

ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ СОДЕРЖАНИЯ ГЛИБЕНКЛАМИДА В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ ПРИ ХРАНЕНИИ

Кучер Т.В., Мерзликин С.И.

*Национальный фармацевтический университет,
кафедра лекарственной и аналитической токсикологии, г. Харьков, Украина*

Ключевые слова: глибенкламид, биологический материал, хранение.

Резюме: В статье освещены результаты по изучению динамики содержания глибенкламида в образцах свиной печени, подвергшихся гнилостным изменениям. Установлено, что методом ВЭЖХ в исследуемых объектах глибенкламид обнаруживается в течение 8 дней при их хранении в нормальных условиях. Полученные результаты могут быть использованы для обнаружения глибенкламида в биологических объектах при проведении судебно-токсикологических исследований.

Resume: This paper represents results of studying the dynamics of glibenclamide content in pig liver samples, which exposed putrefactive changes. It was determined that glibenclamide in test objects have been detected during 8 days when storing at normal conditions by HPLC method. Obtained results can be applied for glibenclamide detection in biological objects for forensic toxicological studies.

Актуальность. Известно, что при хранении биологического материала содержащиеся в нем органические вещества подвергаются химическим превращениям и, лишь незначительная их часть, остается без изменений в течение длительного времени [1]. Глибенкламид – один из распространенных антидиабетических препаратов для лечения сахарного диабета 2 типа [5]. Известны случаи летальных отравлений глибенкламидом, преимущественно при суицидальной передозировке, которые в соответствии с действующим законодательством должны быть подвергнуты судебно-токсикологическим исследованием [3]. В источниках литературы приведены данные о сохраняемости препарата в биологическом материале, содержащегося в условиях бюро судебно-медицинской экспертизы [2]. Вместе с тем, отсутствуют результаты по изучению динамики содержания данного токсиканта в объектах биологической природы, подвергшихся гнилостным изменениям.

Цель работы: изучение динамики содержания глибенкламида в объектах биологической природы, подвергшихся гнилостным изменениям.

Задачи: изучить особенности динамики содержания глибенкламида в биологическом материале при хранении.

Материалы и методы.

К 700,0 г измельченной печени добавляли метанол-метиленхлоридный (1:1) раствор глибенкламида, из расчета 20 мг вещества на 50 г печени, перемешивали и оставляли при комнатной температуре на исследуемый срок. Исследование проводили в течение двух недель. Пробы биологического материала (50,0 г) отбирали ежедневно. Параллельно проводили контрольный опыт.

Изолирование глибенкламида из тканей органа проводили ацетонитрилом, подкисленным 6 М раствором кислоты соляной до pH 2,0-2,5. Полученное извлечение фильтровали, очищали от органических примесей 2,5% раствором натрия сульфата и *n*-гексаном. Токсикант экстрагировали хлороформом.

Обнаружение глибенкламида в полученных извлечениях и их очистку проводили методом ТСХ на пластинках Merck silica gel 60F₂₅₄ с использованием систем растворителей: этилацетата (система 1), смесей этилацетат-кислота ацетатная ледяная (49,5:0,5) и метиленхлорид-этилацетат-кислота ацетатная ледяная (50:50:1) (системы 2 и 3 соответственно).

Для детектирования зон адсорбции токсиканта использовали наиболее чувствительные реагенты: хлорцинкйод и реактив Бушарда, а также специфические: 1% раствора ванилина и 5% раствора хлоралгидрата. Хроматографическую пластинку делили на 3 части. На линию старта пластинки в зону 1, в виде точки наносили 10 мкл (1 мкг/мл) раствора стандартного образца глибенкламида, а в зоны 2 и 3 полосой толщиной 2 см наносили по ¼ части полученного хлороформного извлечения. После хроматографирования пластинку высушивали, а зоны 1 и 2 обрабатывали соответствующими реагентами. Далее с необработанной проявителем зоны 3, в области соответствующего глибенкламиду значения Rf с пластинки скальпелем снимали слой сорбента площадью 3×1 см, который помещали в стеклянный флакон, содержащий 10 мл метилового спирта. Содержимое флакона встряхивали в течение 5 мин и фильтровали через фильтр марки «красная лента».

Идентификацию глибенкламида в метанольном элюате и его количественное определение проводили методом ВЭЖХ на хроматографе «Миличром-А-02» с УФ-детектированием (ЗАО «Эконова», Новосибирск). Для разделения веществ использовали обратно-фазовую колонку Prontosil-120-5-C18-AQ размером Ø2×75 мм, зерна 5 мкм («Bischoff Analysetechnik und Geräte GmbH», Германия). Градиентное элюирование выполняли путем смешивания двух элюентов: элюент А - [0,2М LiClO₄ – 0,005М HClO₄], элюент Б - ацетонитрил квалификации «для ВЭЖХ». Скорость подвижной фазы – 100 мкл/мин. Температура термостата колонки – 35 °С [4].

