ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

ნინო ტაბატაძე

სითხური ქრომატოგრაფიის ახალი მეთოდის დამუშავება აქტიურ ფარმაცევტულ სუბსტაციებსა და მზა სამკურნალო საშუალებებში იზონიაზიდის რაოდენობრივი ანალიზის და მინარევების განსაზღვრისთვის.

ქიმიური ექსპერტიზა

ნაშრომი შესრულებულია ქიმიის მაგისტრის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად

სამეცნიერო ხელმძღვანელი:

ქიმიის აკადემიური დოქტორი: ლალი ჭანკვეტაძე

თბილისი

2024 წელი

სარჩევი

1 ანოტაცია 3
2 Summary 4
3 შესავალი 5
4 ლიტერატურული მიმოხილვა 6
4.1 ქრომატოგრაფიის ზოგადი მიმოხილვა 6
4.2 მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფია 7
4.2.1 მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიის უპირატესობა და ნაკლოვანება ... 8
4.3 აპარატურა მაღალეფექტურ სითხურ ქრომატოგრაფიაში 8
4.4 ძირითადი ცნებები მაღალეფექტურ სითხურ ქრომატოგრაფიაში 11
4.5 ძირითადი ქრომატოგრაფიული მახასიათებლები 13
4.6 იზონიაზიდი 17
4.6.1 ზოგადი დახასიათება 17
5 ექსპერიმენტული ნაწილი 20
5.1 ექსპერიმენტში გამოყენებული ნივთიერებები 21
5.2 რეაქტივები და მასალები 23
5.3 გამოყენებული აპარატურა 24
5.4 მიღებული ექსპერიმენტული შედეგები და მათი განსჯა 25
6 დასკვნები 35
7 გამოყენებული ლიტერატურა 36

1 ანოტაცია

იზონიაზიდი აინჰიბირებს დნმ-დამოკიდებულ რნმ-პოლიმერაზას და ამუხრუჭებს ტუბერკულოზის მიკობაქტერიების უჯრედის მიკოლების მჟავების სინთეზს. პრეპარატს გააჩნია მაღალი ბაქტერიოსტატიკური აქტივობა ტუბერკულოზის მიკობაქტერიების მიმართ, მათი ზრდის შეჩერებით. იზონიაზიდი განსაკუთრებით ეფექტურია ტუბერკულოზის მწვავე და აქტიურად მიმდინარე ფორმის სამკურნალოდ და შეტანილია ყველა ქვეყნის ტუბერკულოზის მართვის გაიდლაინში.

იზონიაზიდის შემცველ ფარმაცევტულ პროდუქტებში ხარისხის კონტროლის ეტაპზე აუცილებელია აბში იზონიაზიდის რაოდენობრივი ანალიზი და მინარევების განსაზღვრა. ამჟამად იზონიაზიდის ხარისხის კონტროლის პროცესში გამოყენებულ ფარმაკოპეულ მეთოდებს მსოფლიო ჯანდაცვის ორგანიზაციის შეფასებით გააჩნიათ ხარვეზები, კერძოდ, მეთოდი არ არის განმეორებადი და სტაბილური, რის გამოც მჯო-ს მიერ მოთხოვნილ იქნა ახალი მეთოდის დამუშავება.

სამაგისტრო ნაშრომის მიზანს წარმოადგენს, აქტიურ ფარმაცევტულ სუბსტაციებსა და მზა სამკურნალო საშუალებებში იზონიაზიდის რაოდენობრივი ანალიზის და მინარევების განსაზღვრისთვის სითხური ქრომატოგრაფიის ახალი, სტაბილური და განმეორებადი მეთოდის დამუშავება.

ჩვენს მიერ ჩატარებული ექსპერიმენტებით გამოიცადა სხვადასხვა მწარმოებლების ოქტადეცილ სილიკაგელის საფუძველზე მომზადებული სხვადასხვა პარამეტრების, კერძოდ სვეტის სიგრძე და დიამეტრი, სტაციონარული ფაზის ნაწილაკების და ფორების ზომა, ანალიზური სვეტები და შეირჩა დასმული ამოცანის გადასაწყვეტად ოპტიმალური მახასიათებლის სვეტი, რის შემდეგაც აღნიშნულ სვეტზე მოხდა ოპტიმალური მოძრავი ფაზების და გრადიენტის შერჩევა.

ჩატარდა ახალი მეთოდის ვალიდაცია და დადასტურებულ იქნა, რომ ის არის სტაბილური, განმეორებადი და სანდო მეთოდი და მასზე დაყრდნობით ჩატარებული იზონიაზიდის და მისი მინარევების განსაზღვრა აქტიურ ფარმაცევტულ სუბსტანციებსა და მზა სამკურნალო საშუალებებში იძლევა სანდო და სარწმუნო შედეგებს.

2 Summary

Isoniazid inhibits DNA-dependent RNA polymerase and the synthesis of mycolic acids in Mycobacterium tuberculosis cells. The drug exhibits high bacteriostatic activity against tuberculosis mycobacteria, effectively halting their growth. Isoniazid is particularly effective in treating acute and active forms of tuberculosis and is included in the tuberculosis management guidelines of all countries.

During the quality control stage of pharmaceutical products containing isoniazid, it is necessary to perform quantitative analysis of isoniazid in the tablets and determine any impurities. According to the World Health Organization, current pharmacopoeia methods used for the quality control of isoniazid have flaws, particularly regarding repeatability and stability. Consequently, the World Health Organization has requested the development of a new method.

The aim of this master's thesis is to develop a new, stable, and reproducible liquid chromatography method for the quantitative analysis of isoniazid in active pharmaceutical substances and finished medicinal products, as well as for the determination of impurities.

In our experiments, we tested analytical columns based on the octadecyl silica gel stationary phase with varying parameters, including column length, inner diameter, pore size, and particle size. We selected the column with optimal characteristics. Subsequently, based on experimental trials, we identified the optimal mobile phases and gradient for this column.

Validation of the new method confirmed that it is stable, reproducible, and reliable. Based on this method, the determination of isoniazid and its impurities in active pharmaceutical substances and finished medicinal products yields accurate and reliable results.

3 შესავალი

ტუბერკულიოზი ერთ-ერთი მომაკვდინებელი დაავადებაა მთელს მსოფლიოში. ყოველწლიურად, ამ დაავადებით მსოფლიოში 10 მილიონი ადამიანი ავადდება ხოლო 1.5 მილიონი იღუპება. ის გავლენას ახდენს ძირითადად ფილტვებზე, მაგრამ შეუძლია მოიცვას სხეულის ნებისმიერი ნაწილი [1].

იზონიაზიდი წარმოადგენს სინთეზურ, ანტიმიკრობულ და ერთ-ერთ აუცილებელ პირველი რიგის პრეპარატს, რომელიც გამოიყენება ტუბერკულიოზის სამკურნალოდ. გარდა ამისა, იზონიაზიდი გამოიყენებოდა როგორც პროფილაქტიკური პრეპარატი ლატენტური ტუბერკულიოზის მიკობაქტერიის ინფექციის მქონე პაციენტებისთვის დაავადების რეაქტივაციის თავიდან ასაცილებლად [2].

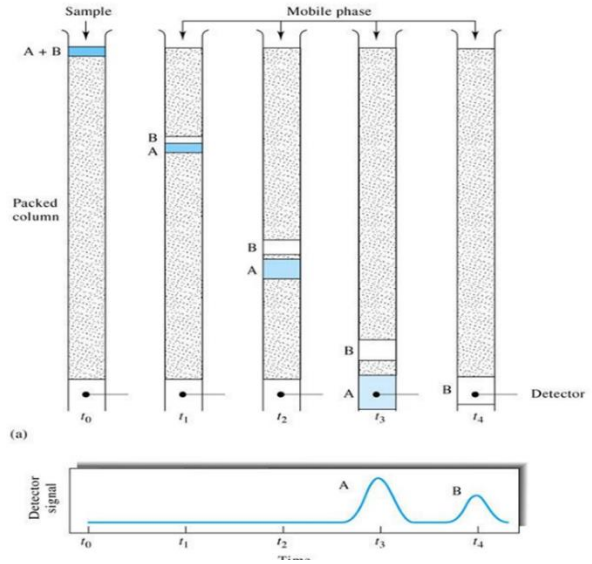
იზონიაზიდის აქტიური ფარმაცევტული სუბსტანცია შეიცავს 8 ძირითად მინარევს: იზონიკოტინამიდს, იზონიკოტინის მჟავას, ნიკოტინის მჟავას ჰიდრაზიდი, 4-ციანოპირიდინიმ, ბენზოჰიდრაზიდი, 3,5-დი(პირიდინ-4-ილ)-4H-1,2,4-ტრიაზოლ-4, 1,2-დიიზონიკოტინოილჰიდრაზინი, პიკოლინოჰიდრაზიდი.

