УДК 543.544.1+678.664+678.046.3

Влияние неорганического наполнителя на характер высвобождения изониазида из полиуретан-эпоксидных композиций

М.В. Григорьева

Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, ул. Леонтовича, 9, 01601, Киев, Украина, e-mail: mvgrigorieva@biochem.kiev.ua

Надійшла: 17 грудня 2010 р./ Прийнята до друку: 24 грудня 2010 р.

Методом обращено-фазовой ВЭЖХ определили высвобождение in vitro изониазида (INH) из полиуретан-эпоксидных композиций (ПЭК) с неорганическим наполнителем – трикальций фосфатом (ТКФ). Показано, что введение в ПЭК ТКФ снижает высвобождение INH в 1,5–3 раза в зависимости от содержания наполнителя.

GRIGORIEVA M.V. EFFECT OF INORGANIC FILLER ON THE PATTERN OF ISONIAZID RELEASE FROM POLYURETHANE-EPOXY COMPOSITES – A reversed-phase HPLC method was used to determine in vitro isoniazid (INH) release from polyurethane-epoxy composites (PEC) with an inorganic filler – tricalcium phosphate (TCP). The TCP introduction into PEC was shown to reduce the INH release 1.5 to 3 times depending on the filler content.

Ключевые слова: изониазид, полиуретан-эпоксидная композиция, трикальций фосфат, модельная среда, ВЭЖХ

Keywords: isoniazid, polyurethane-epoxy composite, tricalcium phosphate, model medium, HPLC

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для лечения туберкулеза всех форм локализации широко используют изониазид – производное гидразида изоникотиновой кислоты.

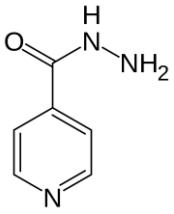

Рис. 1. Структурная формула изониазида

Механизм действия INH основан на его способности ингибировать активность энзимов, синтезирующих главный компонент стенки микобактерий туберкулёза (*Micobacterium tuberculosis)* – миколовую кислоту [1]. Препарат действует бактерицидно на *M.tuberculosis* в стадии размножения и бактериостатически в стадии покоя *M. Tuberculosis.* INH относится к препаратам первого ряда по эффективности лечения, но имеет много побочных эффектов и обладает гепатотоксичностью. Один из приемов, позволяющих снизить вредное воздействие лекарства на организм – введение его в полимерную матрицу, обеспечивает постепенное и пролонгированное выделение его в организме, снижает частоту дозировки, уменьшает побочное токсическое действие [2,3].

Как известно, полиуретаны - одна из наиболее популярных групп полимерных материалов, синтезируемых для медицины [4,5]. Их физико-химические свойства, совместимость с кровью и тканями, способность к биодеградации с успехом используют при разработке имплантатов, покрытий для стентов, депо-форм лекарственных веществ (ЛВ) [6,7]. Гибридные композиционные системы на основе полиуретанов с неорганическими наполнителями: гидроксиапатитом, трикальций фосфатом и др. в которые вводят ЛВ путем диспергирования или иммобилизации, применяют в ортопедии и стоматологии.

При разработке наполненных полимерных композиций с пролонгированным высвобождением ЛВ, необходим контроль таких систем по многим параметрам (биосовместимость, физико-химические свойства, фармакокинетика и т.д.). В частности, прояснение влияния технологии приготовления полимерных композиций на кинетику высвобождения ЛВ из них. Скорость высвобождения ЛВ является одной из состав-

ляющих эффективности, а порой и безопасности таких систем.

Целью данной работы было исследование методом обращено-фазовой ВЭЖХ *in vitro*-высвобождения изониазида (INH) из полиуретан-эпоксидных композиций (ПЭК), наполненных неорганическим наполнителем – трикальций фосфатом (ТКФ) и изучение его влияния на характер высвобождения INH.

