

С. Ю. Гармонов, З. Ч. Нгуен, И. Ф. Мингазетдинов, Л. М. Юсупова,  
Н. С. Шитова, Р. Н. Исмаилова, В. Ф. Сопин

## СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕСАЛАЗИНА В МОЧЕ КАК ТЕСТ ДЛЯ ОЦЕНКИ ФЕНОТИПА АЦЕТИЛИРОВАНИЯ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА

Казанский государственный технологический университет, Казань, Россия

Установлены условия спектрофотометрического определения месалазина в моче при использовании 7-хлор-4,6-динитробензофуросана как аналитического реагента. Оптимальные результаты определений достигаются при длине волны 500 нм и pH 6–8. Предел обнаружения месалазина составляет 0,31 мкг/мл. Показана возможность использования разработанной методики для оценки индивидуальных фенотипов метаболизма процессов ацетилирования месалазина у человека.

**Ключевые слова:** 5-аминосалициловая кислота, моча, спектрофотометрия, метаболизм, фенотип ацетилирования.

Метаболизм лекарственных средств (ЛС) осуществляется путем реакций химической модификации (фаза I – окисление, восстановление, гидролиз) и конъюгации с эндогенными соединениями (фаза II – ацетилирование, сульфатация, глюкоронизация) при участии различных ферментативных систем [1]. Путем N-ацетилирования происходит биотрансформация ЛС, содержащих аминные функциональные группы, и у человека сформированы фенотипы быстрого и медленного метаболизма, различающиеся генетически детерминированной индивидуальной активностью N-ацетилтрансферазы гепатоцитов. Для практики предиктивной медицины предложены способы оценки интенсивности ацетилирования, основанные на хроматографическом и спектрофотометрическом определении различных тест-препаратов (например, изониазид, сульфаниламиды, кофеин) при выведении с мочой и изучении уровня их содержания в крови [1, 2].

Месалазин (месаламин, 5-аминосалициловая кислота, 5-АСК) находит применение для лечения воспалительных заболеваний кишечника, особенно неспецифического язвенного колита и болезни Крона [3, 4]. Для этого часто используются препараты как на основе субстанции месалазина, так и его пролекарств (сульфасалазин, олсалазин, балсалазид) (рис. 1). Однако применение пролекарств месалазина весьма ограничено из-за большого количества побочных эффектов при их применении (лекарственные гепатиты, синдром Стивена-Джонсона, гемолитическая анемия, интерстициальный нефрит и др.), в формирование которых вносят вклад и особенности генетического статуса пациента [3, 4].

В организме под действием ацетилирующих ферментов месалазин метаболизируется, образуя N-ацетилмесалазин (N-ацетил-5-аминосалициловую кислоту). При этом биотрансформация месалазина в организме человека контролируется ферментами N-ацетилтрансферазы 1-го типа (NAT1) и 2-го типа (NAT2). Тем не менее неизвестно, какой именно из этих ферментов играет ключевую роль в N-ацетилиро-

вании месалазина [5]. В то же время для оптимизации режимов дозирования, предотвращения побочных эффектов необходимы способы оценки фенотипов ацетилирования при использовании месалазина как фармакогенетического маркера. При этом выбор надлежащего аналитического метода для количественного определения месалазина в биологических образцах играет важную роль в оценке и интерпретации его биодоступности, биоэквивалентности и индивидуальных различий в фармакокинетических данных.

Для количественного определения месалазина и его метаболита в различных биологических матрицах описаны спектрофотометрические [6] и хроматографические методы [7–13]. Однако в настоящее время в литературе не представлены спектрофотометрические способы оценки интенсивности процессов ацетилирования месалазина при его экскреции с мочой.

В связи с этим цель работы состояла в изучении возможности оценки фенотипа ацетилирования при выведении месалазина с мочой человека спектрофотометрическим методом анализа при использовании 7-хлор-4,6-динитробензофуросана в качестве реагента.

### *Экспериментальная часть*

Спектрофотометрические измерения были проведены на спектрофотометре СФ-26, оптическую плотность исследуемых растворов в видимой области измеряли в кварцевых кюветках с толщиной поглощающего слоя 1 см. Синтез 7-хлор-4,6-динитробензофуросана проведен по описанной ранее методике [14]. Использованы субстанция месалазина (Alfa Aesar, Германия) и его лекарственная форма – таблетки месалазина, покрытые кишечнорастворимой оболочкой по 400 мг (SUN Pharmaceutical Industries Ltd., Индия). В качестве тест-препарата сравнения для оценки фенотипа ацетилирования обследуемых был использован изониазид в дозе 0,45 г при его спектрофотометрическом определении в моче в виде окрашенных производных с метаванадатом аммония [15].

