УДК 615.1:54+615.9

РАЗРАБОТКА И УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДИК АНАЛИЗА НЕКОТОРЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ИЗОНИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ И ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОМ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Чекулаева Г.Ю., Громова З.Ф.

ГБОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Рязань, e-mail: farmhim2014@mail.ru

В статье представлены материалы по разработке методики анализа производного изоникотиновой кислоты – изониазида – спектрометрическим методом в фармацевтической субстанции, лекарственных формах и биологической жидкости. Описана аналитическая процедура для экспрессного определения изониазида в моче. Предлагаемая методика позволяет косвенно определить активность N-ацетилтрансферазы с целью индивидуализации дозы лекарственных препаратов. Диапазон количественного определения от 0,0012 г/мл до 0,0027 г/мл. Валидация методики показала, что данная методика не содержит грубой и системной ошибки, позволяет получить воспроизводимые результаты и может быть использована как в фармацевтических, так и в фармакокинетических исследованиях.

Ключевые слова: изониазид, методы анализа, спектрофотометрия в видимой области, экспресс-анализ, химико-токсикологический анализ биологической жидкости

THE DESIGNING AND IMPROVEMENT OF THE METHODS OF ISONICOTINIC ACID CERTAIN DERIVATIVES ANALYSIS IN THE PHARMACEUTICAL AND CHEMICAL-TOXICOLOGICAL STUDIES

Chekulaeva G.Y., Gromova Z.F.

I.P. Pavlov Ryazan State Medical University, Ryazan, e-mail: farmhim2014@mail.ru

The development of a methodology for analyzing derivative of isonicotinic acid – isoniazid spectrophotometry in pharmaceutical substance, dosage forms and biological fluids is present in the article. The authors describe the analytical procedure for the rapid detection of isoniazide in urine. The suggested methods give it possible to determine the activity of N-acetyltransferase indirectly individualize the dose of medicine. The quantitative determination is possible in a concentration range from 0,0012 g/ml up to 0,0027 g/ml. The Validation of the methods showed, that the given methods doesn't contain any rude of systemic mistake and allows to get reproductible results and may be used in pharmaceutical as well as pharmacokinetic investigations.

Keywords: isoniazid, methods of analysis, spectrophotometry in the visible area, express-analysis, chemical-toxicological analysis of biological fluid

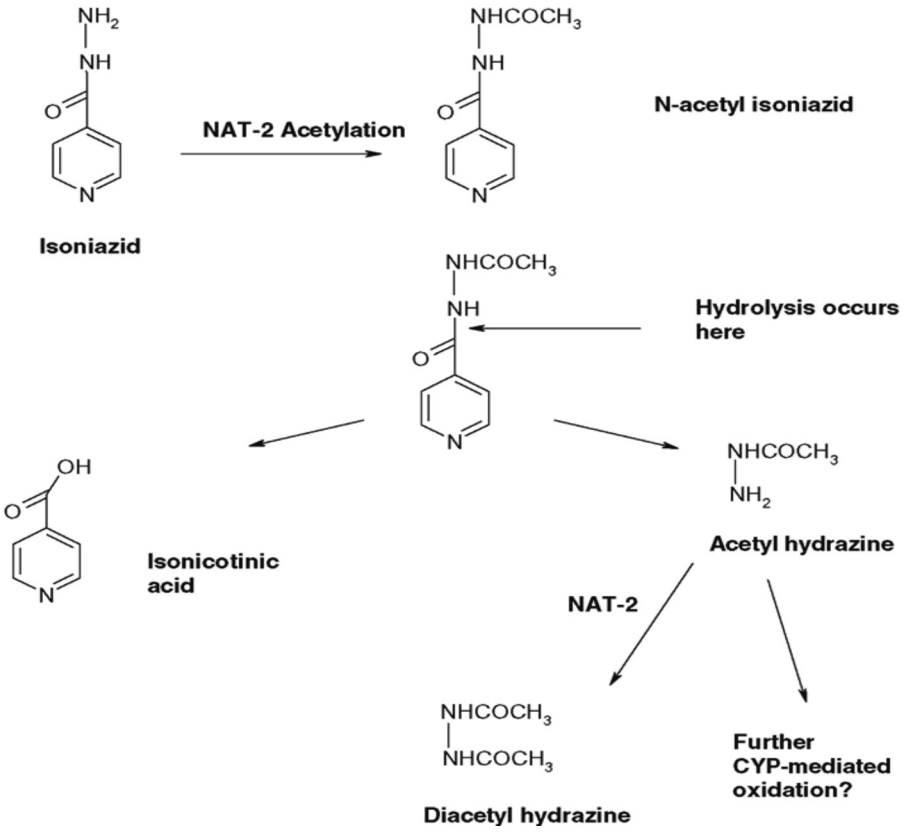
В настоящее время увеличивается число людей, страдающих туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью. По данным ВОЗ ежедневно около 1000 человек в европейском регионе заражаются туберкулезом, в том числе мультирезистентным, и только 50% из них удается успешно вылечить. Ситуация требует расширения доступа к безопасным и эффективным препаратам, а также инновационного подхода к экспресс-диагностике и лечению туберкулеза, исходя из каждого индивидуального случая [6].

