



УДК 615.252.349.7:543.862.28:54.061

РАЗРАБОТКА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ МЕТОДОВ ОБНАРУЖЕНИЯ МЕТФОРМИНА ДЛЯ СУДЕБНО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

**В.Ю. МОСКАЛЕНКО
С.И. МЕРЗЛИКИН**

*Национальный
фармацевтический
университет,
г. Харьков, Украина*

e-mail: lercha87@mail.ru

В статье изложены данные по разработке и стандартизации методов обнаружения метформина для судебно-токсикологических исследований, основанные на применении осадительных и хромогенных реактивов. Изучены чувствительность и специфичность приемлемых для данных целей реакций.

Ключевые слова: метформин, обнаружение, химико-токсикологический анализ, осадительные реактивы, хромогенные реактивы.

Введение.

Известный антидиабетический препарат Метформин (Сиофор, Глюкофаж, Diformin, Diguanid и др.) является основой современной фармакотерапевтической схемы лечения сахарного диабета 2 типа, поскольку основной механизм его фармакологического действия связан со снижением инсулинорезистентности [1]. Его назначают в индивидуальном виде и в комбинации с другими антидиабетическими средствами, повышающими секрецию эндогенного инсулина [2-7].

Пожизненное применение, побочные действия, доступность в аптечной сети, постоянно растущее количество пациентов с диабетом 2 типа (около 260 млн в мире) – факторы токсикологической опасности его неконтролируемого использования, о чём свидетельствует проведенный информационный обзор острых отравлений метформином [8], а также случай отравления препаратом в практике Республиканского бюро судебно-медицинской экспертизы МЗ РТ, г. Казань [9]. Вместе с тем, в доступной нам литературе отсутствуют описанные систематические судебно-токсикологические исследования на метформин, включающие методы его изолирования из биологических объектов, обнаружения и идентификации на разных этапах химико-токсикологического анализа (ХТА), а также количественного определения в экстрактах из биоматериала.

Целью нашего исследования является разработка и стандартизация химических методов обнаружения метформина для судебно-токсикологических исследований на токсикант неизвестной природы и аналитической диагностики острых отравлений препаратом.

Материалы и методы исследования.

В качестве объектов исследования использовали рабочий стандартный образец (PCO) метформина г/х (субстанция, монография ЕР 01/2005:0931, производитель Harman Finocem Ltd., серия № 051121), таблетки Сиофор (метформина г/х и вспомогательные вещества) и метформина основание.

Реактивы: Бушарда, Вагнера, Драгендорфа, Драгендорфа (модификация по Мунье), Зонненшейна, Шейблера, 0,5% раствор пикриновой кислоты, 10% раствор рейнеката аммония, H_2SO_4 конц., HNO_3 конц., реактив Марки, реактив Фреде, реактив Манделина, реактив Либермана, реактив Эрдмана, 0,5% раствор нитрата кобальта, 0,5% раствор роданида кобальта, 12,5% раствор сульфата меди, 10% раствор нитропруссиды натрия+10 % раствор феррицианида калия+10 М NaOH (1:1:1), 10% раствор нитропруссиды натрия +10 М NaOH (1:1); реактив Сакагучи, 10% раствор $FeCl_3$, 57% раствор хлорной кислоты+0,5% раствор нитрита натрия (97:3), 0,5% раствор нингидрина в HCl развед.+ацетон (1:10). Реактивы готовили согласно методикам [10, 11].

Методика приготовления раствора PCO метформина. 1,0 г метформина г/х растворяют в 10 мл воды дистиллированной и доводят объем раствора тем же растворителем до 100 мл (раствор 1; 10 мкг/мкл).

Методика проведения осадительных реакций с метформином г/х. 1-2 капли испытуемого раствора 1 помещают на предметное стекло, рядом наносят 1 каплю соответствующего свежеприготовленного реактива. С помощью стеклянной палочки капли соединяют. Параллельно проводят контрольный опыт.