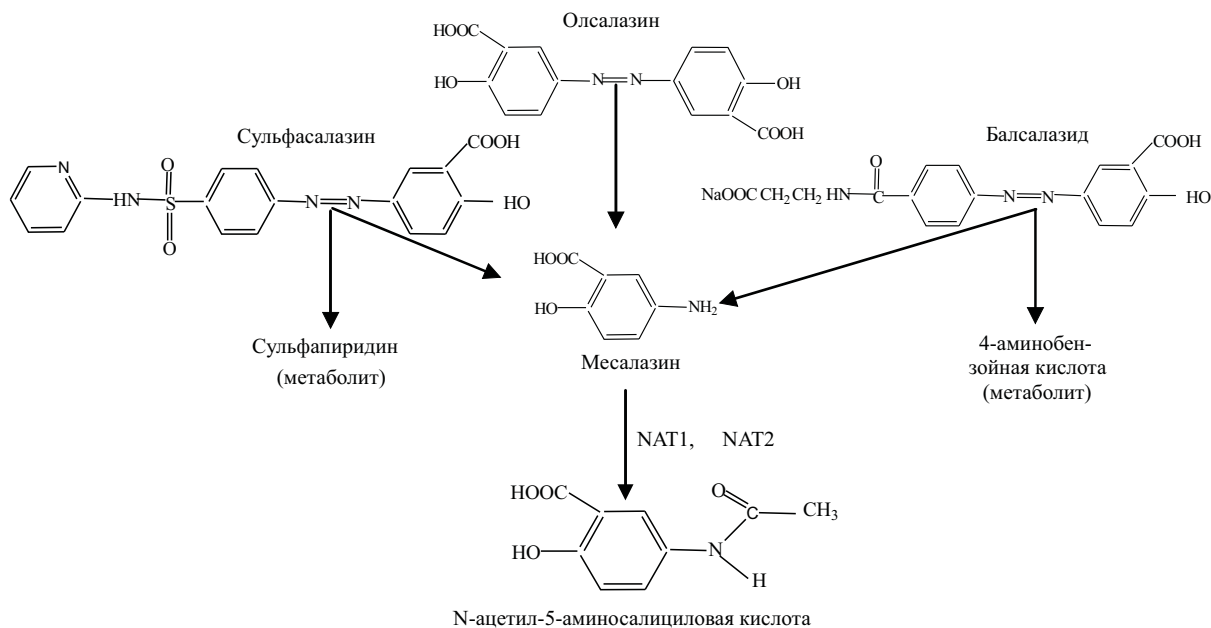


Рис. 1. Схема метаболизма месалазина и его пролекарств в организме человека

**Методика определения.** Для определения содержания месалазина в мочу отбирают 0,5 мл образца анализируемой мочи, добавляют 0,5 мл диметилсульфоксида, 0,15 мл 0,02 М раствора 7-хлор-4,6-динитробензофураксана, 2 мл фосфатного буферного раствора (0,2 М) и доводят дистиллированной водой до метки. Для приготовления раствора сравнения используется образец мочи до приема тест-препарата и все компоненты, кроме реагента, добавляются так же, как и в исследуемый раствор. Через 5 мин после приготовления растворов измеряется их оптическая плотность при длине волны 500 нм и толщине кюветы 1 см. Количество выведенного месалазина определяют по градуировочному графику.

#### Результаты и их обсуждение

Наиболее распространенным в клинической практике методом детектирования содержания тест-препа-

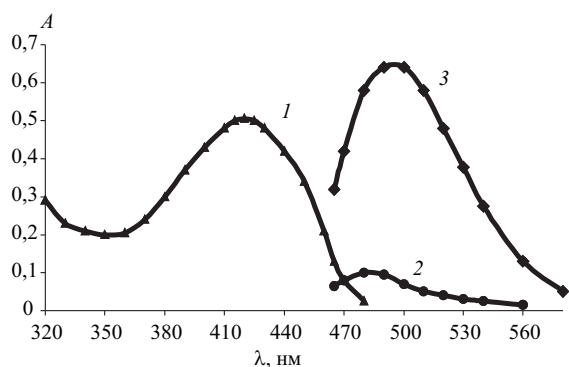
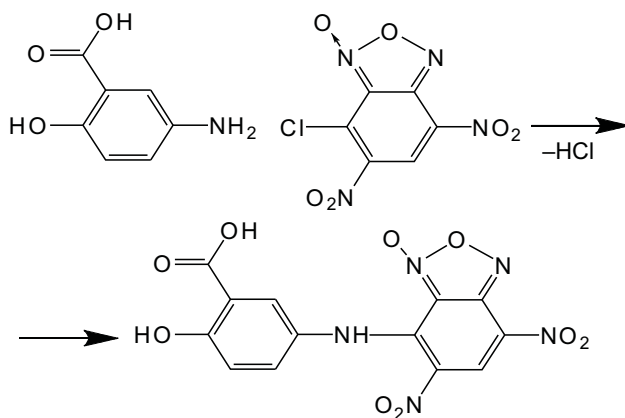


