicology, sulfonylurea derivatives.

Сахарный диабет (СД) является одним из самых распространенных эндокринных заболеваний. По данным ВОЗ, в последние 30 лет отмечается резкий рост заболеваемости населения СД, при этом каждые 10-15 лет количество таких больных удваивается. На сегодняшний день от него страдает 7% населения планеты [1; 2]. Общая численность пациентов с СД в Российской Федерации (85 регионов с учетом 6 регионов по данным Росстат) на 31.12.2016 г. составила 4,348 млн человек (3% населения РФ), из них: СД 2 типа – 92% (4 001 860 чел.) [7].

Несмотря на приведенные статистические данные, экспертная практика показывает, что СД в судебно-медицинском диагнозе (в качестве основной или сопутствующей патологии)

встречается крайне редко. Поэтому отмечается явное несоответствие: с одной стороны – высокий уровень заболеваемости СД в мире с высоким процентом смертности от его осложнений, а с другой низкая частота встречаемости данного диагноза. Очевидно, что среди судебно-медицинских экспертов наблюдается недооценка СД как причины смерти [4].

В посмертной диагностике СД большое значение имеет выявление признаков его острых осложнений, диабетической комы (ДК), к разновидностям которой относится гипогликемическая кома. При посмертной диагностике ДК возникают затруднения, обусловленные тем, что основной критерий – уровень глюкозы в крови и моче не является достоверным, так как на него

могут влиять множество факторов, некоторые из которых: стрессовое состояние непосредственно перед смертью, наличие в организме отравляющих веществ, особенно большого количества алкоголя, быстрое переохлаждение, давность смерти, а также передозировка антидиабетическими препаратами [5].

В первой половине XX века была случайно обнаружена способность антибактериальных сульфаниламидных препаратов снижать сахар в крови. И тогда был начат целенаправленный поиск производных сульфаниламидов с выраженным гипогликемическим эффектом. С тех пор было синтезировано три поколения препаратов сульфонилмочевины. Вот уже 50 лет они широко используются при лечении ИНСД. Основными звеньями патогенеза в развитии ИНСД являются инсулинорезистентность, нарушение секреции инсулина и избыточная продукция глюкозы печенью [7].

К ПСМ относятся сульфаниламидные препараты II генерации: глибенкламид (манинил, суточная доза – 5-20 мг), глипизид (минидиаб, суточная доза 1,25-25 мг), гликлазид (диамикрон, преддиан, диабетон, суточная доза 80-320 мг), гликвидон (глюренорм, суточная доза 30-120 мг), глимепирид (амарил, суточная доза 18 мг в сутки). Продолжительность действия сульфаниламидов — от 10 до 24 ч. Необходимо учитывать, что почти все сульфаниламидные препараты выводятся почками, за исключением гликвидона, выводящегося из организма преимущественно кишечником (95%), поэтому последний может использоваться при почечной недостаточности [2; 3, 5-9].

ПСМ в состоянии приводить к снижению концентрации глюкозы в крови вплоть до тяжелых, иногда затяжных форм гипогликемии с комой и летальным исходом. Причинами тому могут быть не только передозировка препаратами, но и ошибочное показание к применению, ограниченная функция печени и почек, алкоголизм, лекарственные взаимодействия и т.д [5].

Данные последних исследований подтверждают, что у людей, страдающих сахарным диабетом, часто бывает ряд психологических проблем и психических расстройств. Большое значение в развитии психических нарушений при сахарном диабете многие исследователи (психиатры) придают именно гипогликемическим со-

стояниям. При этом наиболее часто отмечаются повышенная эмоциональность, лабильность настроения со склонностью к депрессиям. Описаны депрессивные состояния с аффектом тоски, психомоторной заторможенностью, идеями суицида. Из судебно-медицинской практики и доступной нам литературы известны случаи как непреднамеренных отравлений ПСМ, так и с целью суицида, поэтому они входят в перечень наименований токсических веществ, наиболее часто встречающихся при острых отравлениях. Участвовавшие интоксикации ПСМ являются следствием его широкого распространения и бесконтрольного применения [9].