იზონიაზიდი საფუძველზე მომზადებულ მზა სამკურნალო საშუალებას დღესდღეობით 8 ფარმაცევტული კომპანია აწარმოებს, თუმცა ქართულ ბაზარზე მხოლოდ უკრაინული კომპანიის PJSC SIC <<Borshchahivskiy CPP>> -ის მიერ მოწოდებული სამკურნალონ საშუალება გვხვდება.

4 ლიტერატურული მიმოხილვა

4.1 ქრომატოგრაფიის ზოგადი მიმოხილვა

ქრომატოგრაფია ნარევთა შემადგენელ კომპონენტებად დაყოფის მეთოდია რომელიც ემყარება კომპონენეტების არათანაბარ განაწილებას ორ შეურევად ფაზას შორის. ამ ფაზებიდან ერთი არის მოძრავი, ხოლო მეორე უძრავი. გამოყენებული ფაზებისა და აპარატურის მიხედვით განასხვავებენ ქრომატოგრაფიის სახეობებს: (სითხური ქრომატოგრაფია, გაზური ქრომატოგრაფია, ქაღალდის ქრომატოგრაფია, იონგაცვლითი ქრომატოგრაფია) [3].



სურათი 1

საანალიზო კომპონენტები, რომლებიც უფრო ძლიერად ურთიერთქმედებენ უძრავ ფაზასთან უფრო დიდხანს დაყოვნდებიან უძრავ ფაზაზე, ვიდრე ის კომპონენტები, რომლებიც სუსტად ურთიერთქმედებენ უძრავ ფაზასთან.ეს ურთეიერთქმედება უმეტეს შემთხვევაში არის ქიმიური, მაგრამ ზოგჯერ შეიძლება იყოს ფიზიკურიც.

ქრომატოგრაფიული მეთოდები შეიძლება კლასიფიცირდეს:

- უძრავი ფაზის ფორმის მიხედვით (სვეტური,სიბრტყის);
- მოძრავი ფაზის აგრეგატული მდგომარეობის მიხედვით (GLC,GSC,LLC,LSC);
- ურთიერთქმედების მექანიზმის მიხედვით (ადსორბციული, განაწილებითი, აფინური და სხვა). [4]

4.2 მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფია

მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფია არის ქრომატოგრაფიის ერთ-ერთი ტიპი, სადაც უძრავის ფაზა არის ქრომატოგრაფიულ სვეტში, ხოლო მოძრავი ფაზა მაღალი წნევის ტუმბოს საშუალებით გადაადგილდება და გადაიტანს ნარევის კომპონენეტებს, რომლებიც ინჟექტორის საშუალებით შეიყვანება. მოძრავი და უძრავი ფაზების განსხვავებული სწრაფვის გამო კომპონენტები დაიყოფიან სვეტში, სვეტის დატოვების შემდგომ მათი დეტექტირება.

მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიის მრავალი დადებითი თვისება განაპირობებს მის აქტიურ გამოყენებას. ამასთანავე თითქმის ყველა დაყოფა შეიძლება ჩატარდეს ოთახის ტემპერატურასთან ახლოს, ჰაერთან კონტაქტის გარეშე რაც მნიშვნელოვანია ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებების ბიოპოლიმერების კვლევისას.

მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიაში გამოყენებული ფაზების მიხედვით, შეგვიძლია დავყოთ ორ ქვეჯგუფად :

1.ნორმალურფაზიანი სითხური ქრომატოგრაფია

2.შებრუნებულფაზიანი სითხური ქრომატოგრაფია

ნორმალურფაზიან თხევად ქრომატოგრაფიაში იყენებენ პოლარულ სტაციონალურ ფაზას და არაპოლარულ მოძრავ ფაზას (ხშირად ჰექსანს, ან ჰექსანის და მცირედ პოლარული ორგანული გამხსნელის ნარევს). პოლარული სტაციონალური ფაზა შეიძლება იყოს სილიკაგელი ან სილიკაგელი მოდიფიცირებული პოლარული ჯგუფებით. რადგან უძრავი ფაზა პოლარულია, მასზე უფრო ძლიერად შეკავდება პოლარული ნივთიერებები, შესაბამისად ისინი უფრო გვიან დატოვებენ სვეტს, ხოლო არაპოლარული ნივთიერებები პირველი დატოვებს სვეტს [5].

შებრუნებულფაზიანი ქრომატოგრაფიის შემთხვევაში უძრავი ფაზა არის არაპოლარული, ხოლო მოძრავი ფაზა პოლარული, რის გამოც ნივთიერებების დაყოფა უფრო მარტივად ხდება. ამიტომ აღნიშნული მეთოდი უფრო მეტადაცაა გავრცელებული. სტაციონალურ ფაზად ძირითადად გამოიყენება (სილიკაგელი, რომლის ზედაპირი მოდიფიცირებულია სწორჯაჭვიანი ალკანებით ხშირად ესენია: C18H37 და C8H37 ჯგუფები, ამიტომაც მათ C18 და C8 ფაზები ეწოდებათ), ხოლო მოძრავი ფაზად წყალი და ორგანული ნაერთის ნარევი მაგალითად (წყალი და მეთანოლი). ასევე გამოიყენება ბუფერული ხსნარებიც (ფოსფატური და აცეტატური ბუფერები). ამ დროს სტაციონალურ ფაზაზე არაპოლარული ნივთიერებები ძლიერად ეკვრიან, ხოლო პოლარულები პირველები ტოვებენ სვეტს.

შებრუნებულფაზიანი ქრომატოგრაფია მისაღებ მეთოდს წარმოადგენს წყლიანი ნიმუშების დაყოფისთვის, როგორიცაა წყლის, ნიადაგის ნიმუშები, ფარმაცევტული პრეპარატები, სასმელები. [5].

მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფია გამოიყენება სხვადასხვა ნარევებში ორგანული და არაორგანული ნივთიერებების დაყოფისა და რაოდენობრივი განსაზღვრისათვის. მესკ გამოიყენება შემდეგი ტიპის ანალიზებისთვის:

1.ფარმაცევტულ საშუალებებში მოქმედი ნივთიერებების და მინარევებში განსაზღვრა

2.ენანტიომერების დაყოფა

3.კვების პროდუქტებში, ჩამდინარე წყლებში პესტიციდების რაოდენობრივი განსაზღვრა

4.ამინომჟავების განსაზღვრა

5.კვების პროდუქტებში ნარჩენი ანტიბიოტიკების, აფლატოქსინების და სხვა ტოქსიკური ნივთიერებების განსაზღვრა.

6.ბიოლოგიურ ნიმუშებში სამკურნალო საშუალებების და მათი მეტაბოლიტების, ნარკოტიკული საშუალებების და მეტაბოლიტების, ტოქსიკური ნივთიერებების და მათი მეტაბოლიტების განსაზღვრა [6].

4.2.1 მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიის უპირატესობა და ნაკლოვანება

უპირატესობა:

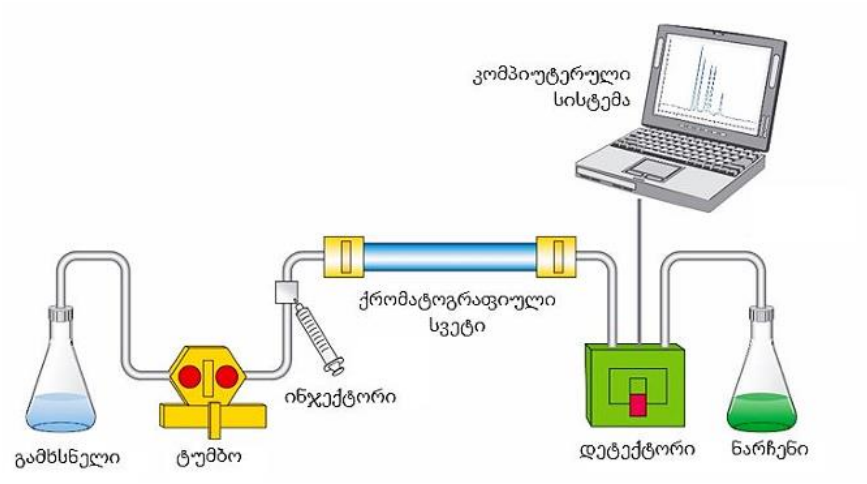
- შეიძლება გამოვიყენოთ თერმოლაბილური და არააქროლადი ნივთიერებებისთვის;
- სტაციონალური ფაზების სიმრავლე;
- დაყოფის სელექტივობა შეიძლება ვმართოთ მოძრავი ფაზის შედგენილობის მიხედვით;
- გამოსადეგია არა მხოლოდ ანალიზური, არამედ ნახევრადპრეპარატული, პრეპარატული და საწარმოს მასშტაბის დაყოფისთვის;

ნაკლოვანება:

- შედარებით დაბალი თეორიული თეფშების რიცხვი [7].

4.3 აპარატურა მაღალეფექტურ სითხურ ქრომატოგრაფიაში

მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფი შედგება ხუთი ძირითადი ნაწილისაგან:



სურათი 2. მაღალ ეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიის ხელსაწყო და მისი აგებულება.