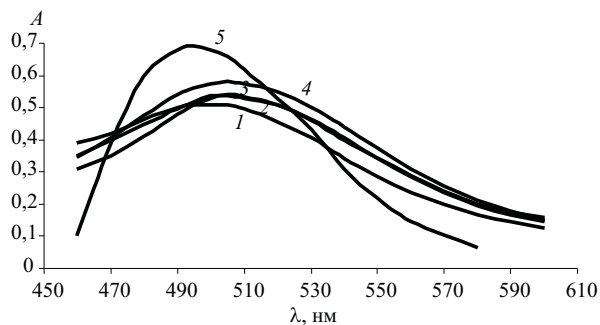
Рис. 2. Спектры поглощения: 1 – 7-хлор-4,6-динитробензофураксана ( $1,5 \cdot 10^{-4}$  М) в ацетонитриле, 2 – в производных компонентов мочи и 7-хлор-4,6-динитробензофураксана ( $1,5 \cdot 10^{-4}$  М), 3 – 4,6-динитробензофураксанового производного месалазина ( $3 \cdot 10^{-5}$  М) в смеси диметилсульфоксид – вода (5:95 % об.), рН = 6,8,  $l = 1$  см

ратов ацетилирования и их метаболитов благодаря универсальности и невысокой стоимости является спектрофотометрия. Однако в этих случаях для достижения избирательности аналитических определений ЛВ в биологических матрицах важным условием является проведение реакций, протекающих с образованием окрашенных соединений.

Взаимодействие месалазина с 7-хлор-4,6-динитробензофураксаном в полярных средах приводит к образованию интенсивно окрашенного в красный цвет устойчивого продукта реакции:



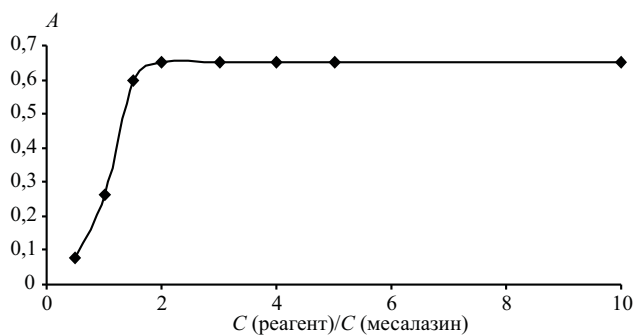
На рис. 2 представлены спектры поглощения растворов 7-хлор-4,6-динитробензофураксана, смеси 7-хлор-4,6-динитробензофураксана с мочой и продукта реакции 7-хлор-4,6-динитробензофураксана с месалазином. Из представленных спектрально-аналитических данных видно, что в условиях анализа при  $\lambda = 500$  нм влияние реагента и мочи на полосы поглощения продукта аналитической реакции весьма незначительно. Как показали проведенные эксперименты, им можно полностью пренебречь, включив эти компоненты в состав раствора сравнения при спектрофотометрическом детектировании.



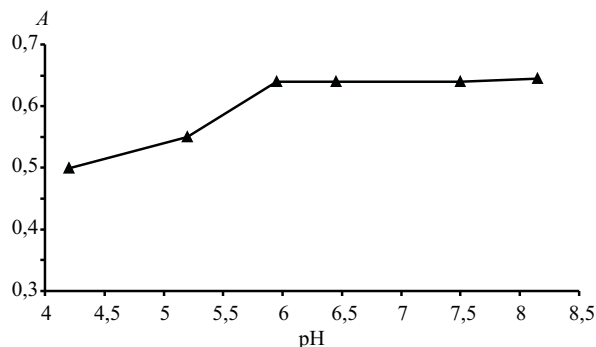
**Рис. 3.** Спектры поглощения 4,6-динитробензофураксановых производных месалазина ( $3 \cdot 10^{-5}$  М): 1 – в воде; 2 – в смеси этанол – вода (30:70, об. %), 3 – в смеси ацетонитрил – вода (30:70, об. %), 4 – в смеси диметилсульфоксид – вода (30:70, об. %), 5 – в смеси диметилсульфоксид – вода (5:95, об. %), рН = 6,8,  $l = 1$  см