Методика получения метформина основания из метформина г/х. 25,5 г анионита Amberlite IRA 402 Cl растворяют в 510 мл воды деминерализованной, помещают в колонку и промывают 102 мл раствором NaOH (40 г/л). Колонку промывают водой деминерализованной



до нейтрального pH элюента и 102 мл метанола. Через колонку пропускают готовый раствор метформина г/х в метаноле (3,66 г/0,1 л) со скоростью 2 мл/мин и промывают 61,2 мл метанола. Содержание хлоридов проверяют реакцией с серебром нитратом. Элюаты объединяют, упаривают в потоке холодного воздуха до сухого остатка. Кристаллизуют из метанола.

Методика проведения осадительных реакций с метформина основанием. 1,0 г метформина основания помещают в мерную колбу, добавляют 10 мл воды дистиллированной и доводят объем раствора тем же растворителем до 100 мл (раствор 2; 10 мкг/мл).

1-2 капли испытуемого раствора 2 помещают на предметное стекло, рядом наносят 1 каплю соответствующего свежеприготовленного реактива. С помощью стеклянной палочки капли соединяют. Параллельно проводят контрольный опыт.

Методика проведения хромогенных реакций. К сухому остатку метформина основания или метформина г/х на специальном планшете с углублениями прибавляют 1 каплю соответствующего свежеприготовленного реактива. Параллельно проводят контрольный опыт.

Методика приготовления растворов РСО метформина для определения чувствительности. 1 мл испытуемого раствора 1 помещают в мерную колбу, добавляют 10 мл воды дистиллированной и объем раствора доводят тем же растворителем до 50 мл (раствор 3; 1 мкг/5 мкл). 1 мл испытуемого раствора 3 помещают в мерную колбу, добавляют 10 мл воды дистиллированной и объем раствора доводят тем же растворителем до 50 мл (раствор 4; 0,5 мкг/5 мкл).

Методика изолирования метформина основания из модельного образца мочи. 5,0 мл модельного образца мочи, содержащего 0,125 мг метформина г/х, помещают в делительную колбу, добавляют 5 мл 5 М NaOH до pH13 и трижды (по 5 мл) экстрагируют смесью изоамиловый спирт-бутанол (1:1). Полученные извлечения объединяют и упаривают в потоке холодного воздуха до сухого остатка.

Методика изолирования метформина г/х из таблеток Сиофор. 1 таблетку препарата Сиофор, содержащую 1,0 г метформина г/х, растирают в фарфоровой ступке, добавляют 5 мл воды дистиллированной, перемешивают и фильтруют через фильтр «синяя лента». Полученный фильтрат упаривают в потоке холодного воздуха до сухого остатка.

Результаты и их обсуждение.

Высокие гидрофильные свойства метформина, обусловленные наличием в структуре молекулы NH-групп, создают сложности его изолирования из биологических объектов общими методами – подкисленной водой и подкисленным спиртом (по Стасу-Отто), включающих жидкость-жидкостную экстракцию токсикантов хлороформом или эфиром. Кроме этого, в источниках литературы отсутствуют данные по физико-химическим свойствам основания метформина, в том числе данные по растворимости в воде и указанных органических растворителях.

Основание метформина нами получено из РСО метформина г/х методом ионно-обменной хроматографии и представляет собой аморфный желтоватый порошок с характерным запахом, $T_{пл.}$ 120-121°C, хорошо растворимый в воде, спирте изоамиловом, мало растворимый в метаноле, этаноле, пропаноле, бутаноле, гексане, очень мало растворимый в хлороформе, практически нерастворимый в ацетоне, ацетонитриле, диэтиловом эфире.

Результаты по растворимости основания метформина были использованы для разработки условий его изолирования методом жидкость-жидкостной экстракции из модельного образца мочи смесью изоамиловый спирт-гексан (1:1) при pH13, что способствовало увеличению практического выхода метформина с 10% до 80%, в сравнении с результатами его экстрагирования хлороформом при pH9 по известной методике [9].

Исходя из анализа случаев отравлений метформином, кроме биологического материала, объектами ХТА могут быть вещественные доказательства – таблетки и порошок препарата. Поэтому для разработки и стандартизации методов его обнаружения стандартизированы образцы метформина г/х в соответствии с аналитической нормативной документацией [12] – РСО метформина г/х и полученного основания метформина – РСО основания метформина, которые были использованы в параллельных опытах с образцами данных веществ, изолированных из объектов ХТА.