Патологоанатомический диагноз сахарного диабета вообще и гипогликемической комы в особенности представляет значительные затруднения. Отсутствие каких-либо морфологических изменений на секции не позволяет диагностировать отравление пероральными антидиабетическими препаратами как основную причину смерти.

В связи с этим для судебно-медицинского заключения и диагностики отравлений решающее значение приобретают результаты судебно-химического исследования биологических жидкостей и внутренних органов трупа человека.

В настоящее время в судебно-химических лабораториях Российской Федерации наиболее широко применяются такие методы судебно-химического анализа, как: тонкослойная хроматография, УФ-спектрофотометрия.

Цель. Вышесказанное явилось основанием для разработки методик исследования объектов биологического происхождения на наличие ПСМ, позволяющих с наибольшей доказательностью решать вопросы экспертной практики.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования были использованы модельные смеси крови, мочи и печени трупов людей, погибших от механических травм, без видимых гнилостных изменений, с субстанциями ПСМ с чистотой 99,3-99,91%.

Серии экспериментов по исследованию искусственных смесей крови и мочи проводили следующим образом: каждая серия включала в себя 5 опытов по 10 мл крови и по 50 мл мочи, содержащие известные количества исследуемых препаратов, и контрольный опыт (незатравлен-

ная кровь и моча). Изолирование препаратов из крови и мочи основывалось на подкислении объектов 2 н. раствором хлористоводородной кислоты до pH 2,0 и трехкратной экстракции хлороформом.

Для разработки метода изолирования ПСМ из внутренних органов проводили серию экспериментов по исследованию искусственных смесей, которая включала в себя 5 опытов по 100 г печени, содержащие известные количества исследуемых препаратов и контрольный опыт (незатравленная печень). Разработанная методика включала изолирование ПСМ трехкратным настаиванием ацетоном, трехкратную экстракцию из кислых водных растворов (pH 2,0) хлороформом и очистку методом ТСХ. В качестве растворителя при очистке ПСМ от соэкстрактивных веществ использовали этанол.

Элюат, полученный после хроматографической очистки, делили на три части и проводили

обнаружение ПСМ методами: ТСХ на пластинках с закрепленным слоем сорбента и в системе TOXI-LAB AB, УФ-спектрофотометрией.

Качественный анализ ПСМ

1. Обнаружение ПСМ методом ТСХ на пластинках с закрепленным слоем сорбента

Метод тонкослойной хроматографии основан на разделении лекарственных веществ в тонком слое сорбента с последующим выявлением (детектированием), экспонированием в УФ-свете, проведением реакций окрашивания и измерением величин R_f .

Основным преимуществом метода ТСХ перед остальными разновидностями распределительной хроматографии является более быстрое разделение веществ, устойчивость слоя сорбента-носителя по отношению к агрессивным проявителям и нагреванию, возможность изготовить тонкослойные пластинки с любой толщиной слоя.

Таблица 1. Значение R_f ПСМ в зависимости от использования различных пластинок в системе хлороформ: ацетон (9:1)

Название препарата	Хроматографические пластинки	
	Силу фол	Сорбфил
Глибенкламид	0,56-0,59	0,58-0,61
Глимепирид	0,33-0,37	0,36-0,39
Гликлазид	0,62-0,66	0,66-0,70
Гликвидон	0,70-0,74	0,72-0,76
Глипизид	0,11-0,15	0,14-0,17

Таблица 2. Реактивы, использованные для обнаружения зон локализации ПСМ методом ТСХ