Установлено, что используемые добавки органических растворителей при проведении аналитической реакции существенно влияют на устойчивость 4,6-динитропроизводного месалазина и интенсивность его полосы поглощения (рис. 3). Как видно, максимальное светопоглощение наблюдается при использовании смеси диметилсульфоксид – вода (5:95 об. %), что может быть связано с обеспечением оптимальной растворимости продукта реакции. Ранее установлено, что в зависимости от рН среды 4,6-динитробензофураксановые ароматические амины в водных растворах могут существовать в виде различных форм, обусловленных проявлением NH-кислотности соединений [16]. В связи с этим было исследовано влияние рН на интенсивность полосы поглощения продукта реакции (рис. 4). Как видно, наиболее полное образование производного и максимальная интенсивность светопоглощения наблюдается в интервале рН 6–8, причем в этом интервале максимум поглощения соответствует аналитической длине волны 500 нм.

Оптимальную концентрацию реагента при проведении реакции 7-хлор-4,6-динитробензофураксана с месалазином определяли экспериментально. Как видно из данных, представленных на рис. 5, при двукратном и более избытке реагента достигается полное количественное завершение аналитической реакции.



**Рис. 5.** Влияние концентрации реагента 7-хлор-4,6-динитробензофураксана на аналитический сигнал при проведении реакции с месалазином ( $3 \cdot 10^{-5}$  М) в смеси диметилсульфоксид – вода (5:95 об. %),  $\lambda = 500$  нм,  $l = 1$  см



**Рис. 4.** Зависимость оптической плотности от рН при проведении реакции 7-хлор-4,6-динитробензофураксана ( $1,5 \cdot 10^{-4}$  М) и месалазина ( $3 \cdot 10^{-5}$  М) в смеси диметилсульфоксид – вода (5:95 об. %),  $\lambda = 500$  нм,  $l = 1$  см

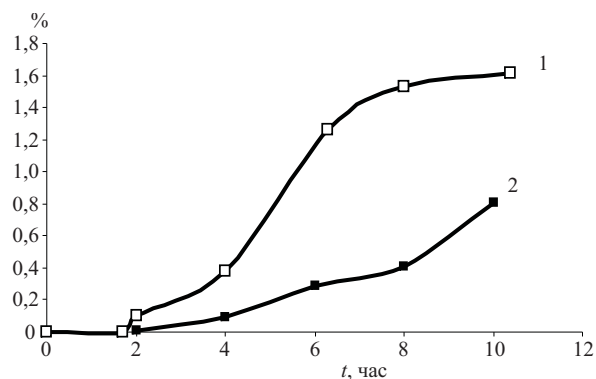
При этом хорошо воспроизводимые зависимости оптической плотности от концентрации месалазина линейны и подчиняются закону Бугера – Ламберта – Бера для области концентраций 0,32 – 4,6 мкг/мл:

$$A = 0,1594C_x (\text{мкг/мл}) + 0,0012 (R^2 = 0,9994; n = 12).$$

Предел обнаружения месалазина, определенный по 3S критерию, при указанных условиях спектрофотометрического определения достигает 0,3 мкг/мл, что ниже интервала фармакокинетических концентраций лекарственного вещества.

Правильность определения месалазина в моче оценивали методом “введено – найдено”. Полученные данные свидетельствовали, что при выбранных условиях детектирования 4,6-динитробензофураксанового производного месалазина компоненты мочи не оказывают мешающего влияния на спектрофотометрические определения аналита.

С помощью разработанной методики избирательного спектрофотометрического определения месалазина в моче проведена оценка его количества при выведении с мочой из организма человека. Предварительно у всех испытуемых оценивали активность процессов ацетилирования при использовании изониазида в качестве тест-препарата по ранее опубликованной мето-



**Рис. 6.** Кинетические кривые выведения свободного месалазина с мочой. Медленный фенотип ацетилирования (1), быстрый фенотип ацетилирования (2). Прием месалазина в разовой дозе 800 мг в виде лекарственной формы месаккола