Для обнаружения метформина химическими методами применяли общепринятые в практике ХТА лекарственных и психоактивных веществ осадительные и хромогенные реактивы. Осадительные реакции с соответствующими реагентами выполняли по стандартным методикам. Результаты реакций приведены в табл. 1.

Установлено, что метформина г/х и основание метформина образуют различные осадки с реактивами 1, 2, 5, 7 и 8 (табл. 1). В связи с относительно низкой чувствительностью эти реакции могут быть использованы в качестве предварительных испытаний для обнаружения препарата в различных объектах ХТА. Вместе с тем, в отличие от большинства лекарственных и психоактивных веществ, метформин не образует осадка с реактивами Драгендорфа и Шейблера (реактивы 3, 4 и 6; табл. 1). Отсутствие осадка с данными реактивами имеет судебно-



токсикологическое значение как результат, исключающий присутствие препарата в объекте исследования при ХТА на токсикант неизвестной природы.

Таблица 1

**Результаты реакций обнаружения метформина
общеосадительными реактивами**

№ п/п	Реактив	Метформина г/х		Метформина основание	
		осадок/цвет	предел обнаружения, мкг	осадок/цвет	предел обнаружения, мкг
1	Бушарда	аморфный/коричневый	300	аморфный/коричневый	300
2	Вагнера	аморфный/коричневый	300	аморфный/коричневый	300
3	Драгендорфа	–	–	–	–
4	Драгендорфа (модификация по Мунье)	–	–	–	–
5	Зонненшейна	творожистый/жёлтый	500	творожистый/жёлтый	500
6	Шейблера	–	–	–	–
7	0,5% раствор пикриновой кислоты	аморфный/жёлтый	500	кристаллический (иголки)/оранжевый	500
8	10% раствор рейнеката аммония	аморфный/розовый	500	аморфный/розовый → фиолетовый	500

Примечание: «–» – отсутствие осадка,
«→» – переход окрашивания осадка.

В табл. 2 приведены результаты реакций метформина г/х и основания метформина с хромогенными реактивами.

Таблица 2

Результаты реакций обнаружения метформина хромогенными реактивами

№ п/п	Реактив	Метформина г/х		Метформина основание	
		окрашивание	предел обнаружения, мкг	окрашивание	предел обнаружения, мкг
1	H ₂ SO ₄ конц.	–	–	–	–
2	HNO ₃ конц.	–	–	–	–
3	Марки	–	–	–	–
4	Фреде	–	–	–	–
5	Манделина	–	–	–	–
6	Либермана	–	–	–	–
7	Эрдмана	–	–	–	–
8	0,5% раствор нитрата кобальта	–	–	розовое	10
9	0,5% раствор роданида кобальта	розовое	10	розовое	10
10	12,5% раствор CuSO ₄ +10 М NaOH	фиолетовое → розовое	10	фиолетовое → розовое	10
11	10% раствор нитропруссид натрия+10% раствор феррицианид калия+10% раствор NaOH	красное	5	красное	5
12	10% раствор нитропруссид натрия+10% раствор NaOH	розовое	5	розовое	5
13	Сакагучи	розовое	1	розовое	1
14	10% раствор FeCl ₃	–	–	–	–
15	57% раствор HClO ₄ +0,5% раствор нитрита натрия (97:3)	–	–	–	–
16	0,5% раствор нингидрина в HCl развед.+ацетон (1:10)	–	–	–	–

Примечание: «–» – отсутствие окрашивания,
«→» – переход окрашивания.



Установлено, что с общими хромогенными реактивами 1-7, 14-16 (табл. 2), которые применяют для обнаружения большинства лекарственных и психоактивных веществ, препарат не дает окрашенных продуктов реакции. Отрицательный результат этих реакций также имеет судебно-токсикологическое значение при ХТА на токсикант неизвестной природы. Вместе с тем, метформина г/х и основание метформина дают окрашенные продукты реакции с реактивами 9-13. Наиболее чувствительными среди них выявлены реактивы 11-13, а специфическими – реактивы 11 и 13, которые могут быть использованы для обнаружения препарата в различных объектах ХТА. Следует отметить, что реактив 8 дает окрашивание только с основанием метформина. Это может быть использовано только для обнаружения препарата в экстрактах из биологического материала.

