

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Громова З.Ф., Чекулаева Г.Ю., 2017
УДК 615.281.074
DOI:10.23888/PAVLOVJ20172289-295

**СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОНИАЗИДА
И ЕГО ДЕРИВАТОВ ПО РЕАКЦИИ ОБРАЗОВАНИЯ
ПОЛИМЕТИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ С 4-ОКСОУРАЦИЛОМ**

З.Ф. Громова, Г.Ю. Чекулаева

Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова,
ул. Высоковольтная, 9, 390026, г. Рязань, Российская Федерация

Процесс лечения туберкулеза требует мониторинга концентрации противотуберкулезных препаратов в крови, а также их распределения и выведения из организма для предотвращения передозировки противотуберкулезных препаратов. Индивидуализировать дозы лекарственных средств возможно с учетом индивидуальной активности фермента N-ацетилтрансферазы, активность которой можно определить косвенным методом по продуктам биотрансформации противотуберкулезных препаратов.

Существующие на сегодняшний день способы детектирования содержания тест-препарата ацетилирования – изониазида – масс-спектрометрия, высокоэффективная жидкостная хроматография – имеют ряд существенных недостатков, таких как высокая стоимость и методическая сложность в проведении исследования.

В настоящей статье представлены результаты разработки унифицированной методики количественного определения противотуберкулезного препарата изониазида и его конъюгата – ацетилизониазида. В основу спектрофотометрического метода положена реакция расщепления пиридинового цикла изониазида с образованием глутаконового альдегида и его последующее сочетание с 4-оксоурацилом с образованием полиметинового красителя.

Разработанный метод позволяет провести количественное определение изониазида в лекарственных формах, а также изониазида и его дериватов в биологических жидкостях организма человека (моче), что косвенно дает возможность оценить активность N-ацетилтрансферазы при проведении фармакокинетических исследований.

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

**SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF IZONIAZID
AND ITS DERIVATIVES BY REACTION OF FORMATION
THE POLYMETHINE DYE WITH 4-OXOURACIL**

Z.F. Gromova, G.Yu. Chekulaeva

Ryazan State Medical University,
Vysokovolttnaya str., 9, 390026, Ryazan, Russian Federation

The process of tuberculosis treatment requires monitoring of the concentration of antituberculosis drugs in the blood, as well as their distribution and elimination from the body to prevent overdose of antituberculosis drugs. Individualizing the dose of drugs pos-

sibly including individual activity of the enzyme N-acetyltransferase, may be determined indirectly by biotransformation product of antituberculosis drugs.

Currently existing methods for detecting the content of the test drug acetylation of isoniazid – mass spectrometry, high performance liquid chromatography have several major limitations such as the high cost, complexity of tests methods in experimentation.

This article demonstrates the results of development of unified methods of quantitative determination of antituberculosis drug isoniazid and its conjugate – acetylisoniazid. The basis of spectrophotometric method is the cleavage reaction of isoniazid pyridine ring to form glutaconic aldehyde and its subsequent combination with the 4-oxouracil with the formation of a polymethine dye.

The developed method allows to carry out quantitative determination of isoniazid in the pharmaceuticals forms as well as isoniazid and its derivatives in body fluids (urine), which indirectly makes it possible to evaluate the activity of N-acetyltransferase during pharmacokinetic studies.

Keywords: isoniazid, analysis methods, visible spectrophotometry, cito analysis, chemical-toxicological analysis of biological fluid.

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.

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, являющимися основными химиотерапевтическими средствами для лечения различных форм туберкулеза, относятся изониазид и его производные антибиотики (стрептомицин, канамицин, рифампицин) и этамбутол. Препараты 1 ряда в виде комбинаций применяют преимущественно при впервые выявленном туберкулезе [1]. Курс лечения составляет от 6-ти и более месяцев. Вместе с тем необходимо учитывать, что действие противотуберкулезных препаратов сопровождается обычно побочными эффектами, выраженность которых может возрастать при их одновременном применении [2].

Изучение фармакокинетики химиотерапевтических препаратов особенно важно в процессе химиотерапии туберкулеза, так как для достижения эффекта необходимо длительное лечение, нарушение которого может привести к резистентности туберкулезной палочки к применяемым лекарственным средствам. Процесс лечения требует постоянного контроля за содержанием противотуберкулезных препаратов в крови и их выведением для оптимизации терапии. 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.