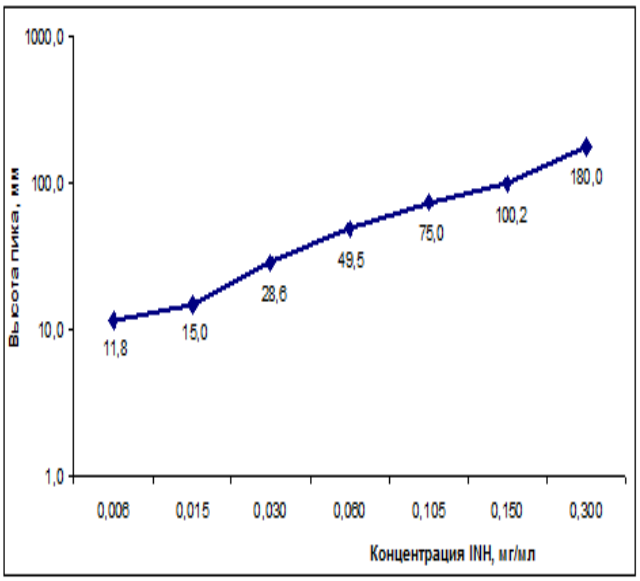

Рис. 2. Калибровочный график зависимости высоты пика изониазида от его концентрации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

В работе использовали метанол (Sigma-Aldrich, Германия), изониазид (Sigma-Aldrich, Германия), неорганические соли квалификация х.ч. (NaH_2PO_4 $2H_2O$; Na_2HPO_4 $12H_2O$) (Химлаборреактив). Объекты исследования – ПЭК, были получены на основе сополимера полиуретана с эпоксидным олигомером с добавлением ТКФ и INH (рис.1). Уретановый олигомер синтезировали на основе олигооксипропиленгликоля с M_n 1001(Sigma-Aldrich, Германия), 2,4-толуилендиизоцианата и 1,4-бутандиола в среде эпоксидной смолы как описано [10].

С целью выяснения влияния ТКФ на процесс выделения INH из ПЭК были получены системы с содержанием ТКФ 0%, 15% и 20% (композиции 1, 2 и 3). INH и ТКФ диспергировали в полимерной матрице. При этом, в составе каждой из трех композиций, концентрация INH была 5%. Наполненные ПЭК, получали в виде пленок, из которых делали навески по 0,01 г, погружали их в бюксы с 1,0 мл модельной среды (0,9% раствор NaCl) и помещали в термостат с температурой 36,6° С. Через определенные промежутки времени, анализировали количество INH в модельной среде методом ОФ ВЭЖХ.

В настоящее время, большинство разработанных методов позволяют проводить мониторинг в биологических образцах одновременно нескольких препаратов, применяемых при лечении туберкулеза, [11-13]. Для количественного определения INH высвобождающегося из ПЭК был выбран метод Panchagnula R. и соавт. [11], т.к. в дальнейшем планировались исследования ПЭК с INH *in vivo*. Состав подвижной фазы в работе [11] был MeOH:Na-фосфатный буфер (0,01М, pH 5,2), (65:35, v/v) . Исходя из вышеизложенного, в наших условиях определения INH в модельной среде (0,9 % раствор NaCl) была использована подвижная фаза – метанол: вода: буфер pH 5,1 (60:30:10, v/v). 0,01 М натрий-фосфатный буфер готовили смешиванием в определенных пропорциях двух солей (Na_2HPO_4/NaH_2PO_4) и доводили до pH 5,1 раствором 0,1 н HCl. Следует отметить, что при выборе условий определения INH были сделаны измерения и при составе подвижной фазы MeOH:H_2O (60:40, v/v). Время удерживания INH в подкисленной фазе (pH 5.1) было меньшим – 2,5±0,1 мин (что было предпочтительным), тогда как высота и форма пиков INH в разных составах подвижной фазы почти совпадали.

