

Н. Р. Муртазина¹, Э. П. Медянцева¹, В. В. Писарев², С. А. Еремин³**ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУЛЬФАМЕТАЗИНА
В РЕЧНОЙ ВОДЕ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ**¹ Казанский государственный университет им. В. И. Ульянова-Ленина;² ФГУП "Государственный научный центр по антибиотикам", Москва;³ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Сульфонамиды являются классом синтетических лекарственных препаратов, обладающих бактериостатическим эффектом в отношении бактерий, вирусов, грибов, простейших. Несмотря на выработанную резистентность некоторых штаммов бактерий к сульфонамидам [1], многие сульфонамидные препараты применяются в клинической практике и в настоящее время, обладая тем преимуществом перед антибиотиками, что они не вызывают дисбактериозов — главного осложнения антибиотикотерапии. Поиск новых методов определения лекарственных препаратов для оценки их качества и определения их содержания в организме человека и животных — актуальная задача в связи с требованиями улучшения качества жизни и увеличения поступлений фальсифицированной продукции на фармацевтический рынок в последнее время. В связи с этим необходимы простые, доступные и точные методы для анализа сульфонамидов в целях контроля их содержания в различных источниках, в том числе, в продуктах сельского хозяйства, лекарственных формах и окружающей среде, например, в сточных водах фармацевтических заводов.

Для определения широкого круга сульфонамидов в различных образцах разработаны методы капиллярного электрофореза [2, 3], спектрофотометрии [4, 5] и хроматографии с масс-спектрометрическим, спектрофотометрическим или флуоресцентным детектированием [6, 7]. Эти методы достаточно дорогостоящие и требуют специального комплексного оборудования, вследствие чего затруднительно применять их для

массовых определений. В настоящее время в практических целях для определения сульфонамидов в биологических образцах применяются микробиологические тест-системы, основанные на ингибировании роста бактерий *Bacillus subtilis* или *Micrococcus luteus* при действии антибиотиков из приложенного образца [8]. Несмотря на возможно низкую стоимость эти методы достаточно трудоемкие и длительные. Помимо этого существует риск ложноположительных и ложноотрицательных результатов [9].

Для определения качества сульфонамидных препаратов утверждены методы государственной фармакопеи. Эти методы включают титрование, УФ-, ИК-, ПМР- спектроскопию, потенциометрию. Идентификация сульфонамидов по форме спектров поглощения [10] иногда затруднительна в присутствии примесей, особенно неизвестного состава. Методы титрования, в основном, используют реакции, обусловленные наличием ароматической аминогруппы (общей для всех сульфонамидов), поэтому не могут применяться для количественного определения индивидуальных сульфонамидов в смеси. Невозможно с достоверной точностью определить содержание искомого компонента в контролируемых смесях, в том числе в смесях с другими лекарственными препаратами, поскольку возможны побочные реакции.

По сравнению с химическими и физико-химическими методами анализа, иммуноанализ имеет ряд преимуществ, которые включают стоимость, точность и экспрессность. Сочетание высокой селективности взаи-