В результате реакции ацетилирования изониазида образуется ацетилизониазид, который не обладает антитуберкулезной активностью и в дальнейшем гидролизует до изоникотиновой кислоты и ацетилгидразина. Оба метаболита частично экскретируются с мочой. Кроме того,

изоникотиновая кислота конъюгируется с глицином, а ацетилгидразин биорансформируется до диацетилгидразина и может далее гидролизироваться под действием микросомальных ферментов до гидразина, обладающего гепатотоксичностью [3].

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 пользу и риск их воздействия на организм. Активность фермента NAT можно определить косвенным методом по исследованию фармакокинетики тест-препарата ацетилирования – изониазида.

Таким образом, актуальной является разработка экспрессной высокочувствительной методики количественного определения изониазида в субстанции. Данная методика позволит провести количественное определение изониазида не только в лекарственных формах, но и в биологических жидкостях организма человека (моче), 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 и лекарственных формах, но и в биологических жидкостях.

В основе спектрофотометрического метода количественного определения изониазида в видимой области спектра, была использована реакция образования полиметинового красителя с 4-оксоурацилом.

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 4-оксоурацилом.

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

Все исследования проводили на фотометре КФК-3 в кюветах с толщиной оптического слоя 10 мм при комнатной температуре. В анализе использовали рабочий стандартный образец (PCO) 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 Stat Soft, Statistica 6,0, Microsoft Excel с вычислением граничных значений доверительного интервала среднего результата и определением ошибки единичного определения [4].

Результаты и их обсуждение

Для количественного определения изониазида в субстанции Государственная Фармакопея 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 [5]. Метод связан с достаточно большими временными затратами, с необходимостью использования летучих агрессивных реактивов и ограничен для применения в токсикокинетических исследованиях.

На сегодняшний день существуют другие способы детектирования содержа-

ния тест-препарата ацетилирования – изониазида – методами масс-спектрометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии, флуориметрии [6]. Однако эти методы имеют ряд существенных недостатков, таких как высокая стоимость, методическая сложность и длительность проведения исследования [7, 8].

Разработанная нами ранее методика спектрофотометрического определения фармацевтических субстанций [9], в том числе изониазида, в основе которой была использована реакция с метаванадатом аммония [10], может быть использована для количественного определения только нативного препарата. Данная реакция основана на способности соединений ванидия (V) образовывать окрашенные комплексы с органическими лигандами, имеющими в своей структуре незамещенную гидразидную группу. N-ацетильный конъюгат изониазида в эту реакцию не вступает, так как является дериватом изониазида по гидразидной группе. В то же время, изониазид и его ацетильный конъюгат в своей структуре содержат пиридиновый цикл со свободными α , α^1 – положениями. Для подобных циклов характерно расщепление под действием различных реактивов, например, хлорциана или бромциана. Однако, наиболее доступным является тиоцианохлорид, который образуется при взаимодействии хлорамина и тиоционата аммония. При расщеплении пиридинового цикла образуется глутаконовый альдегид,

который при взаимодействии с сочетающимися реагентами, например 4-оксоурацилом, образует полиметиновый краситель. Следовательно, использование реакции образования полиметинового красителя позволяет определить суммарно изониазид и его дериват – ацетилизониазид.

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 (380нм -780нм).

Спектр поглощения раствора изониазида в видимой области имеет максимум при длине волны 608 нм. При той же длине волны проводили измерения оптической плотности испытуемых растворов и растворов сравнения. Результаты определения устойчивости окраски во времени представлены в таблице 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 4-оксоурацилом готовили ряд разведений в широком диапазоне концентраций – от 0,012 г/мл до 0,048 г/мл. Проведенные исследования позволяют сделать заключение, что в выбранном интервале концентраций изониазида наблюдается подчинение закону Бугера-Ламберта-Бера.

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
1 мл; 0,0003 г/мл	608	0,436	0,436	0,437	0,438	0,438	0,437

Относительная погрешность определения находилась в пределах точности спектрофотометрического анализа.