Результаты и их обсуждение.

Для изучения динамики содержания глибенкламида в биологическом материале при гниении навеску измельченной свиной печени насыщали метанол-метиленхлоридным (1:1) раствором глибенкламида, взятого в концентрации, эквивалентной смертельному отравлению препаратом. Эксперимент проводили при комнатной температуре. Пробы биологического материала (50,0 г) отбирали ежедневно в течение двух недель. Изолирование токсиканта из тканей печени проводили подкисленным ацетонитрилом.

Согласно методологии химико-токсикологического анализа, полученный в результате изолирования хлороформный экстракт глибенкламида, исследовали методом ТСХ. Установлено, что при обработке хроматографических зон 1 и 2 чувствительными и специфическими реагентами на пластинке визуализировались индивидуальные пятна глибенкламида со значениями Rf 0,46 (система 1) и 0,57-0,61 (системы 2 и 3). При этом, хлорцинкйод и реактив Бушарда с глибенкламидом давали коричневую окраску пятен, а с 1% раствор ванилина и 5% раствор хлоралгидрата – фиолетовую и зелено-коричневую соответственно. С целью получения более чистых извлечений с необработанной проявителем хроматографической зоны 3, в области соответствующего глибенкламиду значения Rf с пластинки скальпелем снимали слой сорбента, из которого токсикант элюировали метанолом.

Идентификацию и определение количественного содержания глибенкламида в полученных метанольных элюатах проводили методом ВЭЖХ. Установлено, что пики веществ на соответствующих хроматограммах метанольного раствора стандартного образца глибенкламида и исследуемых элюатов являлись соотносительными по их времени удерживания ($t_R = 9,99$ мин). Количественное определение глибенкламида проводили при длине волны 230 нм по зависимости площади пика метанольного раствора стандартного образца глибенкламида от концентрации.

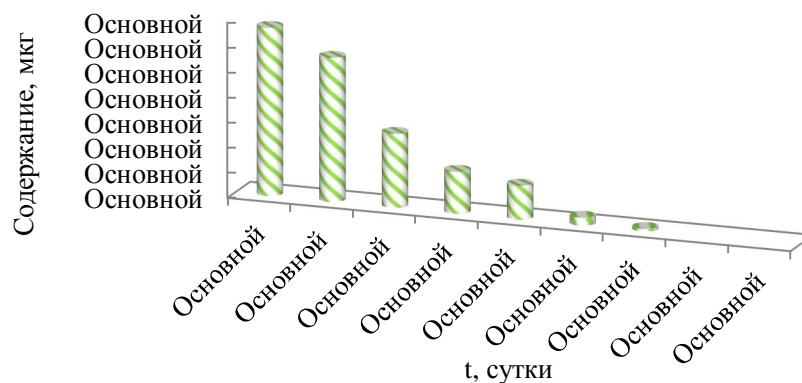


Рис. 1 - Динамика содержания глибенкламида в образцах печени при гниении

Установлено, что в исследуемой пробе печени, взятой на 2 день эксперимента, глибенкламид обнаружен в концентрации 336 мкг. На 4 день исследования концентрация токсиканта снизилась до 148 мкг. Тенденция к снижению его концентрации наблюдалась и в течение последующих дней. На 9 день эксперимента в исследуемой пробе биологического объекта глибенкламид обнаружить не удалось.

Выводы: изучена динамика содержания глибенкламида в образцах печени, подвергшихся гнилостным изменениям. Установлено, что методом ВЭЖХ в исследуемых объектах глибенкламид обнаруживается в течение 8 дней при их хранении в нормальных условиях. Полученные результаты могут быть использованы для обнаружения глибенкламида в биологических объектах при проведении судебно-токсикологических исследований.

Литература

1. Вергейчик Т. Х. Токсикологическая химия: учеб. / Т. Х. Вергейчик; под ред. проф. Е. Н. Вергейчика. – М.: МЕДпресс-информ, 2009. – 400 с.
2. Ибрагимова М. М. Химико-токсикологические свойства некоторых антидиабетических препаратов производных сульфонилмочевины: Автореф. дис. ... д-ра фарм. наук:15.00.02. – Ташкент, 2016. – 39 с.
3. Карташов В.А. Химико-токсикологический анализ: в 2 ч. / ч. 1. Выделение токсических веществ из биологических объектов. – Майкоп: ООО «Качество», 2008. – 188 с.
4. Кучер Т.В. Хроматографическое обнаружение глибенкламида в биологических объектах при моделировании комбинированных отравлений лекарственными веществами // Вестник фармации. – 2016. - №1. – С. 28-33.
5. Решедько Г.К. Клиническое применение глибенкламида: вопросы безопасности и эффективности // Проблемы эндокринологии. – 2012. – № 3. – С.65-69.