Современная фармакотерапия туберкулеза предусматривает комплексное использование специфических антибактериальных препаратов и лекарственных средств разных фармакологических групп (иммуномодуляторов, гормональных препаратов, муколитических средств и др.). К препаратам 1 ряда, являющимся основными химиотерапевтическими средствами для лечения различных форм туберкулеза, относятся изониазид, его производные, антибиотики, пара-аминосалициловая кислота и ее производные. Основные препараты, особенно в виде комбинаций, применяют преимущественно при впервые выявленном туберкулезе. Курс лечения составляет от 3-х до 6-ти месяцев. Вместе с тем необходимо учитывать, что действие противотуберкулезных препаратов сопровождается обычно побочными эффектами, выраженность которых может возрастать при их одновременном применении [3].

Изучение фармакокинетики химиотерапевтических препаратов особенно важно в процессе химиотерапии туберкулеза, так как для достижения эффекта необходимо длительное лечение, что может привести к повышению чувствительности к применяемым лекарственным веществам. Кроме того, процесс лечения требует постоянного контроля за содержанием противотуберкулезных препаратов в крови, распределением их в организме и выведением для пре-

дотвращения передозировки. Это особенно актуально при нарушении функции почек, так как в этих случаях может наблюдаться задержка выведения противотуберкулезных средств и их кумуляция. Во многих случаях необходимо индивидуализировать дозы лекарственных препаратов с учетом их растворимости, всасываемости, интенсивности инактивации, скорости выведения, что зависит от активности фермента N-ацетилтрансферазы (NAT). Под действием фермента происходит биотрансформация (в частности, процесс ацетилирования) противотуберкулезных лекарственных средств, что приводит к увеличению растворимости получаемых метаболитов в воде и ускоренному выведению из организма почками.

Метаболизм изониазида представлен на схеме:



Следует отметить, что активность NAT у разных людей генетически отличается, поэтому метаболизм может быть или быстрым или медленным. Знание относительной индивидуальной активности NAT может позволить оптимизировать режимы дозирования противотуберкулезных лекарственных средств и оценить риск их воздействия на организм. Активность фермента NAT можно определить косвенным методом по исследованию фармакокинетики тест-препарата ацетилирования – изониазида.

Для количественного определения изониазида в субстанции ГФ XII издания рекомендует объемный метод кислотно-основного титрования в неводных средах, используя его основные свойства. Навеску лекарственного средства титруют хлорной кислотой в среде ледяной уксусной кислоты и уксусного ангидрида [2]. Метод связан с достаточно большими временными затратами, с необходимостью использования летучих агрессивных реактивов, а также имеются ограничения его применения для токсико-кинетических исследований.