Минимальная концентрация изониазида, определяемая по этой методике, составляет 0,006 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 прово-

дили в сравнительном аспекте с раствором стандартного образца, поскольку данный метод определения является более точным,

надежным и отвечает требованиям Государственной Фармакопеи. Полученные результаты представлены в таблице 2.

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 99,98 99,96 99,98 100,2	Не менее 99,9%, не более 101,0%	$X_{cp} = 100,02$ $S = 0,1009$ $S\ddot{o} = 0,4512$ $\varepsilon = 0,0125$ $\varepsilon_a = 100,02 \pm 1,25$
1. 2. 3. 4. 5.	Таблетки изониазида по 0,3г	0,285 0,286 0,285 0,286 0,285	[0,285 ÷ 0,315]	$X_{cp} = 0,286$ $S = 0,001527$ $S\ddot{o} = 0,0006819$ $\varepsilon = 0,0066$ $\varepsilon_a = 0,286 \pm 0,006$

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

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 течении 24 часов при комнатной температуре.

Для осаждения белковых веществ добавляли 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты. После центрифугирования проводили количественное определение 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 0,006 г/мл. Результаты исследования представлены в таблице 3.

Таким образом, разработанная методика отличается от известных методов определения изониазида [6] простотой выполнения, высокой чувствительностью, воспроизводимостью и не требует сложного оборудования и дорогих реактивов.

Экспресс-методика дает возможность определить содержание изониазида в фармацевтической субстанции и лекарственной форме.

Таблица 3

Результаты количественного определения изониазида в модельной смеси образца мочи спектрофотометрическим методом по реакции с 4-оксоурацилом

Внесено изониазида, мг/ 5 мл мочи	Найдено		Метрологическая характеристика
	мг	%	
0,3	0,240	80,0	$X_{cp} = 769,2$ $S = 2,21$ $S\ddot{o} = 0,988$ $\varepsilon = 3,5$ $\varepsilon_a = 79,2 \pm 3,5$
0,3	0,228	76,0	
0,3	0,243	81,0	
0,3	0,231	77,0	
0,3	0,240	80,0	

Чувствительность метода позволяет определять изониазид и его основной метаболитацетилизониазид в биологических жидкостях, так как определяемая концентрация находится в диапазоне концентраций экскретируемых с мочой [3], что позволяет косвенно судить об активности N-ацетилтрансферазы.

Литература

1. Стречунский Л.С., Козлов С.Н. Современная антимикробная химиотерапия: руководство для врачей. М.: Боргес, 2002. 432 с.
2. Машковский М.Д. Лекарственные средств. 15-е изд., перераб., испр. и доп. М.: РИА «Новая волна», 2007. 1206 с.
3. Walubo A., Chan K., Wong C.L. Simultaneous assay for isoniazid and hydrazine metabolite in plasma and cerebrospinal fluid in the rabbit // *J. Chromatogr.* 1991. Vol. 567. P. 261-266.
4. Государственная Фармакопея Российской Федерации. 13-е изд. Федеральная Электронная медицинская Библиотека [Электронный ресурс]. URL: <http://193/222/7/107/feml> (дата обращения 21.10.2016).
5. Государственная фармакопея Российской Федерации. 12-е изд. М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2008. 704 с.
6. Черных И.В., Щулькин А.В., Гаданого М.В., Мыльников П.Ю. Разработка ВЭЖХ методики количественного определения этилметилгидроксипиридинасукцината в плазме крови крыс и кроликов // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2015. №1. С. 62-66.
7. Мелентьев А.Б., Лаврентьева А.В. Определение изониазида в трупной крови и плазме методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодно-матричным детектором // Судебно-медицинская экспертиза. 2011. №4. С. 23-27.

Выводы

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

Конфликт интересов отсутствует.

8. Фартушный А.Ф. Хромато-спектро-фотометрическое определение производных изоникотиновой кислоты в биологическом материале // Судебно-медицинская экспертиза. 1981. №4. С. 42-44.
9. Чекулаева Г.Ю., Громова З.Ф. Метод количественного определения некоторых производных пара-аминофенола в фармацевтических и химико-токсикологических исследованиях // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2014. №2. С. 129-133.
10. Чекулаева Г.Ю., Громова З.Ф. Разработка и усовершенствование метода анализа некоторых производных изоникотиновой кислоты в фармацевтическом и химико-токсикологическом исследованиях // Успехи современного естествознания. 2015. №11. С. 98-101.

