

происшествия без привлечения врача судебно-медицинского эксперта, или сотрудника правоохранительных органов с достаточной осведомленностью в данном вопросе, может привести к утрате важных данных, необходимых для полноценного исследования случая смерти.

5. В дальнейшем нами планируется продолжение комплексного изучения клиники по всеми имеющимся в нашем распоряжении источникам морфологических изменений на макро- и микроуровне, а также изучение биохимических показателей креатинина и мочевины крови для диагностики острой почечно-печеночной недостаточности, развитие которой возможно на фоне острого отравления синтетическими ПАВ.

В. В. Кожухова, Т. А. Сагайдак, О. И. Соколова

ИЗОЛИРОВАНИЕ МЕТФОРМИНА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА, ЕГО ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

*ГБУЗ Свердловской области
«Бюро судебно-медицинской экспертизы»,
г. Екатеринбург»*

В настоящее время во всем мире наблюдается неуклонный рост уровня заболеваемости сахарным диабетом. Среди заболеваний чаще чем сахарный диабет ежегодно диагностируются сердечнососудистые и онкологические патологии.

Основным антигипергликемическим препаратом при лечении сахарного диабета 2 типа является метформин (N,N-диметилбигуанид). Он относится к пероральным противодиабетическим препаратам, которые вызывают значительное снижение массы тела у больных диабетом, страдающих ожирением.

Препарат понижает аппетит, усиливает анаэробный гликолиз, уменьшает всасывание глюкозы из желудочно-кишечного тракта, оказывает гиполипидемическое и фибринолитическое действие. Метформин (гликон, глюкофаг, сиофор и др.) выпускается в виде таблеток по 0,5 г [1].

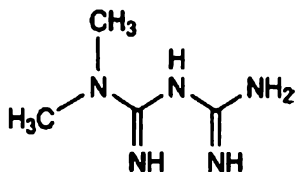


Рис. 1. Химическая формула метформина

Физико-химические свойства: метформин представляет собой белый кристаллический порошок, легко растворимый в воде, растворимый в спирте, практически нерастворимый в хлороформе, эфире.

Особенности фармакинетики: метформин быстро всасывается из ЖКТ. Абсолютная биодоступность (натощак) составляет 50–60%. Стах в плазме достигается через 2 ч. Прием пищи понижает Стах на 40% и замедляет ее достижение на 35 мин. Связывание метформина с белками плазмы незначительно, о чём свидетельствует очень высокий объём распределения (654 ± 358 л после однократной дозы 850 мг). Стабильный эффект обычно достигается через один или два дня. Способен накапливаться в слюнных железах, печени и почках. Выводится почками (преимущественно путем канальцевой секреции) в неизменном виде (90 % за сутки). Почечный клиренс – 350–550 мл/мин. T1/2 составляет 6,2 ч (плазма) и 17,6 ч (кровь) (разница объясняется способностью кумулировать в эритроцитах). У пожилых пролонгируется T1/2 и увеличивается Стах. При нарушении функции почек удлиняется T1/2 и уменьшается почечный клиренс [2].

В практике судебно-химических исследований возникает необходимость в определении данного лекарственного средства в биологическом материале. В последнее время в судебно-химическом отделении имели место четыре случая обнаружения метформина в биообъектах. На исследование поступили печень, почка, мышца, желудок от трупов гр-ки С. 1950 г.р., гр-на М. 1967 г.р., гр-на К. 1971 г.р., гр-ки В. 1937 г.р., умерших в стационарах больниц (время пребывания от 1 ч 50 мин до двух койко-дней). Предварительный судебно-медицинский диагноз во всех четырех случаях был поставлен, как «отравление лекарственными препаратами (метформин)». Вопросы, подлежащие разрешению при исследовании: «Определить наличие и концентрацию лекарственных веществ (метформин)». Таким образом, для решения задачи, извлечения лекарственных веществ, в т. ч. мет-

форма. из биоматериала, первоначально был использован метод изолирования водой, подкисленной щавелевой кислотой, с последующей экстракцией хлороформом при pH 9-10 (метод А. А. Васильевой) и метод изолирования подкисленным этанолом с последующей экстракцией хлороформом при pH 9-10 (метод Стаса-Отто) [4]. В ходе судебно-химического исследования биообъектов на наличие в них метформина во всех четырех случаях по данным методикам был получен отрицательный результат. Поэтому, исходя из физико-химических свойств метформина (низкомолекулярное соединение, хорошо растворимое в воде и спирте, незначительно связывается с белками плазмы) для его изолирования была апробирована экстракция водой в сочетании с диализом [3, 5, 6].