дике [15], по результатам его экскреции с мочой установлено распределение на группы быстрых (фракция дозы изониазида  $3,25 \pm 0,25$  %, 14 человек) и медленных (фракция дозы изониазида  $9,60 \pm 1,48$  %, 16 человек) ацетиляторов. В последующем в этих же группах при приеме месалазина за 10 ч исследования зафиксировано выведение  $1,6$  % ( $12,89 \pm 1,12$  мг) свободного месалазина у пациентов с медленным фенотипом ацетилирования, а у лиц с быстрым фенотипом ацетилирования  $0,8$  % ( $6,43 \pm 0,51$  мг) соответственно. Кинетические кривые экскреции лекарственного вещества с мочой приведены на рис. 6. При этом значения площадей под фармакокинетическими кривыми (AUC) составляют  $25740 \pm 3270$  и  $12170 \pm 2015$  мкг · ч/мл для групп медленных и быстрых ацетиляторов. Эти результаты согласуются с литературными данными, где количество месалазина, выведенное с мочой, составляет около 3 – 6 % за 72 ч [4].

Установление количества выводимого месалазина в процентах от вводимой дозы (фракции дозы) позволяет судить о фенотипе ацетилирования обследуемых. При этом уровень выводимого неизменным месалазином для быстрых и медленных ацетиляторов различается в 2 раза. Разработанную методику в дальнейшем можно использовать в клинической практике для определения фенотипа ацетилирования пациентов при использовании месалазина в качестве тест-препарата процессов ацетилирования.

## ЛИТЕРАТУРА

1. В. Г. Кукес, С. В. Грачев, Д. А. Сычев, Г. В. Раменская, *Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализированной медицины*, ГЭОТАР-Медиа, Москва (2008).
2. С. Ю. Гармонов, М. И. Евгеньев, И. Е. Зыкова, в кн. “Проблемы аналитической химии”, Т. 11. *Химический анализ в медицинской диагностике*, Наука, Москва (2010), сс. 21 – 65.
3. P. G. Javier, G. Fernando, M. José, M. P. José, *Dig. Dis. Sci.*, **47**(3), 471–488 (2002).
4. W. J. Sandborn, S. B. Hanauer, *Aliment Pharmacol. Ther.*, **17**, 29–42 (2003)
5. L. Hendirk, K. Martina, J. Alexander, et al., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **65**, 47–54 (2009).
6. H.J. Jr. Pieniaszek, T. R. Bates, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **12**(3), 571 – 581(1975).
7. T. Jette, H. H. Steen, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Applications.*, **570**(1), 109 – 1172 (1991).
8. G. Palumbo, G. Carlucci, P. Mazzeo, et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **14**(1–2), 175 – 180 (1995).
9. F. N. Hussain, R. A. Ajjan, M. Moustafa, et al, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Applications.*, **716** (1–2), 257 – 266(1998).
10. B. Beata, N. Jolanta, B. Jerzy, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **22**(2), 341 – 347 (2000).
11. P. Giancarlo, B. Simona, P. Luisa, et al., *Biomed. Chromatogr.*, **19**, 350–354 (2005).
12. M. Nobilis, Z. Vybíralová, K. Sládková, et al., *J. Chromatogr. A.*, **1119**, 299 – 308 (2006).
13. P. Elisabetta, L. Marcello, S. Patrizia, et al., *J. Chromatogr. B.*, **872**(1–2), 99 – 106 (2008).
14. A. S. Bailey, J. R. Case, *Tetrahedron*, **3**, 113 – 131 (1958).
15. С. Ю. Гармонов, Н. С. Шитова, А. В. Яковлева, Р. А. Юсупов, *Хим.-фарм. журн.*, **42**(8), 49 – 53 (2008).
16. М. И. Евгеньев, С. Ю. Гармонов, Л. Ш. Шакирова, А. С. Брысаев, *Хим.-фарм. журн.*, **33**(5), 50 – 53 (1999).

Поступила 01.10.10

## SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF MESALAZINE IN URINE FOR ASSESSING ACETYLATION PHENOTYPE IN HUMAN ORGANISM

S. Yu. Garmonov, Z. C. Nguyen, I. F. Mingazetdinov, L. M. Yusupova, N. S. Shitova, R. N. Ismailova, and V. F. Sopin

Kazan State Technological University, Kazan, Tatarstan,, Russia

Conditions for the spectrophotometric determination of mesalazine in urine by using 7-chloro-4,6-dinitrobenzofuroxane as an analytical reagent have been established. Optimum analytical results are achieved at a wavelength of 500 nm for solution with pH 6 – 8. The detection limit for mesalazine is 0.31 µg/ml. The possibility of using the proposed method for assessing mesalazine acetylation in metabolic processes by individual human phenotypes has been shown.

**Key words:** 5-Aminosalicylic acid, urine, metabolism, spectrophotometry, acetylation phenotype