1.ტუმბო

2.ინჯექტორი

3.ქრომატოგრაფიული სვეტი

4.დეტექტორი

5.მონაცემების ჩამწერი ხელსაწყო კომპიუტერი

ტუმბოს მეშვეობით ქრომატოგრაფიული სვეტს მიეწოდება მოძრავი ფაზა. ტუმბოები, რომელიც მაღალეფექტურ სითხურ ქრომატოგრაფიაში გამოიყენება იყოფა ორ კლასად: გრადიენტული და იზოკრატული. იზოკრატული გამოიყენება იმ შემთხვევაში, როდესაც არ არის საჭირო მოძრავი ფაზის შედგენილობის გრადიენტული ცვლილება, ხოლო თუ საჭიროა მოძრავის ფაზის ცვლილება ამ დროს გამოვიყენებთ გრადიენტულ ტუმბოს.

ინჯექტორი- შეყავს ნიმუში ქრომატოგრაფიულ სვეტში და არსებობს ორი სახის: ავტომატური და ხელის.

ავტომატური უზრუველყოფს ნიმუშის ზუსტი რაოდენობით შეყვანას რაც შეიძლება მცირე დაბინძურებით.

ხელის-ერთადერთი უპირატესობა მისი სიიაფეა

სვეტში ნარევის ცალკეულად დაყოფა ხდება. გამოიყენება სხვადასხვა ზომის სვეტები, როგორც წესი ქრომატოგრაფიული სვეტი წარმოადგენს მეტალის მილს, რომელიც შევსებულია უძრავი ფაზით.

დეტექტორი არეგისტრირებს დაყოფილ კომპონენტებს. ყველაზე ფართო გამოყენება აქვს ულტრაიისფერ-ხილულ დეტექტორებს, რომლებიც აფიქსირებენ კიუვეტაში გამავალი ხსნარის მიერ სინათლის აბსორბციას.

ულტრაიისფერი დეტექტორი გამოდგება მხოლოდ ისეთი ნივთიერებებისთვის, რომელთაც გააჩნიათ ქრომოფორები და შთანთქავენ სინათლეს 190-390 ნმ ტალღის უბანში.[3]

რეფრაქტომეტრული დეტექტორი არის უნივერსალური დეტექტორი, დეტექტირება ხდება გარდატეხის მაჩვენებლის მიხედვით.

ფლუორესცენტრული დეტექტორი-ხდება მხოლოდ იმ ნივთიერებების დეტექტირება, რომელსაც გააჩნია ფლუორესცენციის უნარი (ან მიმართავენ დერივატიზაციას).

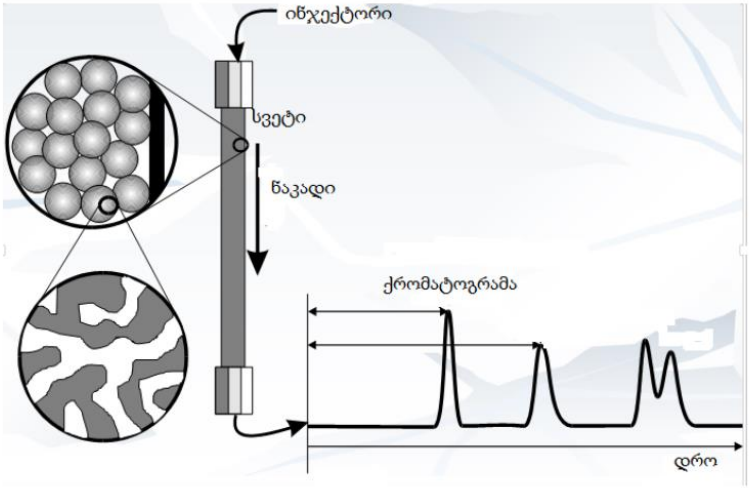
ჩამწერი-დეტექტორიდან მიწოდებულ ინფორმაციას ჩაწერს ქრომატოგრამის სახით.

4.4 ძირითადი ცნებები მაღალეფექტურ სითხურ ქრომატოგრაფიაში

ქრომატოგრამა-საანალიზო ნივთიერებების სიგნალის დროზე დამოკიდებულების გრაფიკი. აბსცისათა ღერძზე გადაზომილია დრო, ხოლო ორდინატთა ღერძზე სიგანალის ინტენსივობა. მიღებული პიკების დროითა (იდენტიფიკაციას ვახდენთ და ვიღებთ კითხვაზე პასუხს თუ რა გვაქვს) და ფართობით (ნივთიერების რაოდენობის დადგენა ანუ პასუხი კითხვაზე რამდენი გვაქვს) ვახდენთ პიკების იდენტიფიკაციასა და კონცენტრაციების შეფასებას. ქრომატოგრამაზე შეკავების დროის ზრდით, პიკები გადანაწილდება მარცხნიდან მარჯვნივ, ე.ი პირველი კომპონენტი შეესაბამება კომპონენტს, რომელიც სვეტიდან ელუირდა პირველი, ხოლო ბოლო-ყველაზე გვიან ელუირებულს.

მოძრავი ფაზა რომელსაც შეიძლება ასევე ეწოდოს ელუენტი და გამხსნელი, რადგან ისეთი ნივთიერებების გამოყენება ხდება როგორებიცაა ჰექსანი, აცეტონიტრილი, მეთანოლი , წყალი, იზოპროპანოლი და ა.შ [8].

უძრავი ფაზა შეიძლება წარმოადგენდეს შედარებით მაღალდისპერსიულ ნაწილაკებს, რომლითაც შევსებულია ქრომატოგრაფიული სვეტი, ან აპკს, რომლითაც დაფარულია (კაპილარული) ქრომატოგრაფიულისვეტის შიგა ზედაპირი. ნაწილაკები, რომლითაც ხდება ქრომატოგრაფიული სვეტის შევსება არის ფოროვანი (იხ სურათი 3)



სურათი 3. ქრომატოგრაფიული დაყოფის პროცესის და უძრავი ფაზის სქემატური წარმოდგენა.

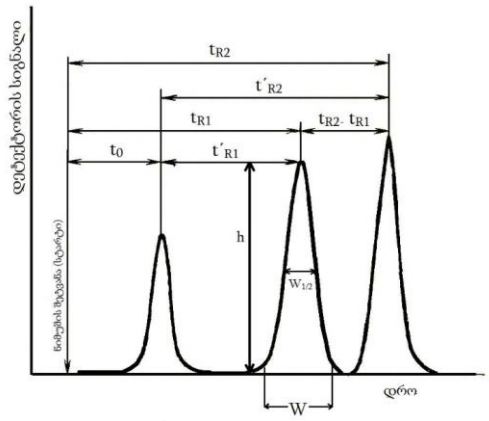
ქრომატოგრაფიაში ფოროვანი სტაციონალური ფაზების გამოყენების ძირითად მიზანს წარმოადგენს სტაციონალური ფაზის ხვედრითი ზედაპირის გაზრდა. [7]

უმეტეს შემთხვევაში სარჩულად გამოიყენება სილიკაგელი, რომელზეც მიმაგრებულია სხვადასხვა ფუნქციონალური ჯგუფები C8, C18, CN და ა. შ.

ქრომატოგრაფი-ხელსაწყო, რომელიც გამოიყენება ნარევთა დასაყოფად.

4.5 ძირითადი ქრომატოგრაფიული მახასიათებლები

შეკავების დრო t_R- არის დროის შუალედი ნიმუშის სვეტში შეყვანის მომენტიდან ქრომატოგრამაზე პიკის მაქსიმუმის მიღებამდე (იხ ნახაზი 1). ქრომატოგრამაზე მას შეესაბამება პიკის მაქსიმუმის ფართობი აბსცისათა ღერძზე.



ნახაზი 1-თეორიული ქრომატოგრამა.t_0 არაადსორბადი ნიმუშის შეკავების დრო, t_{R1} პირველი ნიმუშის შეკავების დრო, t_{R2} მეორე ნიმუშის შეკავების დრო, h სიმაღლე W პიკის სიგანე, $W_{1/2}$ პიკის სიგანე ნახევარ სიმაღლეზე.

მისი გამოთვლა ხდება შემდეგი ფორმულით

$t_R = t_0 + t'_R$ [განტ.1]

სადაც t_0 არის არაადსორბირებადი კომპონენტების ელუირების დრო; t'_R შესწორებული შეკავების დრო და გამოხატავს სტაციონალურ ფაზაზე ყოფნის დროს კომპონენტებისათვის. t_R მოძრავი ფაზი სწრფივი სიჩქარის ფუნქციია, იგი სვეტის სიგრძეზეა დამოკიდებული [9]

შეკავების ფაქტორი-იგი გაცილებით უფრო მისაღები პარამეტრია ნივთიერების შეკავების დახასიათებისთვის ვიდრე შეკავების დრო t_R. რადგან t_R-ისგან განსხვავებით ის არაა დამოკიდებული მოძრავი ფაზის სიჩქარესა და სვეტის სიგრძეზე. თუ მოძრავი ფაზა ნელა გადაადგილდება ან სვეტი გრძელია მაშინ ერთნაირად იზრდება t_0 და აქედან გამომდინარე t_R-იც.

