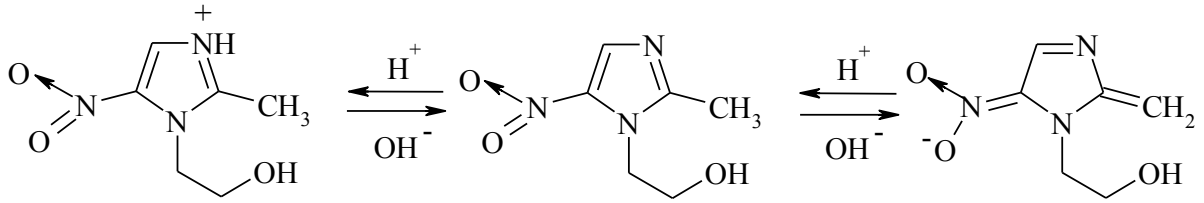
РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИХ МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТРОНИДАЗОЛА ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Шкарлат Г.Л., Журавель И.А., Клименко Л.Ю., Шовковая З.В.
Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

Метронидазол – 2-метил-5-нитроимидазол-1-этанол – относится к группе антипротозойных лекарственных средств и широко применяется для лечения инфекционных заболеваний, вызванных трихомонадами, лямблиями, лейшманиями, амебами и пр., а также в комплексной терапии язвы желудка и двенадцатиперстной кишки, связанной с Helicobacter pylori [Михайлов И. Б., 2000]. В то же время препарат обладает целым рядом побочных эффектов, проявляющихся классическими симптомами острой интоксикации (головокружение, тошнота, рвота), особенно при взаимодействии с другими лекарственными средствами, а в случае приема на фоне алкоголя возможно наступление летального исхода даже от терапевтической дозы [Cina S. J. et al., 1996; Edwards D. I. et al., 1980; Moreno S. N. et al., 1985]. Процедуры анализа метронидазола, пригодные для целей клинической и судебной токсикологии практически не разработаны, чаще всего в литературе описываются методики количественного определения метронидазола в биологических жидкостях, применяемые с целью изучения фармакокинетики либо биоэквивалентности препарата и основанные на использовании метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с различной детекцией [Cohen-Wolkowiez M. A. et al., 2011; Agudeloa M. et al., 2012].

Целью данной работы является разработка УФ-спектрофотометрических методик количественного определения метронидазола и валидация разработанных методик с использованием предложенных в работах [Klimenko, L. Yu. et al., 2014] подходов к процедуре определения и оценке приемлемости линейности, правильности и сходимости УФ-спектрофотометрических методик количественного определения аналитов в биологических жидкостях, применяемых в судебно-токсикологическом анализе.

Исходя из химической структуры метронидазола можно предположить для него следующую схему превращений при изменении pH среды:

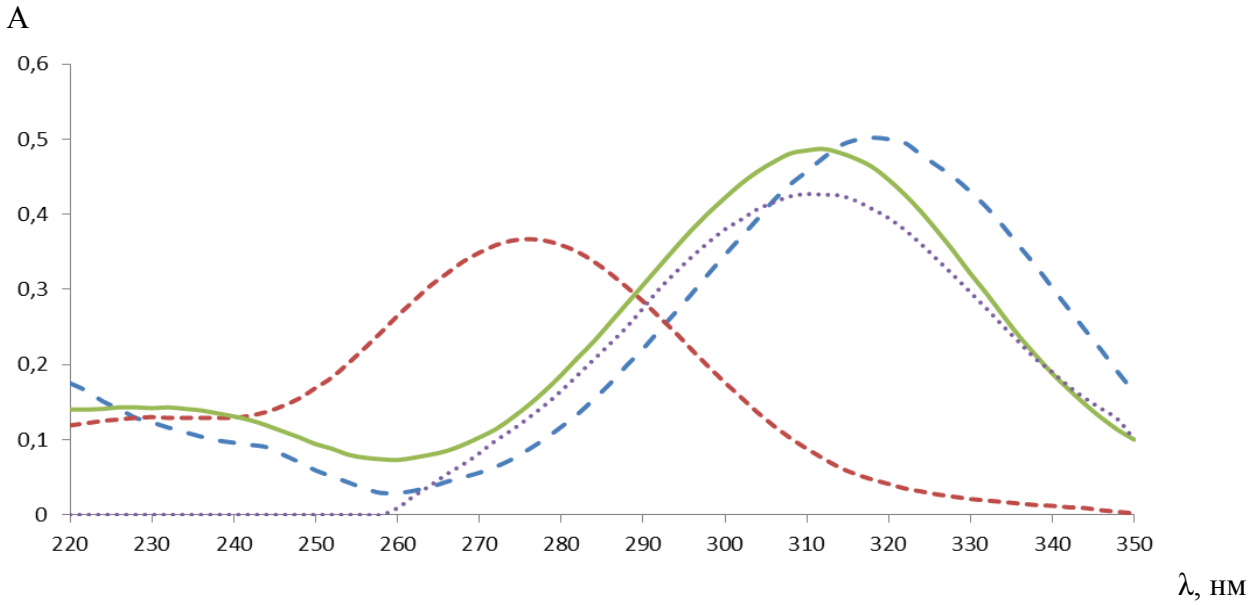


Наличие таких превращений подтверждают УФ-спектры метронидазола, полученные нами в различных растворителях с различными значениями pH, приведенные на рис. – при увеличении значения pH наблюдается поэтапное смещение максимума поглощения вправо: 277 нм → 310 нм → 314 нм → 319 нм.

С использованием полученных данных относительно максимумов поглощения метронидазола в УФ-области спектра нами разработаны методики его количественного определения с применением соответствующих растворителей, планируемые к применению в судебной токсикологии, в соответствии с процедурой [Klimenko, L. Yu. et al., 2014]: 1) применение нормализованных координат (нормализация по раствору сравнения); 2) диапазон применения – 25 – 125 %, 25 – 150 %, 25 – 175 %; 3) количество концентрационных уровней – g = 5, 6 или 7 с постоянным шагом 25 %.

Концентрацию метронидазола в модельном растворе, соответствующую точке 100 % в нормализованных координатах, выбирали таким образом, чтобы при условии нулевых по-

терь и отсутствии фонового поглощения, обеспечиваемого матрицей, оптическая плотность конечного спектрофотометрируемого раствора составляла 0,4 – 0,6.



УФ-спектры метронидазола в 0,1 моль/л растворе кислоты хлористоводородной (- - -) – λ_{max} = 277 нм, 96% этаноле (——) – λ_{max} = 310 нм, 0,1 моль/л метанольном растворе калия гидроксида (· · · ·) – λ_{max} = 314 нм и 0,1 моль/л растворе натрия гидроксида (– – –) – λ_{max} = 319 нм

Метрологические параметры полученных калибровочных прямых вида $Y = b \cdot X + a$ свидетельствуют о выполнении требований к линейности [Klimenko, L. Yu. et al., 2014] методик, планируемых к применению в судебной токсикологии, для всех вариантов диапазона применения методики и для обоих подходов к оценке их приемлемости.

Определение и оценку приемлемости правильности и сходимости проводили одновременно с проверкой линейности по модельным растворам путем расчета их концентрации X_{calc}^{model}, % с использованием соответствующей линейной зависимости. Полученные значения X_{calc}^{model}, % использовали для расчета δ^{model}, RR^{model}, % и Δ_{sample}^{model}. Для оценки величин δ^{model} и Δ_{sample}^{model} использовали критерии приемлемости в рамках двух подходов: 1) $\delta^{model} \leq 4{,}52\%$; $\Delta_{sample}^{model} \leq 10{,}00\%$; 2) $\delta^{model} \leq 2{,}05\%$; $\Delta_{sample}^{model} \leq 4{,}52\%$ [Klimenko, L. Yu. et al., 2014].

Результаты определения и оценки правильности и сходимости разработанных методик свидетельствуют о том, что предложенные методики количественного определения метронидазола методом УФ-спектрофотометрии характеризуются удовлетворительной правильностью и сходимостью для всех вариантов диапазона применения методики и для обоих подходов к оценке их приемлемости, что дает возможность рекомендовать их к дальнейшему применению в судебной токсикологии с целью разработки методик анализа биологических объектов на содержание в них метронидазола.

Необходимо отметить, что наилучшие показатели линейности, правильности и сходимости зафиксированы для методики с использованием в качестве растворителя 96% этанола, наихудшие – 0,1 моль/л метанольного раствора калия гидроксида, что, по-видимому, объясняется существованием в этаноле наиболее устойчивой формы метронидазола и его пограничным состоянием в 0,1 моль/л метанольном растворе калия гидроксида.