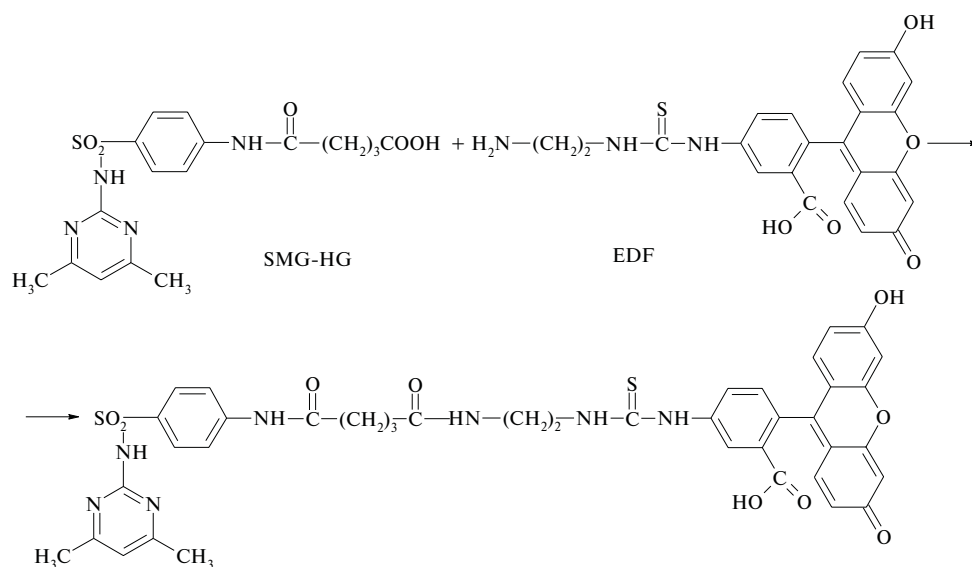


Рис. 1. Реакция образования трейсера SMZ-HG-EDF

модействия антиген — антитело и чувствительности подходящего метода детектирования иммунного комплекса позволяет определять биологически активные соединения на уровне ниже предельно допустимых концентраций. Иммунохимические методы позволяют варьировать чувствительность определений по отношению к структурно-подобным соединениям за счет использования антител с различной специфичностью. Таким образом, иммуноанализ представляется подходящим спосо-

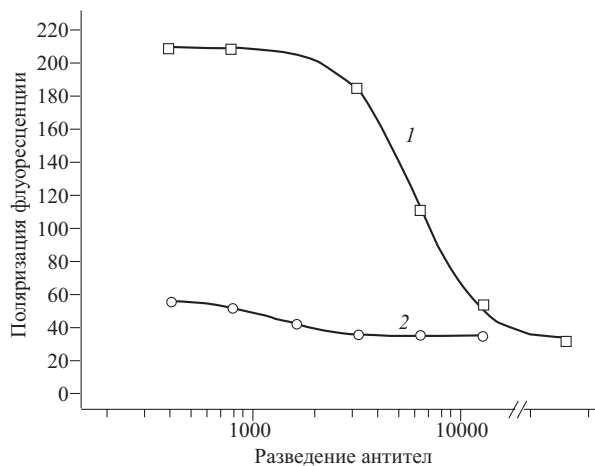


Рис. 2. Кривая связывания антител с трейсером SMZ-HG-EDF: 1 – специфическая антисыворотка; 2 – нормальная сыворотка

бом определения сульфонамидов в рутинных анализах лекарственных форм.

В настоящей работе предложен вариант иммунохимического определения сульфаметазина в речной воде и таблетках на основе поляризационного флуоресцентного иммуноанализа с использованием антител для иммунохимического определения и других препаратов класса сульфонамидов.

Экспериментальная часть

Аппаратура, объекты исследования, используемые реактивы

Сульфаметазин (SMZ), сульфадиазин (SDZ) и другие сульфонамиды, N- гидроксисуксинимид (NHS), дидицлогексилкарбодимид (DCC), азид натрия были приобретены в фирме “Sigma” (Poole, Dorset, UK).

Использовали диметилформамид (ДМФА) марки ч, метанол, хлороформ, ацетонитрил марки х.ч. отечественного производства, а также раствор гидроксида калия (0,1 М), приготовленный по точной навеске, и 0,1 М HCl (фиксанал); в качестве рабочего буфера для измерений поляризации флуоресценции — 25 мМ боратный буфер (рН 8,0), содержащий 0,1 % азида натрия.

Специфичная сыворотка к сульфонамидам была получена иммунизацией овец смесью семи конъюгированных с БСА фталевых производных сульфонамидов (сульфадиметоксина, сульфатаиазола, сульфадиазина, сульфаметазина, сульфаметоксазола, сульфаметизола, сульфаметоксипиридазина) и любезно предоставлена Dr. Ramadan Abuknesha (King’s College, London, UK) [11].

Стандартные растворы сульфонамидов в воде и искусственно приготовленные образцы воды с добавлением сульфаметазина готовили последовательным разбавлением в дистиллированной или природной воде из исходного раствора сульфонамида в метаноле с концентрацией 1 мг/мл.

Для титрования тиола использовали 0,5 % раствор крахмала, а также исходные растворы йода с точной

концентрацией 0,04911 н. и тиосульфата натрия с точной концентрацией 0,05154 н., из которых методом последовательного разбавления получали растворы с концентрацией $9,822 \times 10^{-4}$ н. и $0,5154 \times 10^{-4}$ н., соответственно.

Флуоресцеин-тиокарбамил этилендиамин (EDF) был синтезирован с использованием изомера I флуоресцеин изотиоцианата фирмы Sigma (St Louis, USA) и этилендиамина дигидрохлорида фирмы “Реахим” (Россия) по методике, описанной в работе [12].