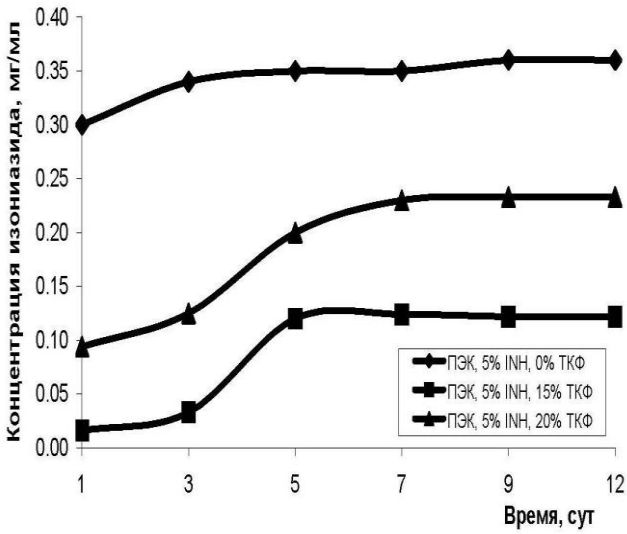

Рис. 3. Высвобождение INH из ПЭК с разным наполнением ТКФ в модельную среду

Исследования проводили на жидкостном хроматографе LKB (Швеция) с УФ-детектором и колонкой Supelcosil LC-8 (150x4,6 мм; 5 мкм; Sigma-Aldrich, Германия), при комнатной температуре, длине волны 254 нм, скорости потока 0,7 мл/мин и объеме пробы 10 мкл.

Концентрацию INH определяли по калибровочному графику (рис.2), который строили по результатам измерений стандартных растворов (табл.1), приготовленных точным разведением основного раствора, содержащего 3 мг/мл INH в смеси метанол:вода (60:40, v/v). Растворы хранили при температуре 4° С. Как видно, гра-

© М.В. Григорьева

дуировочная зависимость линейна в широком диапазоне концентраций (0,015 – 0,15 мг/мл). Статистическую обработку результатов: стандартное отклонение (SD), относительное стандартное отклонение (RSD), регрессионные параметры (a,b) и коэффициент корреляции (*r*) рассчитывали согласно [14]. Доверительные интервалы (M± SD), полученных значений INH для калибровочного графика представлены в табл.1 (*P≤0,05*).

Регрессионная статистика калибровочной кривой представлена в табл.2. Предел обнаружения (LOD) определяли по формуле [15]. Предел количественного определения (LOQ) – наименьшую концентрацию INH, которую можно определить со сходимостью результатов в пределах RSD не превышающих 20 % (такой % считали приемлемым, исходя из неоднородности исследуемых композиций), рассчитывали как в работе [16]

Правильность методики (табл.3) оценивали с помощью тестирования открываемости (R,%) известного количества INH, которую рассчитывали по отношению найдено аналита/введено аналита, умноженного на 100%. Сходимость результатов представлена в табл.4.

Таблица 1. Приготовление стандартных растворов изониазида

Стандартный раствор	Разведения основного раствора	Массовая концентрация INH, мг/мл	Высота пика, мм, M±SD
1	1:500	0,006	11,8 ± 2,9
2	1:200	0,015	15,0 ± 2,4
3	1:100	0,030	28,6 ± 2,8
4	1:50	0,060	49,5 ± 1,6
5	1:30	0,105	75,0 ± 5,7
6	1:20	0,150	100,2 ± 8,8
7	1:10	0,300	180,0 ± 3,0

Таблица 2. Регрессионная статистика калибровочной кривой изониазида Y = a + bC (Y – высота пика, C **–** концентрация изониазида, мг/мл)

Диапазон концентраций, мг/мл	0,006–0,300
Регрессионный коэффициент, a	0,80
Регрессионный коэффициент, b	0,69
Коэффициент корреляции, r	0,999
Предел обнаружения (LOD), мг/мл	0,006
Предел определения (LOQ), мг/мл	0,015
Количество точек на калибровочной линии	7

Таблица 3. Оценка правильности метода определения INH в модельной среде

Введено, мг/мл	Найдено, мг/мл	Введено/найдено, (R) %	Количество определений
0,060	0,060±0,003	100,0	3
0,105	0,106±0,005	101,0	5
0,150	0,149±0,015	99,3	5
0,300	0,289±0,015	96,3	5

Таблица 4. Сходимость метода определения INH в модельной среде

	Массовая концентрация INH, мг/мл	Сходимость, RSD, %	Количество определений
Изониазид	0,06	0,10	5
	0,15	0,05	5
	0,30	0,04	4