На сегодняшний день существуют другие способы детектирования содержания тест-препарата ацетилирования – изониазида методами масс-спектрометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии, флуориметрии. Однако эти методы имеют ряд существенных недостатков, таких как высокая стоимость, методическая сложность и длительность проведения исследования [4, 5].

Таким образом, актуальной является разработка экспрессной методики ко-

личественного определения данного лекарственного средства в субстанции, обладающей высокой чувствительностью. Она позволит провести количественное определение изониазида не только в лекарственных формах, но и в биологических жидкостях организма человека (моча), что необходимо при фармакокинетических исследованиях с целью определения активности фермента NAT.

Целью нашего исследования является разработка простой в использовании, экспрессной и валидизированной методики количественного определения изониазида не только в фармацевтических субстанциях, но и в биологических объектах. В основе спектрофотометрического метода количественного определения в видимой области спектра, была использована реакция изониазида с метаванадатом аммония в среде хлороводородной кислоты. Реакция основана на способности соединений ванадия (V) образовывать окрашенные комплексы с органическими лигандами, имеющими в своей структуре определенные функциональные группы, содержащие атомы азота и кислорода (гидразидная группа).

Для достижения поставленных целей необходимо решить следующие задачи:

1. Осуществить выбор рабочей длины волны.
2. Определить линейную зависимость между концентрацией фармацевтической субстанции к оптической плотности продукта реакции с аммония ванадатом.
3. Установить время устойчивости окраски.
4. Определить чувствительность реакции с целью возможности использования её при химико-токсикологических исследованиях.
5. Определить диапазон подчинения продукта реакции основному закону светопоглощения.
6. Провести количественное определение изониазида в фармацевтической субстанции, лекарственной форме и биологической жидкости (моче).

Материалы и методы исследования

Все исследования проводили на фотометре КФК-3 в кюветах с толщиной оптического слоя 10 мм при комнатной температуре. В анализе использовали рабочий стандартный образец (РСО) изониазида (ФС 42-0236-07). Приготовление стандартного рабочего раствора: 0,12 г изониазида (точная навеска) помещали в мерную колбу емкостью 100 мл, растворяли в воде, доводили водой до метки, тщательно перемешивали. 25 мл полученного раствора переносили в мерную колбу емкостью 100 мл, доводили водой до метки, тщательно перемешивали.

Статистическую обработку экспериментальных данных исследований (p = 95%) проводили с помощью программ StatSoft Statistica 6,0, Microsoft Excel с вычислением граничных значений доверительного интервала среднего результата и определением ошибки единичного определения [1].

Результаты исследования и их обсуждение

Для выбора рабочей длины волны готовили раствор изониазида с концентрацией 0,0003 г/мл. По истечении 5 минут измеряли оптическую плотность окрашенного продукта реакции при разных длинах волн, относящихся к видимой области спектра (380 нм – 780 нм).

Спектр поглощения раствора изониазида в видимой области имеет максимум при длине волны 430 нм. При той же длине волны проводили измерения оптической плотности испытуемых растворов и растворов сравнения.

Результаты определения устойчивости окраски во времени представлены в табл. 1. Из данных таблицы видно, что в течение 30 минут окраска оставалась устойчивой.

Для выявления линейной зависимости между концентрацией фармацевтической субстанции изониазида и оптической плотностью продукта его реакции с метаванадатом аммония готовили ряд разведений в широком диапазоне концентраций – от 0,0012 г/мл до 0,0027 г/мл. Проведенные исследования позволяют сделать заключение, что в выбранном интервале концентраций изониазида наблюдается подчинение закону Бугера – Ламберта – Бера.

Относительная погрешность определения находилась в пределах точности спектрофотометрического анализа.

Минимальная концентрация изониазида, определяемая по этой методике, составляет 0,0012 г/мл, что свидетельствует о возможности ее применения не только для анализа фармацевтических препаратов, но и для определения изониазида в биологических объектах.