Силиконовые пластинки для тонкослойной хроматографии (категория № 5554, толщина слоя 0,25 мм) получены из фирмы Merck (Dagenham, Essex, UK).

Поляризацию и интенсивность флуоресценции измеряли на приборе Beacon 2000 (PanVera, USA) в статическом режиме при 25° С.

Таблица 1
Кросс-реактивность антител по отношению к соединениям сульфонамидного ряда

Соединение	Кросс-реактивность, %	Структура радикала (R)	Применяли для получения иммуногена
Сульфаметазин	100		+
Сульфатаиазол	617		+
Сульфамеразин	337		—
Сульфадиметоксин	228		+
Сульфаметоксипиридазин	176		—
Сульфаклорпиридазин	82		+
Сульфаметоксазол	20		+
Сульфадиазин	20		+
Сульфаметизол	15		+
Сульфаниламид	< 1	-NH ₂	—

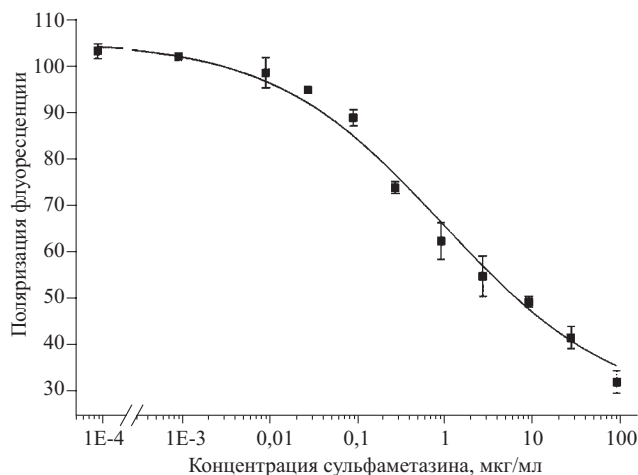


Рис. 3. Градуировочный график зависимости поляризации флуоресценции трейсера при связывании с антителами в присутствии стандартов сульфаметазина в области концентраций 0,001 – 100 мкг/мл

Синтез трейсера сульфаметазина с флуоресцеин-тиокарбамил этилендиамином (SMZ-EDF)

Для получения трейсера сульфаметазина с флуоресцеин-тиокарбамил этилендиамином (SMZ-EDF)

Для получения трейсера прежде всего получали глутарат сульфаметазина (SMZ-HG). Смесь 2,78 г SMZ (100 ммоль) и 1,6 г глутарового ангидрида (140 ммоль) растворяли в 50 мл безводного этанола и кипятили в течение 2 ч. Реакционную смесь охлаждали и добавляли 20 мл гексана для кристаллизации продукта реакции. Глутарат сульфаметазина фильтровали, промывали этанолом и высушивали в вакууме. К 7,8 мг полученного производного сульфаметазина (0,02 ммоль) прибавляли раствор 2,3 мг NHS (0,02 ммоль) и 4,1 мг DCC (0,02 ммоль) в 0,5 мл ДМФА. Реакционную смесь перемешивали и выдерживали при комнатной температуре в течение суток. 2 мг синтезированного ранее EDF (4,4 мкмоль) добавляли в реакционную смесь, перемешивали, выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч. Полученный трейсер был очищен с помощью тонкослойной хроматографии (элюент — смесь хлороформ/метанол (4/1)). Полосу с R_f 0,69 снимали с хроматограммы и экстрагировали метанолом. Полученный раствор трейсера хранили при 4° С.

Таблица 2

Результаты определения сульфаметазина в речной воде

Концентрация SMZ, мкг/мл	Значение поляризации флуоресценции (mP)	Найдено, мкг/мл	Открытие, %
0	104,1 ± 3,2	0	101
0,25	77,4 ± 4,2	0,26 ± 0,11	104
0,5	71,8 ± 1,3	0,51 ± 0,07	102
1	66,1 ± 2,7	0,99 ± 0,26	99
10	46,9 ± 1,0	10,53 ± 1,36	105
20	42,9 ± 2,0	19,44 ± 5,24	97

Концентрацию трейсера определяли по значению оптической плотности разбавленных растворов трейсера в карбонатном буфере при 492 нм. Коэффициент экстинкции флуоресцеина находили на основе графика зависимости оптической плотности от концентрации флуоресцеина, он равен $8,78 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Проведение поляризационного флуориммуноанализа сульфаметазина

Для построения зависимости интенсивности флуоресценции метки от концентрации растворов трейсера, в пробирку добавляли 300 мкл раствора трейсера (различные концентрации) и 200 мкл боратного буфера, измеряли интенсивность флуоресценции раствора.