References

1. Strachunskij LS, Kozlov SN. *Sovremennaja antimikrobnaja himioterapija: rukovodstvo dlja vrachej* [Modern antimicrobial chemotherapy: a guide for doctors]. M.: Borges; 2002. 432 p. (in Russian)
2. Mashkovskij MD. *Lekarstvennye sredstva* [Medicinal means]. 15-ed. revised., corr. and extras. M.: RIA «New Wave»; 2007. 1206 p. (in Russian)
3. Walubo A, Chan K, Wong CL. Simultaneous assay for isoniazid and hydrazine metabolite in plasma and cerebrospinal fluid in the rabbit. *J. Chromatogr.* 1991; 567: 261-266.
4. *Gosudarstvennaja Farmakopeja Rossijskoj Federacii*. Federal'naja Jelektronnaja medicinskaja Biblioteka [Jelektronnyj resurs]. [The State Pharmacopoeia of the

Russian Federation]. 13rd ed. Federal electronic medical Library [Electronic resource]. URL: <http://193/222/7/107/feml> (21.10.2016 treatment). (in Russian)

5. Gosudarstvennaja farmakopeja Rossijskoj Federacii [The State pharmacopoeia of the Russian Federation]. 12nd ed. Moscow: Scientific Center of expertise of medical applications; 2008. 704 p. (in Russian)

6. Chernyh IV, Shhul'kin AV, Gacanova MV, Myl'nikov PJu. Razrabotka VJeZhH metodiki kolichestvennogo opredelenija jetilmetilgidroksipiridinasukcinata v plazme krovi krysa i krolikov [Development of HPLC methods for quantitative determination of jetilmetilgidroksipiridinasukcinata in plasma of rats and rabbits]. *Rossijskij mediko-biologičeskij vestnik imeni akademika I.P. Pavlova* [I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald]. 2015; 1: 62-66. (in Russian)

7. Melent'ev AB, Lavrent'eva AV. Opredelenie izoniazida v trupnoj krovi i plazme metodom vysokoj effektivnoj zhidkostnoj hromatografii s diodno-matrichnym detektorom [Determination of isoniazid in cadaveric blood and plasma by method of high-performance liquid chromatography with diode-array detector]. *Sudebno-medicinskaja jekspertiza* [Forensic examination]. 2011; 4: 23-27. (in Russian)

8. Fartushnyj AF. Hromatospektrofotometričeskoe opredelenie proizvodnyh izonikotinovoj kisloty v biologičeskom material [Hromatospektrofotometričeskoe definition of derivatives izonicotinic acid in biological material]. *Sudebno-medicinskaja jekspertiza* [Forensic examination]. 1981; 4: 42-44. (in Russian)

9. Chekulaeva GJu, Gromova ZF. Metod kolichestvennogo opredelenija nekotoryh proizvodnyh para-aminofenola v farmacevtičeskix i himiko-toksikologičeskix issledovanijah [Method of quantitative determination of some derivatives of para-aminophenol in pharmaceutical and chemical-toxicological studies]. *Rossijskij mediko-biologičeskij vestnik imeni akademika I.P. Pavlova* [I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald]. 2014; 2: 129-133. (in Russian)

10. Chekulaeva GJu, Gromova ZF. Razrabotka i usovershenstvovanie metoda analiza nekotoryh proizvodnyh izonikotinovoj kisloty v farmacevtičeskom i himiko-toksikologičeskom issledovanijah [Development and improvement of the method of analysis of some derivatives izonicotinic acid in pharmaceutical and chemical-toxicological studies]. *Uspehi sovremennogo estestvoznanija* [Progress of modern natural science]. 2015; 11: 98-101. (in Russian)

Громова З.Ф. – к.ф.н., доцент кафедры общей и фармацевтической химии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.

Чекулаева Г.Ю. – к.б.н., доцент кафедры общей и фармацевтической химии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.

E-mail: farmhim2014@mail.ru