Следующим этапом исследования явилось определение содержания изониазида в фармацевтической субстанции и лекарственной форме. Определение проводили в сравнительном аспекте с раствором стандартного образца, поскольку данный метод определения является более точным, надежным и отвечает требованиям Государственной Фармакопеи XII издания. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Как следует из приведенных в таблице данных, полученные результаты укладываются в нормы допустимых отклонений.

Таблица 1

Зависимость оптической плотности окрашенного комплекса от времени

Объем раствора изониазида и его концентрация, г/мл	Длина волны, нм	Оптическая плотность					
		5 мин	10 мин	15 мин	20 мин	25 мин	30 мин
6 мл; 0,0018 г/мл	430	0,458	0,458	0,457	0,457	0,456	0,455

Таблица 2

Результаты определения изониазида в фармацевтической субстанции и лекарственной форме

№ опыта	Объект исследования	Найдено	Нормы допустимых отклонений	Метрологическая характеристика
1 2 3 4 5	Фармацевтическая субстанция изониазида	99,98 100,20 99,96 99,98 99,98	Не менее 99,9%, не более 101,0%	$X_{ср} = 100,02$ $S = 0,1009$ $Sx_{ср} = 0,4512$ $E = 0, 0125$ $\varepsilon_a = 100,02 \pm 1,25$
1 2 3 4 5	Таблетки изониазида по 0,3 г	0,292 0,299 0,300 0,292 0,299	[0,285÷0,315]	$X_{ср} = 0,297$ $S = 0,0041$ $Sxcp = 0,0018$ $E = 0,017$ $\varepsilon_a = 0,297 \pm 0,017$

Валидация методики показала, что данная методика не отягощена грубой и системной ошибкой, является правильной и позволяет получить воспроизводимые результаты.

Разработанная методика была применена в химико-токсикологическом исследовании изониазида в моче в качестве биологической жидкости.

Для приготовления модельной смеси использовали образец мочи, полученный от здорового добровольца. При этом в течении месяца до отбора проб человек не принимал лекарств. Модельные смеси мочи готовили путем добавления к ней определенного объема стандартного раствора изониазида с концентрацией 0,0003 г/мл. Приготовленные смеси выдерживали в течение 24 часов при комнатной температуре.

Изучено влияние окраски реактива метаванадата аммония и мочи на величину молярного коэффициента поглощения комплекса изониазида с метаванадатом аммония. Для этого были получены спектры метаванадата аммония, смеси метаванадата аммония с мочой и образца мочи. Как показали исследования, при длине волны, равной 430 нм, влияние реагента незначительно и его можно нивелировать, если включить все компоненты в раствор сравнения при спектрофотометрическом определении в видимой области спектра. Количественное определение изониазида в моче проводили спектрофотометрическим методом по методике, разработанной для фармацевтической субстанции исследуемого лекарственного средства. Определение изониазида в моче оценивалось методом «введено – найдено». Предел обнаружения изониазида при указанных условиях спектрофотометрического определения – 0,6 мг/мл.

Выводы

Разработана методика количественного определения изониазида в фармацевтической субстанции, лекарственной форме и биологической жидкости спектрофотометрическим методом в видимой области спектра. Показана возможность использования данной методики в дальнейших химико-токсикологических исследованиях.

Список литературы

1. Государственная фармакопея XI издания. – М.: Медицина, 1987. – Вып. 1. – 334 с.

2. Государственная фармакопея Российской Федерации. – 12-е изд. – М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2008. – 704 с.

3. Машковский М.Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковский. – 15-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: РИА «Новая волна». 2007. – 1206 с.

4. Мелентьев А.Б. Определение изониазида в трупной крови и плазме методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодно-матричным детектором. / А.Б. Меленьев, А.В. Лаврентьева. – Суд.мед. экспертиза. – 2011. – № 4. – С. 23–27.

5. Фартушный А.Ф. Хроматоспектрофотометрическое определение производных изоникотиновой кислоты в биологическом материале. / А.Ф. Фартушный. – Суд.мед. экспертиза. – 1981. – № 4. – С. 42–44.

6. Электрон.дан. – Режимдоступа: http://slon/biz 1037105 ammo 1. livejournal.com.