Название реактива	Окрашивание ПСМ				
	I	II	III	IV	V
Раствор дифенилкарбазона в хлороформе с раствором сульфата ртути	темно-синее пятно на голубом фоне	темно-синее пятно на голубом фоне	темно-синее пятно на голубом фоне	темно-синее пятно на голубом фоне	темно-синее пятно на голубом фоне
Пары йода	коричневое	коричневое	коричневое	коричневое	коричневое
Реактив Бушарда	коричневое	коричневое	коричневое	коричневое	коричневое
Реактив Драгендорфа, модифицированного по Мунье	оранжевое	оранжевое	оранжевое	оранжевое	оранжевое
Реактив Либермана	оранжевое	-	желтое	-	-
Раствор нитрата ртути	черное	-	черное	-	черное
10% раствор фосфомолибденовой кислоты в метаноле	-	-	темно-зеленое	-	-
1% нитрат кобальта в этаноле	-	-	-	фиолетовое	-

Примечание: I – глибенкламид, II – глимепирид, III – гликлазид, IV – гликвидон, V – глипизид.

С этой целью мы провели сравнительное изучение различных систем растворителей для развития хроматограмм и проявителей для выбора наиболее целесообразного реактива для установления пятен ПСМ. Исследования проводили на пластинках с закрепленным слоем сорбента «Силуфол» и «Сорбфил».

Для подтверждения ПСМ в местах их локализации было исследовано отношение его более чем к 25 реактивам.

Полученные данные этих исследований приведены в таблицах 1 и 2.

2. Обнаружение ПСМ методом ТСХ в системе TOXI•LAB AB

В настоящее время одним из примеров лаборатории, сочетающей пробоподготовку объектов с последующим определением токсикологически значимых веществ и их метаболитов методом ТСХ, является система TOXI•LAB AB, выпускаемая фирмой Agilent Technologist (США). Процедура анализа состоит из нескольких стадий (экстракция; концентрирование; нанесение пробы на пластинку; хроматографическая разгонка, или разделение; детектирование; идентификация) [1].

Проводили серию экспериментов по исследованию искусственных смесей крови и мочи. С этой целью к 4,5 мл крови и 5 мл мочи добавляли некоторое количество препарата. Экстракцию осуществляли в специальных экстракционных пробирках TOXI-Tube B, наполненных органической фазой и высаливающим реагентом (специальные патентованные устройства). При использовании этих пробирок учитывали тот факт, что их содержимое имеет pH 4,5. Ранее нами было установлено, что максимальные количества ПСМ экстрагируются в сильноокислой среде, поэтому перед использованием TOXI-Tube B проводили дополнительное подкисление их содержимого концентрированной хлористоводородной кислотой.

Концентрирование выделенного препарата проводили на специальные диски (TOXI-Disk A и TOXI-Disk B), выполненные из того же материала, что и хроматографическая пластинка (TOXI-Gram A и TOXI-Gram B). Диски помещали в концентрационные колпачки, в которые переносили органическую фазу, после чего органический

растворитель упаривали до тех пор, пока диски не высохнут. Далее диск с концентрированной пробой запрессовывали в пластинку при помощи препаровальной иглы. Кроме того, на линии старта помещали диски с нанесенными стандартными образцами ПСМ.

Хроматографическое разделение проводили в специальных стеклянных камерах. В качестве подвижной фазы использовали смесь органических растворителей. Состав подвижной фазы А: этилацетат – метанол – вода (1; 3; 5; 7; 8). Состав подвижной фазы В: дихлорметан – этилацетат (60:40). В каждую подвижную фазу добавляли необходимое количество 25% аммиака, которое указано на этикетках склянок, предназначенных для хранения хроматографических пластинок.

Детектирование осуществляли путем последовательной обработки хроматограммы специфическими реагентами. Процесс хроматографирования контролировали, отслеживая перемещение розовых пятен маркеров; пластинки оставляли в камерах до тех пор, пока розовые пятна маркеров не поднимутся на высоту 9,5 см (приблизительно 12–17 мин). После завершения процесса хроматографирования пластинки высушивали до удаления запаха органических растворителей и аммиака. Детектирование производили последовательным проявлением химическими реагентами и просмотром пластинки в УФ-области.