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Следует отметить, что при создании ПЭК происходит объединение методов химической и физической модификации полимерных материалов, состоящих из эпоксидного олигомера и сегментированного полиуретана. Такая смесь до отверждения гомогенна, однако при отверждении вследствие увеличения молекулярной массы эпоксидного олигомера, система переходит в двухфазную. В зависимости от скорости отверждения и процесса фазового разделения системы, формируются различные морфологические структуры, связанные с ее физико-механическими и другими свойствами [17]. Полимер являясь своеобразной матрицей для ТКФ и INH, так или иначе взаимодействует с ними, в результате изменяется агрегатное состояние частиц ТКФ, которые служат центрами физических сшивок [18], изменяется дисперсность лекарства [19] и свойства самого полимера [20].

Исходя из вышеизложенного, для изучения свойств полученных полимерных композиций, а именно влияние минеральной неорганической фазы на кинетику высвобождения INH, моделировали процесс его высвобождения из ПЭК *in vitro*. Исследовали два типа полимерных пленок: без ТКФ (0%, композиция 1) с заметными кристаллами ЛВ, расположенными ближе к поверхности и полимерные пленки с ТКФ (15%, 20% - композиции 2,3), в которых, визуально, ЛВ распределено более однородно. В качестве контроля использовали образцы ПЭК без ТКФ и INH. В течение всего исследования на хроматограммах этих образцов не было обнаружено никаких побочных пиков. Характеризуя кинетику высвобождения INH из ПЭК, определяли его концентрацию в модельной среде в начале экспозиции и в фиксированные интервалы времени (1-, 3-, 5-, 7-, 9-, 12-е сут), после каждого измерения среду меняли, затем результаты обобщили. На рис.2 представлена суммарная концентрация INH, высвобжденного из композиций 1, 2, 3.

Характер высвобождения INH из композиции 1, не содержащей ТКФ, можно описать как двустадийный. На первой стадии, 1-е и 3-и сут, наблюдали «бурное» его высвобождение, при этом в модельную среду диффундировало 60–68% INH. Далее на второй стадии, с 5-ых по 12-ые сут, наблюдали незначительное высвобождение INH, что к 12 сут в целом составило 70–72% INH (от введеного в ПЭК).

Из композиций 2 и 3 (15%, 20% ТКФ) INH высвобождался с постоянной скоростью. В пересчете на проценты это 3,8% и 4,7% INH в сутки соответственно для композиции 2 и 3. К концу 7-ых сут из этих композиций диффундировало в модельную среду 24 и 46% от введенного в полимерную матрицу INH, а на 9- и 12-ые сут пики INH на хроматограммах отсутствовали.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что из ПЭК с ТКФ в модельную среду высвобождается меньше INH, чем из ПЭК без ТКФ. Можно предположить, что в процессе приготовления ПЭК при отверждении и формировании структуры полимерной пленки без ТКФ, INH "выпотевает" на ее поверхность, что и объясняется таким высоким процентом его высвобождения (не характерным для сшитых и непористых полимеров). В тоже время, одновременное введение двух наполнителей ТКФ и INH, по-видимому, обеспечивает большую совместимость всех компонентов полимерной смеси, в результате, наполнители диспергированы однороднее по всему объему полимера, что и приводит к снижению высвобождения INH. Вероятно необходимы дополнительные ультраструктурные и морфологические исследования ПЭК, позволяющие выбрать оптимальное соотношение компонентов полимерной системы и отработать технологию приготовления таких ПЭК, сочетающих в себе широкий спектр потребностей: биосовместимость, прочность, контролируемое высвобождение активного агента, что позволит в будущем применять их как биоактивные синтетические материалы для заполнения костных дефектов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на основании *in vitro* исследований высвобождения INH из полиуретан-эпоксидных композиций, установлено, что введение INH в полимерную матрицу пролонгирует его высвобождение, а увеличение процента наполнения ТКФ в таких композициях приводит к снижению высвобождения INH 1,5–3 раза по сравнению с ПЭК без ТКФ.

Автор благодарен канд. хим. наук Куксину А.Н. за полимерные материалы, предоставленные для исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика.– М.: Мир, 1991.– 543с.