Методика изолирования: 20 г биологического объекта измельчались, смешивались с небольшим количеством дистиллированной воды до кашицеобразного состояния и помещались во внутренний стакан диализатора. Во внешний стакан до уровня навески наливалась дистиллированная вода, и смесь в течение трех часов настаивалась, затем диализат сливался. Настаивание при тех же условиях проводилось еще раз. Диализаты объединялись, помещались в фарфоровую чашку, выпаривались до сухого остатка на водяной бане. Сухой остаток растворялся в 10 мл этилового спирта. Очистку извлечения проводили путем реэкстракции 0,01 N раствором соляной кислоты.

Для идентификации метформина, выделенного из биологического материала, были использованы методы хроматомасс-спектрометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

ГХ-МС: 1 мл диализата выпаривался в токе теплого воздуха досуха. Сухой остаток реэкстрагировался 1 мл 0,01 N раствором соляной кислоты, реэкстракт выпаривался в токе теплого воздуха до сухого остатка. К сухому остатку добавлялось 0,2 мл дериватирующей смеси (безводный этилацетат : трифторуксусный ангидрид 1:1), бюкс закрывался и нагревался при 60° C в течение 20 минут. По истечении времени бюкс охлаждался при закрытой крышке до комнатной температуры, после чего содержимое выпаривалось досуха. Сухой остаток растворялся в 0,5 мл безводного этилацетата. 1 мкл полученного раствора исследовался на газовом хроматографе «Agilent Technologies 5890N», оснащенном масс-селективным детектором «Agilent Technologies 5975C; капиллярная колонка HP – 5 MS, диаметром 0,25 мм, толщиной пленки 0,25 мкм, длиной 30 м). Условия хроматографического исследования: газ-носитель – гелий, скорость газового потока 1 мл/мин (давление 8,80 psi температура инжектора 250° C, темпера-

турное программирование колонки: начальная температура 70 °С в течение 2 минут, затем подъем температуры со скоростью 15 °С/мин до конечной температуры 290 °С. Время анализа 25 минут. Проба объемом 1 мкл вводилась в колонку хроматографа с помощью микрошприца без деления потока газа-носителя, время открытия клапана (время отсечки растворителя) 5 минуты. Масс-детектор работает в режиме электронного удара при 70 эВ. Масс-спектр снимался в режиме сканирования ионов от 45 до 550 абсолютных единиц массы по величине отношения массы к заряду (m/z). С помощью программного обеспечения GC/MSD ChemStation и Amdis проводилось интегрирование хроматографических пиков, библиотечный поиск-сравнение масс-спектра неизвестного вещества с информацией собранных в библиотеках справочных спектрограмм. При анализе хроматограммы файла идентифицировался пик Metformine 2 TFA со временем удерживания 8,05 мин, с масс-спектром m/z 303, 288, 69, 125, 96, 234, 206, 259, 274.

ВЭЖХ-МС: анализ проб методом ВЭЖХ-МС проводили при следующих условиях: элюент метанол – 0,1 % муравьиная кислота (10:90), скорость подачи элюента 0,15 мл/мин, изократический режим, температура термостата колонки 35 °С, диодно-матричный детектор работал с регистрацией УФ-спектров от 190 до 400 нм с выделением аналитической длиной волны 240 нм (рис. 2); масс-спектрометрический детектор работал в режиме электростатической ионизации с регистрацией положительных ионов от 100 до 500 а.е.м с напряжением на фрагментаторе 100 V (режим SCAN), с регистрацией положительного протонированного молекулярного иона 130 а.е.м с напряжением на фрагментаторе 80 V (режим SIM), поток азота в источник ионов 5,0 л/мин, давление на небулайзере 60 psi, температура осушающего газа 350 °С, температура испарителя 150 °С, напряжение на капилляре 2000 V, напряжение на заряжающем электроде 2000 V (рис. 3). Количественное определение метформина проводили методом абсолютной калибровки на затравках печени, используя следующие концентрации метформина 0,2; 0,5; 1,0; 3,0; 7,0; 10,0 мкг/мл, коэффициенты корреляции $k(\text{DAD})=0,99963$, $k(\text{MSD})=0,99948$.