Для подтверждения результатов обнаружения метформина в объектах ХТА осадительными и хромогенными реактивами использованы инструментальные методы анализа: УФ-спектроскопия и ВЭЖХ. Исследуемые образцы препарата имеют $\lambda_{\text{макс.}} 232 \pm 2$ нм в соответствии с данными [11]. Время удерживания исследуемых образцов метформина в условиях метода ВЭЖХ составляет 2,4 мин. [13].

Выводы.

Методом ионно-обменной хроматографии получено основание метформина и изучены его физико-химические свойства. Предложены условия изолирования метформина в виде основания из биологических объектов методом жидкость-жидкостной экстракции, обеспечивающих практический выход токсиканта до 80%. Стандартизированы образцы метформина г/х и метформина основания. Разработаны химические методы обнаружения метформина, выделенного из объектов ХТА различной природы. Выявлены реактивы, имеющие судебно-токсикологическое значение при отрицательном результате реакции.

Литература

1. Кондратьева Л. В. Метформин – испытание временем / Л. В. Кондратьева // Русский медицинский журнал. Эндокринология. – 2007. – Т. 15, № 27. – С. 2098.
2. Смирнова О.М. Преимущества комбинированной терапии в лечении сахарного диабета 2 типа / О.М. Смирнова // Фарматека. – 2008. – № 3. – С. 48-51.
3. Аметов А.С. Эффективность и безопасность перевода больных сахарным диабетом 2 типа, неполностью контролируемых монотерапией метформином, на комбинированную терапию метформином и Диабетоном МВ / А.С. Аметов, Л.Н. Богданова // Сахарный диабет. – 2009. – № 4. – С. 68-71.
4. Metformin-glibenclamide versus metformin plus rosiglitazone in patients with type 2 diabetes inadequately controlled on metformin monotherapy / Garber A., Klein E., Bruce S. et al. // Diabetes Obesity Metabolism. – 2006. – № 8. – P. 156-163.
5. Carbonell B., Scherthaner G., Brunetti P. et al. Long-term efficacy and tolerability of add-on pioglitazone therapy to falling monotherapy compared with addition of gliclazide or metformin in patients with type 2 diabetes // Diabetologia. – 2005. – № 48. – P. 1093-1094.
6. Belsey J. Glycaemic control and adverse events in patients with type 2 diabetes treated with metformin + sulfonylurea: a meta-analysis / J. Belsey, G. Krishnarajah // Diabetes Obesity Metabolism. – 2008. – Vol. 10, suppl. 1. – P. 1-7.
7. Scheen A.J. Drug interactions of clinical importance with antihyperglycaemic agents: an update / A.J. Scheen // Drug Safety. – 2005. – № 28. – P. 601-631.
8. 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.
9. Изолирование метформина из биологического материала и его идентификация / Р.Г. Мансурова, Н.В. Кубасова, З.А. Газизова // Судебно-медицинский журнал. – 2010. – № 1. – С. 5.
10. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1 вид. – Харків: Рипер, 2001. – 531 с.
11. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons: 3rd edition. – London: Pharmaceutical Press, electronic version, 2005.
12. British Pharmacopoeia, 2009 / Her Majesty's Stationary Office, London. – 2009. – V. 1 & 2. – P. 3813-3816.
13. Москаленко В.Ю. Розробка умов рідинної хроматографії для хіміко-токсикологічного аналізу метформіну / В.Ю. Москаленко, С.І. Мерзлікін // Запорозький медичний журнал. – 2011. – Т. 13, № 3. – С. 86-88.



THE DEVELOPMENT AND STANDARDISATION OF DETERMINATION METHODS OF METFORMIN FOR FORENSIC TOXICOLOGICAL RESEARCH

**V.Yu. MOSKALENKO
S.I. MERZLIKIN**

*The National University
of Pharmacy,
Kharkiv*

e-mail: lercha87@mail.ru

This article presents the data on the development and standardization of determination methods of metformin for forensic toxicological research, based on the application of settling and chromogenic reagents. Sensitivity and specificity, acceptable for aim of reactions, were studied.

Key words: metformin, identification, chemical-toxicological analysis, settling reagents, chromogenic reagents.