$k = (t_R - t_0) / t_0$ [განტ.2]

k არ არი დამოკიდებული სვეტის სიგრძეზე და მოძრავი ფაზის სიჩქარეზე, წარმოადგენს ნივთიერების მოლურ ფარდობას სტაციონალურ ფაზასა და მოძრავ ფაზაში. სასურველია, პარამეტრი k იყოს 1÷5 შუალედში, თუ $k<1$ ნიშნავს,რომ ნიმუშმა სვეტი ძალიან მალე გაიარა ანუ არ შეკავდა სტაციონალურ ფაზაზე, ხოლო $k>5$ ნიშნავს, რომ ანალიზს სჭირდება დიდი დრო. თუ ადსორბენტი წვრილფოროვანია მაშინ k-ს აქვს დიდი მნიშვნელობა, ნაკლებად ფოროვან და უფორო ადსორბენტზე k მცირეა.

დაყოფის ფაქტორი ანუ სელექტიურობა α- წარმოადგენს ორი მეზობელი კომპონენტის შესწორებული შეკავების დროების ფარდობას და იგი შეიძლება განისაზღვროს უშუალოდ ქრომატოგრამიდან თუ მეზობელ კომპონენტებს ერთნაირი k-ს მნიშვნელობა აქვთ ისინი ვერ დაიყოფა.

$$\alpha = k_2/k_1 \qquad [\text{განტ.}3]$$

სადაც $k_2>k_1$, თუ $\alpha=1$,ნიშნავს რომ ნარევი არ დაიყო. A-ზე გავლენას ახდენს უძრავი და მოძრავი ფაზები.

გარჩევითობა R_s - დაყოფის ხარისხს აფასებენ გარჩევითობის მნიშვნელობით, დაყოფის ხარისხი დამოკიდებულია მეზობელი პიკების მაქსიმუმებს შორის მანძილზე და ქრომატოგრაფიული ზონების სიგნალებზე

$$R_s=2(t_{r2}-t_{r1})/(W_1+W_2) \qquad [\text{განტ.}4]$$

ან $$R_s=1.18(t_{r2}-t_{r1})/(W_{(1/2)1}+W_{(1/2)2}) \qquad [\text{განტ.}5]$$

სადაც W არის პიკის სიგანე ფუძესთან, ხოლო $W_{(1/2)}$ არის პიკის სიგანე პიკის ნახევარ სიგანეზე. თუ $R_s>1.5$ ნიშნავს, რომ ანალიზს სჭირდება დიდი დრო, ხოლო თუ $R_s>1.25$ ნიშნავს, რომ პიკები ან არ დაიყო ან ნაწილობრივ არის დაყოფილი (არაფუძისეულად)[7].

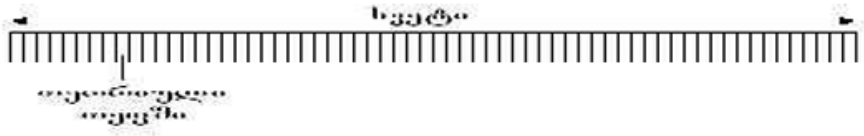
ქრომატოგრაფიული ანალიზის მეთოდის დამუშავებისას მნიშვნელოვანია გარჩევითობის მაქსიმალურად მაღალი მნიშვნელობის მიღწევა, მისი გაზრდა შესაძლებელია მეთოდის ოპტიმიზაციის პროცესში, მაგ გამოვიყენოთ გრძელი სვეტი, ნიმუშის მცირე მოცულობა, შევამციროთ ნაკადის სიჩქარე. [10].

თეორიული თეფშების რიცხვი N - ქრომატოგრაფიული სვეტის ეფექტურობას რაოდენობრივად გამოსახავენ თეორიული თეფშების რიცხვით. სვეტის ეფექტურობაში ვგულისხმობთ ვიწრო პიკების მიღებას და ქრომატოგრაფიული ზონების გაფართოების შეზღუდვას.

ცნება თეორიული თეფში აღებულია გადადენის თეორიიდან. ვარაუდობენ, რომ ქრომატოგრაფიული სვეტის მათემატიკური ეკვივალენტი წარმოადგენს სვეტს თეფშებით, რომელთაგანაც თითოეულზე ხდება კომპონენტების წონასწორული განაწილება თეფშსა და მოძრავ ფაზას შორის. თეორიული თეფშების რიცხვი დამოკიდებულია სვეტის სიგრძეზე იგი გამოითვლება:

$N=16(t_R/W)^2$ [განტ.6]

ან $N=5.54(t_R/W_{(1/2)})^2$ [განტ.7]



ნახაზი 2-თეორიული თეფშების მოდელი

თეორიული თეფშების ეკვივალენტური სიმაღლე H -მანძილი, რომელზეც მიიღწევა ქრომატოგრაფიუოლი წონასწორობა, უკუპროპორციულ დამოკიდებულებაშია თეორიული თეფშების რიცხვთან

$H=L/N$ [განტ.8]

H-სვეტის იმ უბნის სიგრძეა,რომელზედაც ფაზებს შორის განსაზღვრულ პირობებში შეიძლება წონასწორობა დამყარდეს. ეფექტური სვეტებისთვის H-ის მნიშვნელობა 0.3-1.00 მმ-ის დიაპაზონში თავსდება. იდეალურ შემთხვევაში შეიძლება სტაციონალური ფაზის ნაწილაკების ზომას გაუტოლდეს.

L-არის სვეტის სიგრძე. [9]

ვან-დეემტერის განტოლება გამოიყენება მოძრავი ფაზის ხაზოვანი სიჩქარის ოპტიმიზაციის მიზნით და გამოისახება შემდეგნაირად:

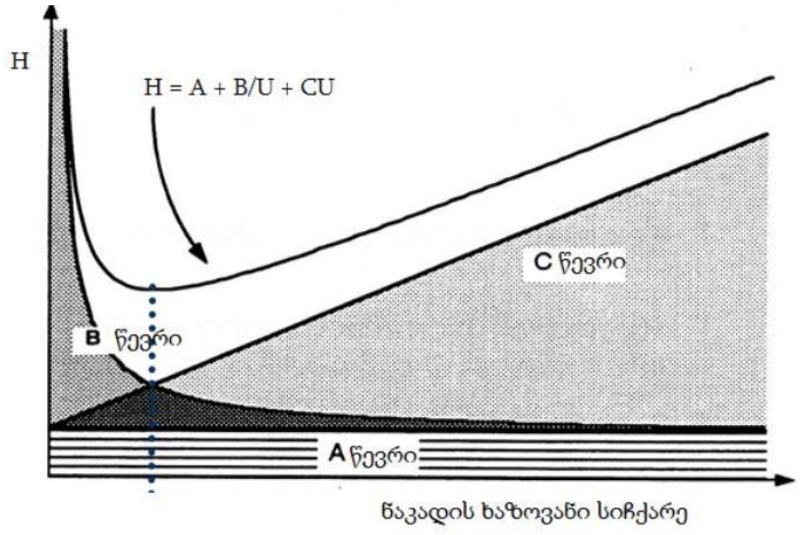
H=A+B/U+CU

A-გრიგალისებური დიფუზია,რომელიც გამოწვევულია სვეტში სტაციონალური ფაზის ნაწილაკებს შორის განსხავებული სიგრძის ტრაქტორიით, რომელიც არ არის დამოკიდებული მოძრავი ფაზის სიჩქარეზე;

B-ს განაპირობებს ნიმუშის კომპონენტების გასწვრივი დიფუზია, რომელსაც იწვევს კონცენტრაციული გრადიენტი ქრომატოგრაფიულ სვეტში;

C-მასის გადატანის სიჩქარე, მას განსაზღვრავს ნიმუშებისთვის წონასწორობის დასამყარებლად საჭირო სასრული დრო. ყველაზე მნიშვნელოვანი პარამეტრია ზონის გაფართოების პროცესში.

ვან-დეემტერის განტოლების მეორე და მესამე წევრი დამოკიდებულია მოძრავი ფაზის სიჩქარეზე, თუმცა დამოკიდებულების ხასიათი განსხავავებულია. [9]



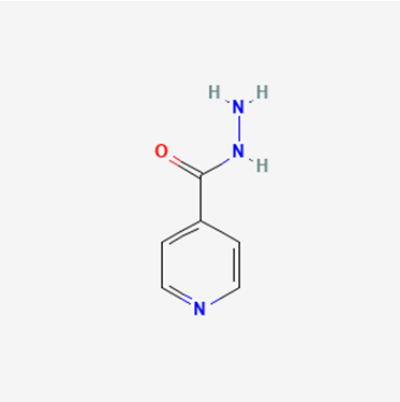
ნახაზი 3 -ვან-დეემტერის მრუდი ლიტ [7]

4.6 იზონიაზიდი

4.6.1 ზოგადი დახასიათება

თეთრი ფერის ნივთიერება

მოლეკულური ფორმულა-$C_6H_7N_3O$



სურათი 4.იზონიაზიდის სტრუქტურული ფორმულა

მოლეკულური წონა-137.14 გ/მოლი

დნობის წერტილი-171.4°C [11].