Для построения кривой связывания антител 300 мкл раствора трейсера (0,57 нМ) добавляли к 200 мкл раствора антител в последовательном разведении от 1/200 до 1/100000. По результатам измерений строили графическую зависимость поляризации флуоресценции трейсера при связывании с антителами от разведения антител.

Для проведения конкурентного иммуноанализа 50 мкл сульфаметазина, 300 мкл раствора трейсера в боратном буфере, 100 мкл боратного буфера и 50 мкл антисыворотки (разведение 1/460) добавляли в пробирку и измеряли поляризацию флуоресценции трейсера при связывании с антителами в присутствии аналита. Кривые связывания антител и калибровочные кривые зависимости связывания от концентрации гаптена строили в программе Origin 6.0 согласно уравнению $y = (A_1 - A_2)/(1 + [x/x_0]^p) + A_1$, где A_1 и A_2 — значения максимальной и минимальной поляризации флуоресценции, p — наклон кривой, x_0 — значение IC50.

Кросс-креативность рассчитывали согласно уравнению $CR(\%) = (IC_{50, \text{SMZ}}/IC_{50, \text{аналог}}) \times 100$, где $IC_{50, \text{SMZ}}$ и $IC_{50, \text{аналог}}$ — значения концентраций, соответствующих 50 % связывания, на калибровочных кривых для сульфаметазина и структурно-подобного компонента, соответственно, определенных в одних и тех же условиях (одинаковые концентрации трейсера и используемых антител).

Пробоподготовка образцов

Для определения содержания сульфонамидов в воде использовали профильтрованную речную воду (р. Воронеж, Липецк), взятую из двух мест. Для определения содержания сульфаметазина в таблетках сульфаметазина (ФГУП «Мосхимфармпрепараты» им. Н. А. Семашко, 0,5 г), пять таблеток взвешивали, растирали в порошок. 0,25 г порошка суспендировали в 10 мл одного из растворителей: метанола, ацетонитрила, 0,1 М HCl или 0,1 KOH. Перемешивали 2 ч, суспензию центрифугировали 15 мин при 4000 об/мин. Аликвоту раствора 0,1 мл разбавляли 0,9 мл воды и получали разведение 1/10, из этого раствора методом последовательного разбавления в воде приготавливали разведения от 1/100 до 1/10⁶. Разведения 1/10000, 1/20000 и 1/100000 использовали для определения поляризации флуоресценции в условиях, описанных выше. Содержание сульфаметазина определяли по

Таблица 3
Результаты определения сульфаметазина в таблетках

Растворитель	Разведение порошка таблеток	Значение поляризации флуоресценции, (mP)	Расчислено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл	Открытие, %
Метанол	1/100000	91,4 ± 4,5	0,21	0,15 ± 0,06	71
Ацетонитрил		86,1 ± 4,8		0,20 ± 0,04	95
HCl (0,1M)		88,3 ± 4,0		0,22 ± 0,08	104
KOH (0,1M)		—		—	—
Метанол	1/20000	74,4 ± 3,1	1,1	0,84 ± 0,20	78
Ацетонитрил		71,8 ± 1,3		1,03 ± 0,11	94
HCl (0,1 M)		70,8 ± 3,3		1,14 ± 0,30	104
KOH (0,1 M)		61,7 ± 2,7		2,67 ± 0,62	243
Метанол	1/10000	65,7 ± 4,3	2,1	1,81 ± 0,59	86
Ацетонитрил		64,0 ± 2,6		2,14 ± 0,38	102
HCl (0,1 M)		64,4 ± 3,1		2,05 ± 0,52	98
KOH (0,1 M)		50,2 ± 3,7		10,1 ± 3,9	481

градуировочной зависимости поляризации флуоресценции от концентрации сульфаметазина.

Результаты и их обсуждение

Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ основан на увеличении значения поляризации флуоресценции метки при связывании с высокомолекулярным соединением (антителом). В присутствии анализируемого соединения происходит конкуренция с его аналогом, меченым флуоресцеином за связывание с антителами. Поляризация флуоресценции обратно пропорциональна количеству анализируемого соединения [13].