В ходе определения метформина на модельных смесях процент изолирования его диализом составил более 90 %. При исследовании поступивших на экспертизу биообъектов (печень, почка, мышца, желудок) наибольшее количество метформина было определено в почке.

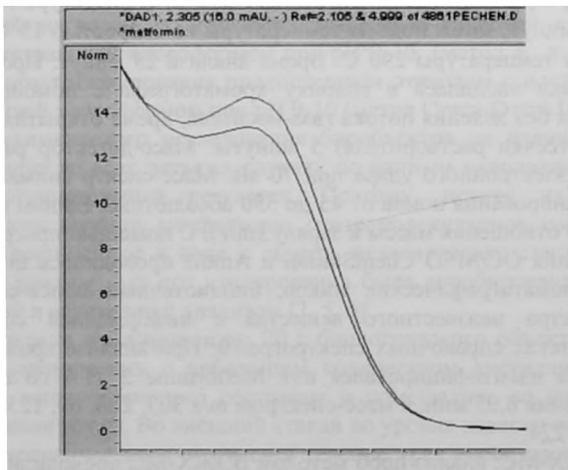


Рис. 2. Наложение УФ-спектров метформина

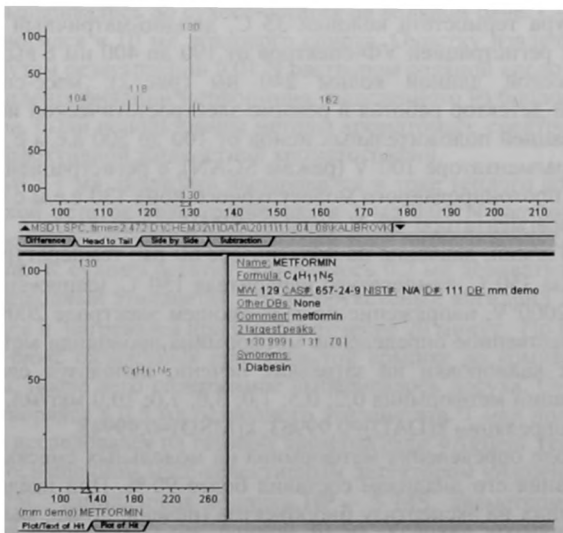


Рис. 3. Масс-спектр метформина (ES-ионизация) и извлечения из печени

Выводы

1. Предложено изолирование метформина из биологического материала диализом.
2. В качестве инструментального метода идентификации метформина предложен метод хроматомасс-спектрометрии после проведения реакции дериватизации.
3. В качестве инструментального метода идентификации и количественного определения предложен метод высокоэффективной жидкостной хроматографии – масс-спектрометрии.

Использованная литература

1. М. Д. Машковский «Лекарственные средства», издание пятнадцатое, Москва, «Новая Волна», 2006 г., с. 562.
2. «Регистр лекарственных средств в России», 2012 г.
3. Moffard A. C., Osselton M. D., Milddop B. «Clarkes Analyses of Drugs and Poisons», Pharmaceutical Press, Electronic version, London, 2011 г.
4. Р. Г. Мансурова, Н. В. Кубасова, З. А. Газизова, «Изолирование метформина из биологического материала и его идентификация», Актуальные вопросы судебной медицины и права, Казань, 2010 г., Вып. 1.
5. М. Д. Швайкова «Токсикологическая химия», Москва, «Медицина», 1975 г., с. 354.
6. Т. Х. Вергейчик «Токсикологическая химия», Москва «МЕД-пресс-информ», 2009 г.