შემადგენლობა

იზონიაზიდის საფუძველზე მომზადებულ მზა სამკურნალო საშუალებები შეიცავს იზონიაზიდის 0.1გ-ს ან 0.2გ-ს

ფარმაკოლოგიური თვისებები

იზონიაზიდი მეტად ეფექტურია აქტიური ტუბერკულიოზის მწვავედ მიმდინარე პროცესების დროს იზონიაზიდს იყენებენ ტუბერკულიოზის პროფილაქტიკის მიზნითაც.

ფარმაკოკინეტიკა

მზა სამკურნალო საშუალებებიდან იზონიაზიდი სწრაფად შეიწოვება საჭმლისმომნელებელი ტრაქტიდან, ადვილად გაივლის ჰემატოენცეფალურ ბარიერს და მისი აღმოჩენა შესაძლებელია ორგანიზმის სხვადასხვა სითხეებში და ქსოვილებში. იზონიაზიდის მაქსიმალური კონცენტრაცია სისხლის პლაზმაში აღინიშნება 1-4 სააათის შემდეგ მისი მიღებისას, ხოლო ტუბეკულასტატური კონცენტრაცია სისხლში მისი ერთჯერადი დოზით მიღებისას აღინიშნება 6-24 საათის შემდეგ. გამოიყოფა თირკმელების საშუალებით. შარდით გამოყოფილი აქტიური იზონიაზიდის რაოდენობის მიხედვით მიღებული დოზის მიმართ ავადმყოფები მიეკუთვნებიან „სწრაფ“ და „ნელ“ ინაქტივატორებს. პირველ კატეგორიას

მიეკუთვნებიან ავადმყოფები, რომლებიც შარდით გამოყოფენ იზონიაზიდის 10% დღე-ღამეში, მეორე კატეგორიას-10%-ზე მეტს. იზონიაზიდის ნახევარგამოყოფის პერიოდი სისხლის პლაზმაში მისი სწრაფი აცეტილირების დროს შეადგენს 0.5-1.6 საათს, ხოლო ნელი აცეტილირების დროს 2-4 საათს, თირკმელების უკმარისობის დროს 5-7 საათს.

გამოყენების ჩვენები

იზონიაზიდს იყენებენ მოზრდილებში და ბავშვებში აქტიური ტუბერკულიოზის ყველა ფორმის და ლოკალიზაციის სამკურნალოდ. იზონიაზიდის საფუძველზე მომზადებული მზა სამკურნალოს საშუალება მეტად ეფექტურია ახალი, მწვავედ მიმდინარე პროცესების დროს. იზონიაზიდს იყენებენ ტუბერკულიოზის პროფილაქტიკის მიზნითაც.

გვერდითი მოვლენები

იზონიაზიდის საფუძველზე მომზადებულ მზა სამკურნალო საშუალებების მიღებას, თან შეიძლება ახლდეს: თავის ტკივილი, თავბრუსხვევა, გულისრევა, ღებინება, ტკივილი გულის არეში, კანის ალერგიული რეაქციები, ეიფორია, ძილის დარღვევა, იშვიათად ფსიქოზის განვითარება, კუნთების ატროფიით და კიდურების დამბლით მიმდინარე პერიფერიული ნევრიტის განვითარება, წამლისმიერი ჰეპატიტი, ძალიან იშვიათად გინეკომასტია მამაკაცებში, მენორაგიები ქალებში. ეპილეფსიით შეპყრობილ ავადმყოფებში შესაძლებელია კრუნჩხვის გახშირება. აღნიშნული მოვლენები სწრაფად ქრება დოზირების შემცირების ან მისი მიღების დროებითი შეწყვეტის დროს.

უკუჩვენებები

ეპილეფსია, მიდრეკილება კრუნჩხვების მიმართ, ადრე გადატანილი პოლიომიელიტი, ღვიძლისა და თირკმელების ფუნქციის დარღვევა. ორსულობის დროს იზონიაზიდის საფუძველზე დამზადებული სამკურნალო საშუალების დანიშვნა 10 მგ/კგ წონაზე მეტი დოზით ნებადართული არ არის; გულისა და ფილტვების III ხარისხის უკმარისობა; II-III სტადიის ჰიპერტონული დაავადება, გულის იშემიური დაავადება, გავრცელებული ათეროსკლეროზი, ნერვული სისტემების დაავადებები, ბრონქული ასთმა, ფსორიაზი, ეგზემა გამწვავების ფაზაში, მიქსედემა.

ურთიერთქმედება სხვა სამკურნალო საშუალებებთან

ანტაციდური საშუალებების გამოყენებისას, მზა სამკურნალო საშუალებიდან იზონიაზიდის შეწოვა საჭმლის მომნელებელი ტრაქტიდან მცირდება. იგი ინიშნება სხვა ტუბერკულიოზის

საწინააღმდეგო სამკურნალო საშუალებასთან კომბინაციაში. შერეული ინფექციის დროს საჭიროა სხვა ანტიბაქტერიული სამკურნალო საშუალების ერთდროულად მიღება: ფართო სპექტრის ანტიბიოტიკები, სულფანილამიდები, ფტორქინოლები. იზონიაზიდი თრგუნავს კარბამაზეპინის და დიფენინის ბიოტრანსფორმაციას, ამიტომ აღნიშნული კომბინაციის დროს მატულობს მათი კონცენტრაცია სისხლის პლაზამაში და ძლიერდება ტოქსიკური მოქმედება.

ჭარბი დოზირება

იზონიაზიდის საფუძველზე მომზადებულ მზა პროდუქტის მაღალ დოზებით გამოყენება ხელს უწყობს ატაქსიის, კუნთების თრთოლვის, პარესთრეზიის, სტუპორის და ტოქსიკური ენცეფალოპათიის განვითარებას. იზონიაზიდის ტოქსიკური დოზებია (400მგ/კგ), იწვევს მძიმე მეტაბოლურ აციდოზს, ჰუპერგლიკემიას და გლუკოზურიას, კრუნჩხვას და კომას. აღნიშნულით მკურნალობა იწვევს მწვავე ტოქსიკურობას, რომელიც ვლინდება ნევროლოგიური სიმპტომების სახით. [2].

გამოყენების თავისებურება

მხოლოდ იზონიაზიდის საფუძველზე მომზადებული მზა სამკურნალო პროდუქტით მკურნალობის შედეგად წარმოიქმნება მიკობაქტერიის მიმართ მდგრადი შტამები, ამიტომ მისი გამოყენება წარმოებს სხვა ტუბეკულიოზის საწინააღმდეგო საშუალებებთან კომბინაციაში. აუცილებელია დოზის სწორი შერჩევა იზონიაზიდის ინაქტივირების უნარის მიხედვით. სამკურნალო საშუალების დანიშვნის წინ აუცილებლია სისხლში განისაზღვროს აქტიური ნივთიერების შემცველობა სისხლში და შარდში. სწრაფი ინაქტივაციის მქონე პაციენტებში იზონიაზიდის საფუძველზე მომზადებული მზა პროდუქტი ინიშნება შედარებით მაღალ დოზებში. გვერდითი მოვლენების შემცირების მიზნით იზონიაზიდთან ერთად ინიშნება პიროქსიდინის ჰიდროქლორიდი ან გლუტამინის მჟავა, თიამინის ქლორიდი ან ატფ-ნატრიუმის მარილი [12].

5 ექსპერიმენტული ნაწილი

იზონიაზიდის რაოდენობრივი ანალიზისა და მინარევების განსაზღვრისათვის მოწოდებული მეთოდი ხასიათდება ნაკლოვანებებით, იზონიაზიდის კონცენტრაცია ბევრად აღემატება მინარევის კონცენტრაციას, ასეთ შემთხვევებში ზემოთაღნიშნული მეთოდი არ იძლევა ცალკეული მინარევის იდენტიფიკაციისა საშუალებას და გარდა ამისა, მინარევების პიკები გადაიფარება იზონიაზიდის ძირითადი პიკით, რაც ფაქტობრივად სუბსტანციის და ტაბლეტის ხარისხობრივი შეფასების საშუალებას აღარ იძლევა.

მინარევი ეწოდება ნებისმიერი კომპონენტს, რომელსაც არ აქვს ზუსტად იგივე ქიმიური და სტრუქტურული ფორმულა, რაც სუბსტანციას.