Для проведения анализа синтезирован трейсер — соединение гаптена с флуоресцентной меткой SMT-HG-EDF. Связывание метки с сульфонамидом происходит через карбоксильную группу глутарата сульфаметазина и аминогруппу производного флуоресцеина (рис. 16). Анализ представлен с использованием антисыворотки, специфичной к сульфонамидам.

Оптимальную концентрацию трейсера определяли по кривой зависимости интенсивности флуоресценции метки от концентрации растворов трейсера. Для построения зависимости использовали растворы с разной концентрацией трейсера, по результатам измерений строили графическую зависимость. Уравнение линейного участка этой зависимости имеет вид: $IT = (31,5 \pm 1,9) + (338,9 \pm 3,1) \times C_t$, $r = 0,9993$, где C_t — концентрация трейсера, нМ; IT — интенсивность флуоресценции метки. На основе зависимости находили минимальную концентрацию трейсера, которая до-

стоверно детектируется на приборе. Трейсер с концентрацией 0,57 нМ (интенсивность 222), что соответствует разведению исходного раствора трейсера 1/3000, использовали для определения связывания с антителами. К раствору трейсера добавляли антитела в разведении от 1/400 до 1/100000 и фиксировали значение поляризации флуоресценции трейсера при связывании с антителами в разных разведениях. На рис. 2 представлены зависимости поляризации флуоресценции трейсера при его связывании со специфическими антителами и для сравнения с нормальной неиммунной сывороткой. Форма кривой и величина сигнала служат критериями связывания. Рабочее разведение антител, соответствующее 75 % ингибирования поляризации флуоресценции на кривой зависимости поляризации флуоресценции связанного трейсера от разведения антител, выбрали для дальнейших исследований [14]. К 50 мкл стандарта сульфаметазина добавляли раствор трейсера (в разведении 1/3000) и затем — раствор антител (разведение 1/460). Гаптен и меченый флуоресцеином его аналог конкурируют за связывание с антителами, сигнал флуоресцеина возрастает пропорционально уменьшению концентрации свободного гаптена в системе. Была построена калибровочная зависимость поляризации флуоресценции трейсера при связывании с антителами в присутствии стандартов сульфаметазина в области концентраций 0,001 – 100 мкг/мл (рис. 3). Предел определения сульфаметазина методом флуороиммуноанализа с использованием трейсера SMTZ-EDF составил 6 нг/мл, а линейный интервал определяемых концентраций 0,05 – 25,7 мкг/мл.

Кросс-реактивность оценивали с использованием соединений сульфонамидного ряда, в том числе сульфонамидов, которые использовались для получения иммуногена. Значения кросс-реактивности представлены в табл. 1. Как видно из таблицы, наибольшие значения кросс-реактивности наблюдаются для более разветвленных соединений или соединений с гетероциклическими функциональными группами (например, для сульфамеразина, сульфатиазола, сульфадиметоксина, сульфаметоксипиридазина, сульфаклорпиридазина), тогда как сульфаниламид, имеющий в качестве радикала только аминогруппу не дает связывания в данных условиях (табл. 1). Основные соединения, из изученных, которые применялись для производства антител в качестве иммуногена, в большинстве также показали высокое значение кросс-реактивности, что может быть связано с особенностями получения антисыворотки. Можно сделать заключение, что исследованные антитела обладают неравномерной групповой специфичностью и могут быть использованы для чувствительного определения некоторых соединений сульфонамидного ряда.

Предложенный метод поляризационного флуоресцентного иммуноанализа был применен для определения содержания сульфаметазина в природной воде и в таблетках по методике, описанной в экспериментальной части. Для определения были использованы об-

разцы природной воды с содержанием сульфаметазина 0, 0,005, 0,25, 0,5, 1, 10 и 20 мкг/мл. Результаты определений представлены в табл. 2. Содержание сульфаметазина в речной воде оказалось ниже предела определения разработанного иммуноанализа, что было подтверждено методом “введено-найдено”.

Для определения сульфаметазина в таблетках, 5 таблеток растирали в порошок и порошок суспендировали в следующих растворителях: метаноле, ацетонитриле, 0,1 М HCl и 0,1 М KOH для оптимизации процесса пробоподготовки. После центрифугирования надосадочную жидкость использовали в качестве исходного раствора для получения последовательно разбавленных растворов в воде. Определение проводили в прежних условиях проведения иммуноанализа на основе стандартов сульфаметазина.