2. Fromstein J.D., Woodhouse K.A. Elastomeric biodegradable polyurethane blends for soft tissue application //J. Biomater. Sci. Polymer. End. – 2002 . –13. P.391-406.

3. Zahoor Ahmad1, Rajesh Pandey , Sadhna Sharma, G.K. Khuller Novel chemotherapy for tuberculosis: chemotherapeutic potential of econazole- and moxifloxacin-loaded PLG nanoparticles // Inter. J. Antimicrob.Agents. – 2008. – 31. – P.142-146.

© М.В. Григорьева

4. Grigorieva M., Zakashun T., Galatenko N. Polyurethane-based extended release form of piroxikam //Macromol. Symp. –2007. – 254. – P.414-417.

5. Sershen S., West J. Implantable, polymeric systems for modulated drug delivery // Adv. Drug .Deliv. Rev. – 2002. – 54. – P.1225-1234.

6. Guan J., Sacks M.S., Beckman E.J. et al. Preparation and characterization of highly porous, biodegradable polyurethane scaffolds for soft tissue applications // Biomaterials. – 2005. –26. – P.3961-3971.

7. Fromstein J.D., Woodhouse K.A. Elastomeric biodegradable polyurethane blends for soft tissue application //J. Biomater. Sci. Polymer. End. – 2002 . –13. – P.391-406.

8. Khan A.S.,. Ahmed Z.,. Edirisinghe M.J. et all. Preparation and characterization of a novel bioactive restorative composite based on covalently coupled polyurethane-nanohydroxyapatite fibres // Acta Biovaterialia. – 2008 .– 4. – P. 1275-1287.

9. Puppi D., Chiellini F., Piras A.M., Chiellini E. Polymeric materials for bone and cartilage repair // Progress in Polymer Science. –2010.– 35. – P.403-440

10. Галатенко Н. А., Куксин А.Н., Рожнова Р.А., Остапенко О.О. Біодеградуємий матеріал біоактивної дії на основі поліуретан-епоксидних композицій в якості носіїв лікарських речовин // Полімерн. журн. –2008. – 30,№ 2. – С.169-173.

11. Panchagnula R., Sood A., Sharda N., Kaur K., Kaul C. Determination of rifampicin and its main metabolite in plasma and urine in presence of pyrazinamide and isoniazid and by HPLC method // J.Pharm.Biomed. Anal. – 1999. – 18. – P.1013-1020.

12. Moussa L.A., Khassouani C.E., Soulaymani R. Therapeutic isoniazid monitoring using a simple high-performance liquid chromatographic method with ultraviolet detection // J. Chromatogr. –2001. – 766. –P.181-187.

13. Glass BD, Agatonovic-Kustrin S, Chen YJ, Wisch MN optimization of a stability-indicating HPLC method for the simultaneous determination of rifampicin, isoniazid, and pyrazinamide in fixed-dose combination using artificial neural networks // J. Chromatogr. Sci. – 2007. – 45. – P.38-44.

14. Гордон А., Форд Р. Спутник химика.– М.:Мир.– 1976.– 541с.

15. Дерффель К. Статистика в аналитической химии.– М.:Мир.– 1994.– с.173-175.

16. Эпштейн Н.А Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ-методик в фармацевтическом анализе // Хим.-фарм. журн. – 2004. – 38, №4. – С. 40-56.

17. Jiao J., Sun X., Pinnavaia T.J. Mesostructured silica for the reinforcement and toughening of rubbery and glassy epoxy polymers // Polymer. – 2009. – 50. – 983-989.

18. Bawa R., Siegel R., Maraska B. et al. An explanation for the controlled release of macromolecules from polymers // J. Controlled Rel. – 1985. – 1. – P.259-267.

19. Wormuth K., DeWitt D., Haugstad G. Characterization of drug eluting coatings on medical devices. // Polym Prepr. – 2005. – 49. – P.1222.

20. Галатенко Н.А., Куксин А.Н., Григорьева М.В. Наноструктурированные полимер-эпоксидные композиции с изониазидом: Тез.докл. Междунар.симп. «Нанофотоника» .– Ужгород .– 2008 .– С.12