მინარევი შეიძლება იყოს:

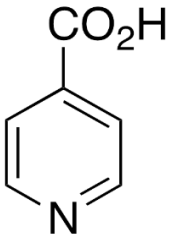
- ✓ ორგანული;
- ✓ არაორგანული;
- ✓ ნარჩენი გამხსნელები;
- ✓ პოლიმორფული ფორმები,ენანტიომერული მინარევები.

ანალიზური მეთოდის დამუშავება საშუალებას გვაძლევს, დეტექტირდეს, როგორც ცნობილი ისე უცნობი ნივთიერებია (უცნობი ნივთირების დადგენა მას-სპექტრომეტრის გარეშე შეუძლებელია) ქრომატოგრაფიული პირობებისა და ფაზების სკრინინგი, უმეტესად გამოიყენება გრადიენტული ელუირება.

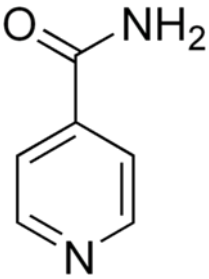
საჭიროა მეთოდის ოპტიმიზაციას, რათა მივიღოთ შესაბამისი სელექტიურობა, სპეციფიურობა და განმეორებადობა [13]

5.1 ექსპერიმენტში გამოყენებული ნივთიერებები

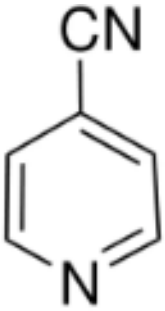
1. **იზონიკოტინისმჟავა**



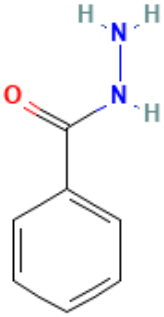
2. **იზონიკოტინამიდი**



3. **4-ციანოპირიდინი**

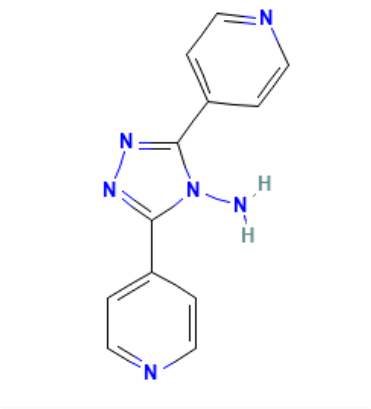


4. **ბენზოჰიდრაზიდი**

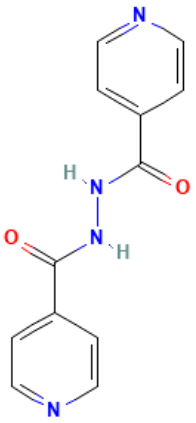


5. **3,5-დი(პირიდინ-4-ილ)-4H-1,2,4-ტრიაზოლ-4-ამინი**

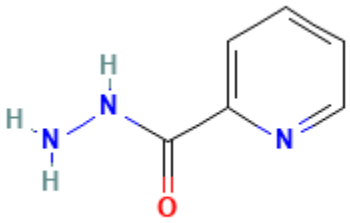
6. **1,2-დიიზონიკოტინოილ ჰიდრაზინი**

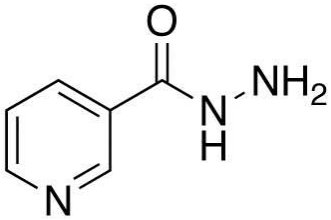


7. პიკოლინოჰიდრაზიდი



8. ნიკოტინის მჟავა ჰიდრაზიდი





5.2 რეაქტივები და მასალები

ქრომატოგრაფიული სვეტი Eclipse Plus C18, , 250x4,6 მმ, 5 um, (მწარმოებელი Agilent Technologies, აშშ)

ქრომატოგრაფიული სვეტი Inertsil ODS-3V ზომა 250x4,6 მმ, 5 um, GL Sciences, იაპონია)

ქრომატოგრაფიული სვეტი Inertsil ODS-4 3um 4.6 X 150 mm,

ქრომატოგრაფიული სვეტი Kinetex 2.6um C18 100A 150 X 3mm

გამოხდილი წყალი (ლაბორატორიული პროცედურებისთვის)

აცეტონიტრილი-, J.T. Baker, HPLC Far UV/Gradient Grade, Cat. Nr.:9012, Lot: 2230005852

მეთანოლი, -J.T. Baker, (Ultra) Gradient HPLC Grade, Cat. Nr.:8402, Lot: 2233405854

ამონიუმის ფორმიატი,-Aldrich, Cat. Nr.: 516961-100G. Lot. Nr.:MKCH0472

დი-ამონიუმის ჰიდროფოსფატი-Riedel-de Haen, Cat. Nr.: 30402, Lot.: 00470

იზონიაზიდის სტანდარტი-CRS, European Pharmacopeia Reference Standard, Code: 10500000, ID: 003zGm, Lot. Nr.:00219, Sigma, Cat. Nr.: I3377, Bno.: MKCT5583

იზონიაზიდის მინარევების სტანდარტები:

1. 4-ციანოპირიდინი (C0457-100G)
2. იზონიკოტინისმჟავა (I0207-25g);
3. იზონიკოტინამიდი (I0135-25g)
4. ბენზოჰიდრაზიდი Cat.No:BD115613-10g, Lot.No:BMP608;
5. ნიკოტინის მჟავას ჰიდრაზიდი (N0087-25g)
6. პიკოლინოჰიდრაზიდი Cat.No:BD78283, Lot.No:BMA338
7. 3,5-დი(პირიდინ-4-ილ)-4H-1,2,4-ტრიაზოლ-4-ამინი
8. დიიზონიკოტინოლჰიდრაზინი TRC-D455275 (250mg), 4329-75-3

5.3 გამოყენებული აპარატურა

Agilent 1260 Infinity Quaternary Pump (p/n:G1311B)

Agilent 1260 Infinity autosampler (p/n:G1329A)

Agilent 1260 Infinity II Multicolumn Thermostat (MCT) (p/n:G1116A)

Agilent 1260 Infinity II VWD (p/n:G7114A)

სურათი 5-მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიის ხელსაწყო

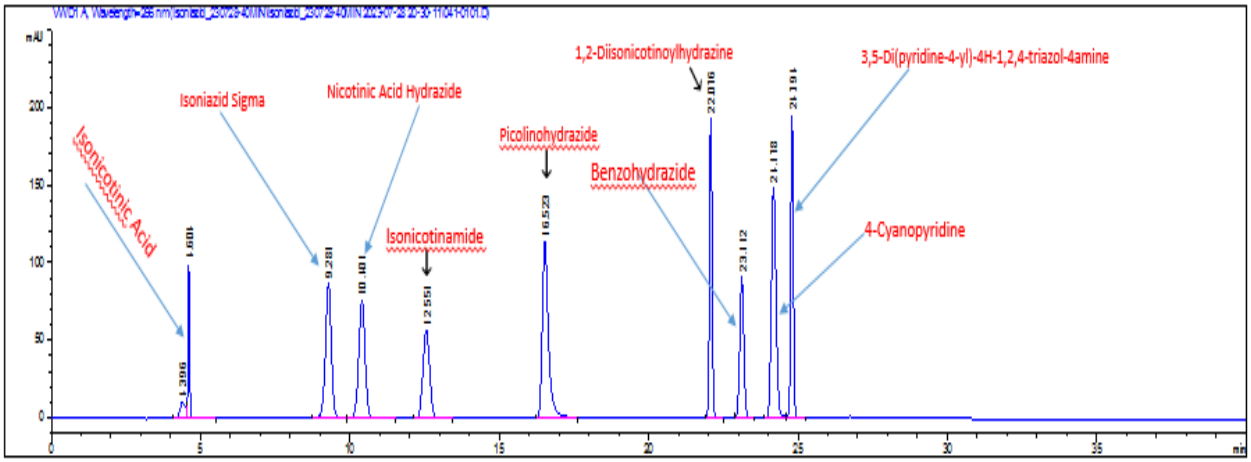
5.4 მიღებული ექსპერიმენტული შედეგები და მათი განსჯა

ჩვენს მიერ თავდაპირველად ჩატარებულ იქნა იზონიაზიდის მინარევების განსაზღვრა ევროპულ ფარმაკოპეიაში აღწერილი იზონიაზიდის მინარევების რაოდენობრივი ანალიზის მეთოდით, რომელიც მოწოდებული იყო სუბსტანციებისა და მზა პროდუქტებისთვის. სადაც გამოყენებული იყო სვეტი Inertsil ODS-3V ზომა 250x4,6 მმ, 5 um ნაწილაკების ზომით, ხოლო მოძრავ ფაზად. A ელუენტი (2.72გ/ლ) KH2PO4+2%ACN (pH 7.2) B ელუენტი 100% ACN, ტალღის სიგრძე 266 ნმ, ნაკადი 1მლ/წთ.

t	A	B
0	100	0
6	100	0
15	96	4
25	80	20
30	100	0
40	100	0

ცხრილი 1.