Идентификацию компонентов проводили по совокупности величины R_f и цвета пятна на различных стадиях детектирования путем сравнения со стандартным образцом.

Пластины TOXI-Gram A проходили несколько этапов детектирования: I – реактив А-1 – пары 37% раствора формальдегида; реактив А-2 – концентрированная серная кислота (95–98%); II – реактив H_2O ; III – просмотр пластинки в УФ-свете (365 нм); IV – реактив А-3 – модифицированный реактив Драгендорфа (Табл. 3-4). Пластины TOXI-Gram B тоже проходили несколько этапов детектирования: I – реактив В-1 – раствор дифенилкарбазона в дихлорметане; II – реактив В-2 – раствор нитрата серебра; III – реактив В-3 – раствор сульфата ртути; IV – просмотр пластинки в УФ-свете (365 нм).

Полученные данные этих исследований приведены в таблице 3.

Таблица 3. Значение Rf ПСМ в системе TOXI-LAB AB

Название препарата	TOXI-LAB A	TOXI-LAB B
Глибенкламид	0,14 – 0,20	0,36 – 0,42
Глимепирид	0,23 – 0,28	0,39 – 0,43
Гликлазид	0,18 – 0,22	0,60 – 0,64
Гликвидон	0,26 – 0,32	0,68 – 0,71
Глипизид	0,05 – 0,10	0,16 – 0,20

Таблица 4. Окрашивание мест локализации ПСМ в системе TOXI-LAB A

Название препарата	Окрашивание ПСМ			
	Стадия I	Стадия II	Стадия III	Стадия IV
Глибенкламид	-/слабо-розовый оттенок	-	абсорбция сиреневого цвета	оранжево-коричневое
Глимепирид	-	-	абсорбция сиреневого цвета	оранжево-коричневое
Гликлазид	розовый оттенок	-	абсорбция сиреневого цвета	оранжево-коричневое
Гликвидон	розово-фиолетовый	-	абсорбция сиреневого цвета	оранжево-коричневое
Глипизид	-	светло-желтый	абсорбция сиреневого цвета	оранжево-коричневое

Примечание: «-» – отрицательный результат.

Результаты исследований ПСМ с системе TOXI-LAB AB показали, что несмотря на то, что ПСМ экстрагируются только TOXI-Tube B, идентификацию можно проводить на пластинках TOXI-Gram A и B и в соответствующих системах. По данным таблицы 3 видно, что данный метод пригоден для ТСХ-скрининга ПСМ. После детектирования TOXI-Gram B раствором сульфата ртути наблюдали сине-фиолетовое окрашивание, а после просмотра пластинки в УФ-свете (365 нм) – абсорбцию синего цвета. Окрашивание пластинок TOXI-Gram A на различных стадиях детектирования представлено в таблице 4.

3. Обнаружение ПСМ методом УФ-спектрофотометрии

Исследования осуществляли на спектрофотометре UV-VIS - 8453 фирмы Agilent Technologies в пределах длин волн 220-400 нм. В качестве растворителей использовали этанол, метанол, 0,1 н. раствор гидроксида натрия, 0,1 н. раствор хлористоводородной кислоты. Растворы ПСМ для определения спектров поглощения готовили следующим образом: в ряд пробирок вносили 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 мл 0,01% раствора ПСМ (в одном из вышеуказанных растворителей). Объем растворов в пробирках доводили соответ-

ствующим растворителем до 10 мл и тщательно перемешивали, после чего измеряли оптическую плотность этих растворов, а также 0,01% раствора ПСМ, в области длин волн 200-350 нм. Раствором сравнения служил растворитель, соответствующий использованному при приготовлении растворов ПСМ.

Полученные данные этих исследований приведены в таблице 5.