Линейный интервал зависимости поляризации флуоресценции от разведения исходного раствора таблеток в воде $1/2000 - 1/2 \times 10^6$ (метанол), $1/1400 - 1/77400$ (ацетонитрил), $1/11500 - 1/3 \times 10^6$ (раствор HCl), $1/3000 - 1/16 \times 10^4$ (раствор гидроксида калия).

Для определения использовали разведения исходного раствора таблеток $1/10000$, $1/20000$ и $1/100000$, поскольку значения поляризации флуоресценции лежат в пределах линейного участка калибровочной кривой для определения сульфаметазина и зависимости поляризации флуоресценции от разведения исходного раствора таблеток в воде (кроме разведения $1/100000$ для гидроксида калия в качестве растворителя). Концентрацию сульфаметазина в определяемых растворах рассчитывали согласно уравнению $y = ((112,5 - 34,613)/(1 + x/0,8827)^{0,5686}) + 34,613$. Результаты определений представлены в табл. 3. Очевидно, что 0,1 М гидроксид калия не годится для описанной процедуры пробоподготовки таблеток сульфаметазина. Результаты определений, наиболее близкие к указанному на упаковке содержанию сульфаметазина, наблюдаются при использовании ацетонитрила и 0,1 М HCl в качестве экстрагента.

Точность результатов разработанного варианта иммуноанализа оценивали с помощью E - и t -критерия [15]. Проведено сопоставление рассчитанных и табличных значений F - критерия: $F_{\text{расч}}/(18) < F_{\text{табл.}}(19)$. Расхождения между средними результатами незначи-

мы ($t_{\text{расч.}}(3,9) < t_{\text{табл.}}(4,3)$). Метод является равнозначным в диапазоне определяемых концентраций.

Таким образом, показана возможность определения сульфаметазина в лекарственных формах с целью контроля их качества с помощью метода поляризационного флуоресцентного иммуноанализа. Разработанный метод охватывает широкий интервал определяемых концентраций, является быстрым и эффективным для проведения серийных анализов. Метод является гомогенным и не требует стадии отделения иммунного комплекса от других компонентов реакционной смеси, что упрощает процедуру определений.

Авторы благодарят Dr. Ramadan Abuknesha (King's College, Лондон, Великобритания) за предоставленные для работы специфические антитела против сульфонамидов. Финансовая поддержка осуществлялась при содействии РФФИ (грант № 03-03-33116) и Министерства образования РФ (грант А03-2.11-24).

ЛИТЕРАТУРА

1. P. Shears, *Lancet*, **27**, 517 (1988).
2. M. Hows, D. Perrett, and J. Kay, *J. Chromatogr.*, **768**, 97 – 104 (1997).
3. M. Fun and S. Chu, *Anal. Chim. Acta*, **499**, 215 – 221 (2003).
4. M. I. Evgen'ev, S. Yu. Garmonov, and L. Sh. Shakirova, *J. Anal. Chem.*, **57**(1), 73 – 79 (2002).
5. M. T. Tena, M. D. Luque de Casto, and M. Valcarcel, *Analyst*, **119**(7), 1625 – 1628 (1994).
6. R. M. Smith, O. Chienthavorn, S. Saha, et al., *J. Chromatogr. A*, **886**(1 – 2), 289 – 295 (2000).
7. G. Stoev and A. Mihailova, *J. Chromatogr. A*, **869**(1 – 2), 275 – 284 (2000).
8. R. K. Buick, N. M. Greer, and C. T. Elliott, *Analyst*, **125**(393 – 396) (2000).
9. G. Korsrud, M. Papich, A. L. Fesser, et al., *J. Food Prot.*, **59**, 161 – 166 (1996).
10. В. Г. Беликов, *Фармацевтическая химия в 2 ч, Ч. 2. Специальная фармацевтическая химия*, Пятигорск (1996), сс. 229 – 250.
11. J. Tschmelak, M. Kumpf, G. Proll, and G. Gauglitz, *Anal. Lett.*, **37**(8), 1701 – 1718 (2004).
12. C. Nistor, A. Oubina, M.-P. Marco, et al., *Anal. Chim. Acta*, **426**, 185 – 195 (2001).
13. С. А. Еремин, *Журн. Всес. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева*, **34**(1), 46 – 51 (1989).
14. P. Onnerfjord, S. Eremin, J. Emneus, and G. Marco-Vagra, *J. Immunol. Methods*, **213**, 31 – 39 (1998).
15. А. К. Чарыков, *Математическая обработка результатов химического анализа*, Химия, Ленинград (1984), с. 168.

Поступи ла 20.05.04