აღნიშნული მეთოდით 9 კომპონენტიანი ნარევის გაანალიზება ხდებოდა ყოველი ანალიზების სერიის დასაწყისში, მიღებულ შედეგებზე დაკვირვებამ აჩვენა ახალი სვეტის გამოყენების შემთხვევაში ფარმაკოპეული მეთოდით მოწოდებული მოძრავი ფაზის გამოყენებით საკმაოდ მაღალი გარჩევითობით ხდება 9 კომპონენტიან ნარევში პიკების დაყოფა, მათ შორის იზონიაზიდის და მისი უახლოესი მინარევი ნიკოტინის მჟავას ჰიდრაზიდი ფუძისეულად იყოფა, იხილეთ ნახაზი 4.



ნახაზი 4. სვეტი Inertsil ODS-3V 5um 4.6 X 250 mm, მოძრავი ფაზა A Eluent-(2.72g/L) KH2PO4+2%ACN (pH 7.2) & (B eluent 100% ACN)

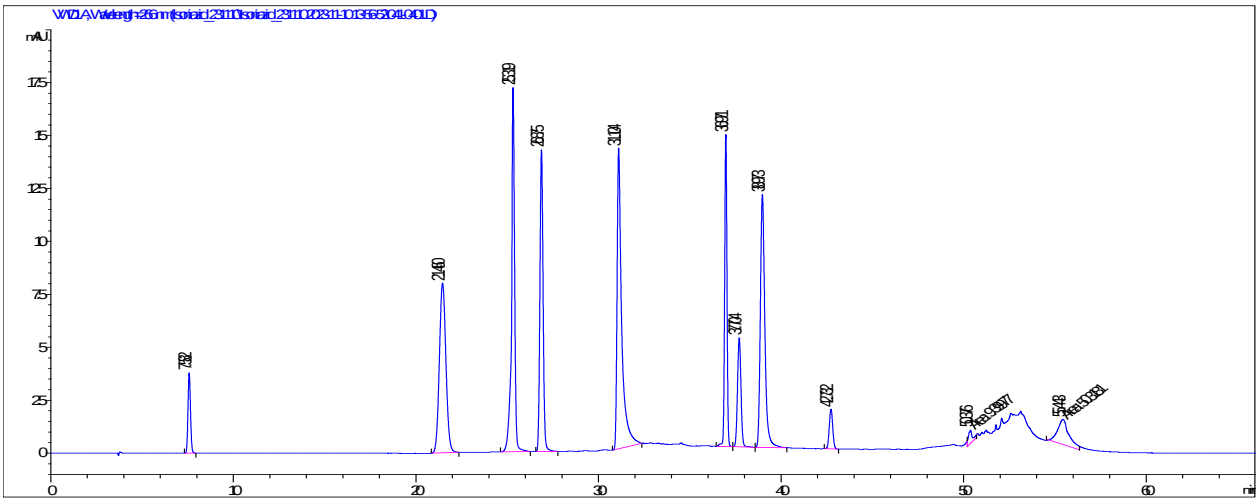
თუმცა ათეულობით ინიცირების შემდეგ როგორც დავადგინეთ მაღალი კონცენტრაციის კალიუმის დიჰიდროფოსფატის არსებობა მოძრავ ფაზაში იწვევს გარკვეულ პრობლემებს, ჩვენი ვარაუდით აღნიშნული მარილი ფორებში ილექება, როდესაც აცეტონიტრილის შემცველობა მოძრავ ფაზაში იზრდება. ეს პრობლემა თანდათანობით გამოიხატება სვეტის ეფექტურობის შემცირებით (პიკების გაგანიერება) და პიკების ასიმეტრიით, რაც საბოლოო ჯამში გარჩევითობის გაუარესებას იწვევს.

აღნიშნული პრობლემის გადასაწყვეტად, კალიუმის დიჰიდროფოფატის ჩანაცვლება მოვახდინეთ ამონიუმის ფორმიატით, რომელიც საკმაოდ კარგად ხსნადია აცეტონიტრილში და შემდგომი ანალიზები უკვე ახალი მოძრავი ფაზებით ჩავატარეთ.

სადაც გამოყენებული იყო სვეტი Inertsil ODS-3V 5um 4.6 X 250 mm.ხოლო მოძრავ ფაზად.A ამონიუმის ფორმიატი, 0.315გ/ლ, pH 7.2+0.5%ACN, B ელუენტი 100% ACN, ტალღის სიგრძე 266 ნმ, ნაკადი 1მლ/წთ,იხილეთ ნახაზი 5.

t	A	B	C	D
0	49.8	49.7	0.2	0.3
18	49.8	49.7	0.2	0.3
35	40.0	40.0	10.0	10.0
45	40.0	40.0	10.0	10.0
50	0	0	50	50
51	49.8	49.7	0.2	0.3
66	49.8	49.7	0.2	0.3

ცხრილი 2.

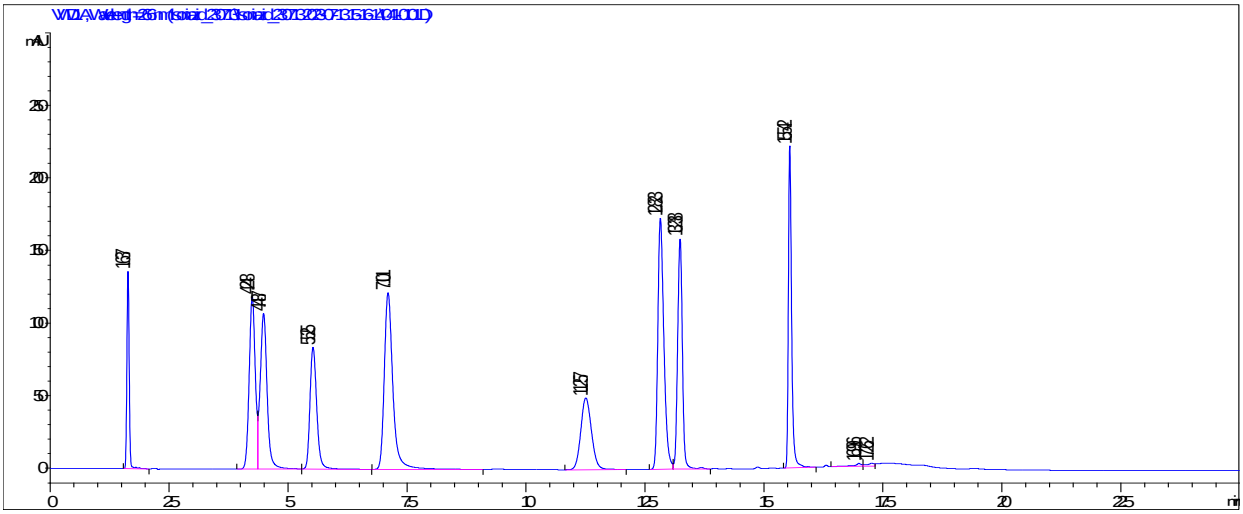


ნახაზი 5. სვეტი Inertsil ODS-3V 5um 4.6 X 250 mm.ხოლო მოძრავ ფაზა. A ამონიუმის ფორმიატი, 0.315გ/ლ, pH 7.2+0.5%ACN, B ელუენტი 100% ACN, ტალღის სიგრძე 266 ნმ, ნაკადი 1მლ/წთ.

ახალი დამუშავებული მეთოდით მიიღწეოდა იზონიაზიდის და მისი 8 მინარევის ფუძისეული დაყოფა, მაგრამ ანალიზის დრო დაახლოებით 66 წთ-ს შეადგენდა, შესაბამისად გავაგრძელეთ მეთოდის ოპტიმიზაციის მიმართულებით მუშაობა, მაგრამ მრავალჯერადი ინიცირების შემდეგ კვლავ გაუარესდა სვეტის ეფექტურობა და ჩვენი ვარაუდით ამ მწარმოებლის სვეტებს გააჩნიათ გარკვეული ტექინკური პრობლემები, რაც არ იძლევა მათი სტაბილური გამოყენების შესაძლებლობას.