Максимумы поглощения при данных длинах волн при исследовании в описанных условиях в контрольной пробе (не содержащей ПСМ) не наблюдали.

Проведенные опыты показали, что извлечения из биологического материала, не содержащие ПСМ, не дают идентичных результатов. Предлагаемую методику изолирования и обнаружения ПСМ апробировали на крови и моче больных и на экспертном материале, т.е. крови, моче и внутренних органах людей, умерших от передозировки данными препаратами.

Выводы. Проведенные исследования позволили сделать заключение о пригодности данных методов изолирования и обнаружения ПСМ в биологических объектах. Данные методы универсальны, надежны и методически просты, не

Таблица 5. УФ-спектрофотометрические характеристики ПСМ

Название препарата	Максимумы длин волн λ_{max} ПСМ, в нм			
	Этанол	Метанол	0.1 N NaOH	0.1 N HCl
Глибенкламид	275, 300	275, 300	275, 300	-
Гликлазид	228, 263	228, 263	229, 263	227
Гликидон	311	311	276	*
Глипизид	275	274	-	231, 276
Глимепирид	227, 274	227, 274	*	*

Примечание: * – результаты исследований отсутствуют

требуют проведения длительной и сложной пробоподготовки, позволяют анализировать большое количество образцов, могут эффективно

применяться для скрининговых исследований, а также позволяют определять субмикроколичества ПСМ в исследуемых объектах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арзамасцев А.П., Раменская Г.В., Родионова Г.М., Кузнецова Н.И., Петухов А.Е. ТСХ-скрининг токсикологически значимых соединений, изолируемых экстракцией и сорбцией: учеб. пособие для самостоят. подгот. студентов, обучающихся по специальности «Фармация – 060108». М: ГЭОТАР-Медиа 2009;216.
2. Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., Креминская В.М. Лечение сахарного диабета и его осложнений. Москва 2005;512.
3. Демидова И.Ю. Фармакотерапия сахарного диабета II типа Русский медицинский журнал. Москва: ММА им. И.М. Сеченова 1999;7(7):1-11.
4. Лаврентюк Г.П. Сахарный диабет: посмертная диагностика (информационные материалы для судебно-медицинских экспертов). Санкт-Петербург 2011;47
5. Николаев Б.С., Кинле А.Ф., Самаркина О.Ю. О возможности посмертной диагностики сахарного диабета Судебно-медицинская экспертиза. Москва 2010;5:39-40.
6. Панкиев В.И. Рациональное назначение производных сульфонилмочевины у больных сахарным диабетом 2-го типа Международный эндокринологический журнал 2012;3(43):55-58.
7. Дедов И.И., Шестакова М.В., Викулова О.К. Эпидемиология сахарного диабета в Российской Федерации: клиникостатистический анализ по данным Федерального регистра сахарного диабета Сахарный диабет. Москва 2017;20(1):13-41.
8. Старкова Н.Т. Клиническая эндокринология. Руководство. 3-е изд., переработанное и дополненное. Санкт-Петербург: Питер. 2002.
9. Шестакова М.В. Возвращение к метформину в лечении сахарного диабета 2 типа Фармация. Москва 1998;4:61-62.
10. Nagashima K., Takahashi A., Ikeda H., Hamasaki A., Kuwamura N., Yamada Y., Seino Y. Sulfonylurea and non-sulfonylurea hypoglycemic agents: pharmacological properties and tissue selectivity. Diabetes research and Clinical Practice 2004;66:S75-78.

Сведения об авторе:

М.М. Ибрагимова – доктор фармацевтических наук, заведующая судебно-химического отделения Государственного казенного учреждения «Республиканское бюро судебно-медицинской экспертизы» Министерства здравоохранения Чеченской Республики, Россия.

Author information

M. Ibragimova – DSc, Head of Forensic Chemical Department of Republican Bureau of Forensic Medical Examination, Chechen Republic, Russian Federation.