აღნიშნული პრობლემის გადასაწყვეტად და ანალიზის დროის შესამცირებლად შევეცადეთ მეთოდი გადაგვეტანა მოკლე სვეტზე, კერძოდ კომპანია Phenomenex-ის წარმოებულ Kinetex

150 X 4.6 მმ, 5მკმ, F5 100A ფორების ზომით, იგივე მოძრავი ფაზით და მოდიფიცირებული გრადიენტით,იხილეთ ნახაზი 6.

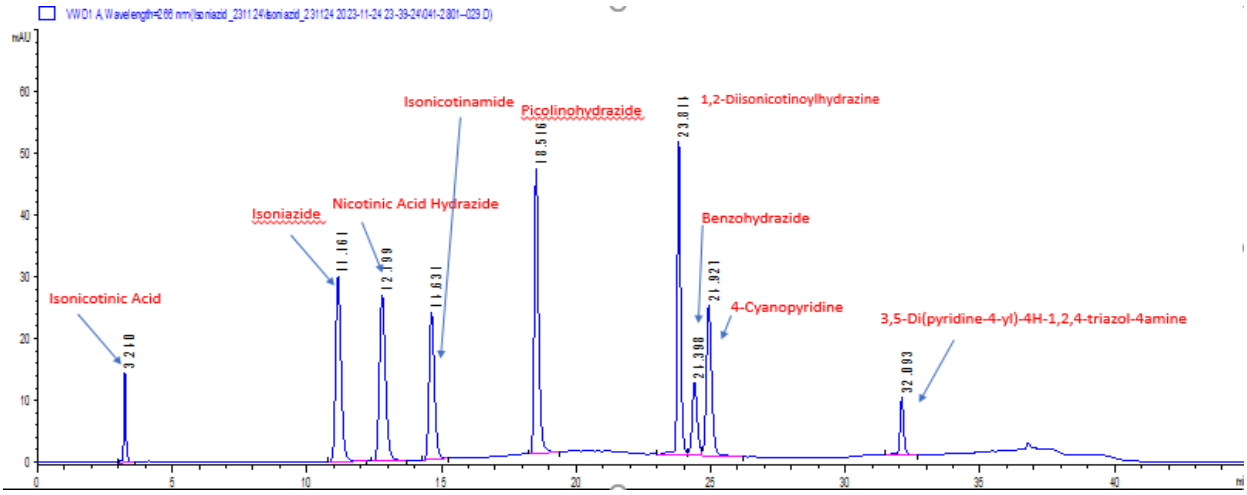


ნახაზი 6. სვეტი Kinetex 150 X 4.6 მმ, 5მკმ, F5 100A, მოძრავი ფაზა A ამონიუმის ფორმიატი, 0.315გ/ლ, pH 7.2+0.5%ACN, B ელუენტი 100% ACN, ტალღის სიგრძე 266 ნმ, ნაკადი 1მლ/წთ

მოკლე სვეტის გამოყენებამ მართალია შეამცირა ანალიზის დრო, მაგრამ ამავდროულად იმდენად შემცირდა დაყოფის სელექტივობა იზონიაზიდსა და ნიკოტინის მჟავას ჰიდრაზიდს შორის, რომ აღარ მოხდა მათი ფუძისეული დაყოფა და შესაბამისად მეთოდი არ გამოდგება იზონიაზიდის სუბსტანციასა და მზა სამკურნალო საშუალებებში მინარევების შემცველობის განსასაზღვრად.

აღნიშნული დასკვნის გამოტანის შემდეგ ექსპერიმენტები გავაგრძელეთ იგივე, ოქტადეცილ სილიკაგელის საფუძველზე მომზადებულ სვეტზე, ოღონდ ამ შემთხვევაში გამოვიყენეთ სხვა მწარმოებლის, კერძოდ Agilent Technologies სვეტი, ისევ 250მმ სიგრძის და 5მკმ ნაწილაკების ზომით, რომელიც იძლეოდა განმეორებად შედეგებს და ხასიათდებოდა ხანგრძლივი სტაბილურობით ჩვენს მიერ გამოყენებულ მოძრავ ფაზებში, მაგრამ პიკებს შორის გარჩევითობა არ იყო საკმარისად კარგი, რათა მომხდარიყო იზონაზიდის და მის უახლოეს მინარევის-ნიკოტინის მჟავას ჰიდრაზიდს ფუძისეული დაყოფა. აღნიშნული პრობლემის გადაწყვეტის მიზნით ჩავატარეთ ექსპერიმენტები, რათა მოგვეხდინა მოძრავი ფაზის ოპტიმიზაცია.

მოძრავი ფაზა:A -(0.315g/L) ამონიუმის ფორმიატი pH 7.2+0.5%ACN, B- 2.64g/l დი-ამონიუმის ჰიდროფოსფატი pH7.2+50%ACN

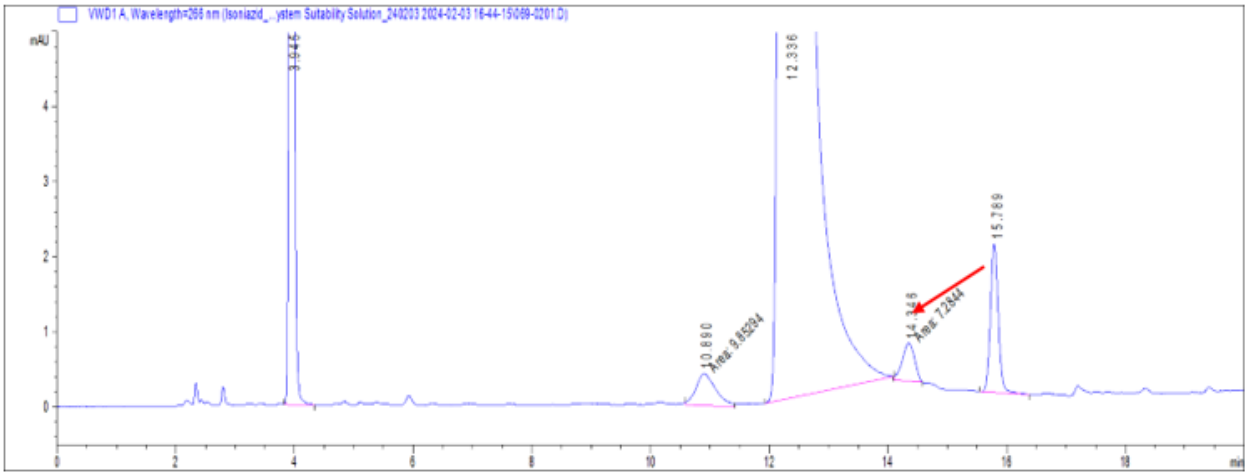


ნახაზი 7. სვეტი Agilent Eclipse Plus C18, 250mmX4,6mm, 5um; ტალღის სიგრძე 266 ნმ, ნაკადის სიჩქარე 1მლ/წთ.

მეთოდის ხანგძლივობა 45 წთ.

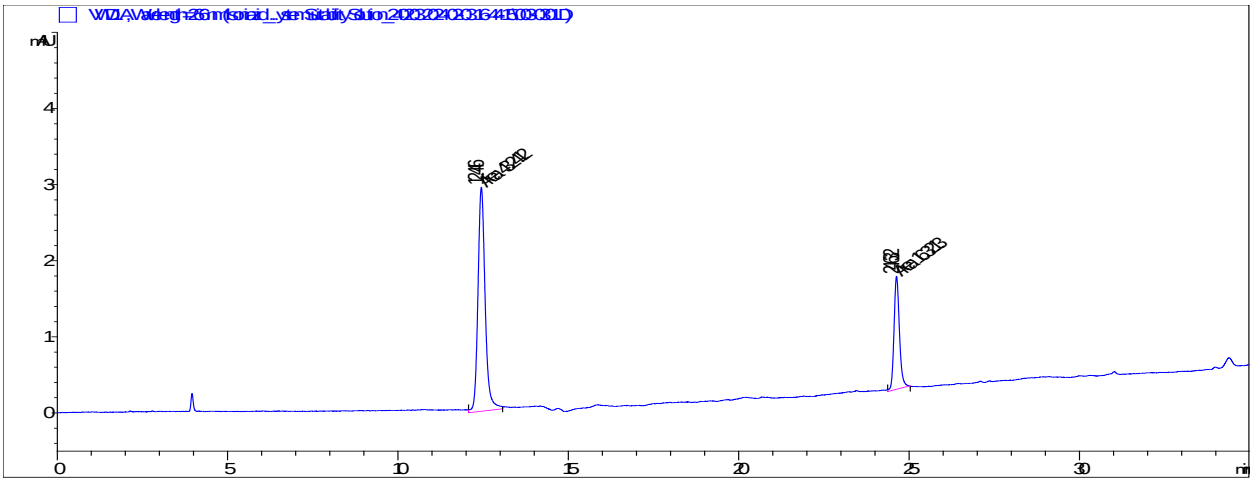
ახალი მეთოდით ვხედავთ, რომ არ მომხდარა ნიკოტინის მჟავა ჰიდრაზიდის პიკის გადაფარვა იზონიაზიდით, იხილეთ ნახაზი 7.

მას შემდეგ, რაც ცალსახად იქნა დადგენილი ახლად დამუშავებული მეთოდის ვარგისიანობა იზონიაზიდის სუბსტანციის და მზა პროდუქტების ანალიზისათვის, საჭირო გახდა ანალიზური მეთოდის ვალიდაცის ჩატარება. მსგავსი მეთოდებისათვის ვალიდირების მთავარ კრიტერიუმად მიიჩნევა მინარევების აღმოჩენის ზღვარის განსაზღვრა. სწორედ აღნიშნულის გამო ჩვენს მიერ მომზადდა იზონიაზიდის ნიმუში მისი ცნობილი მინარევის ნიკოტინმჟავას ჰიდრაზიდის 0,1% შემცველობით,იხილეთ ნახაზი 8.

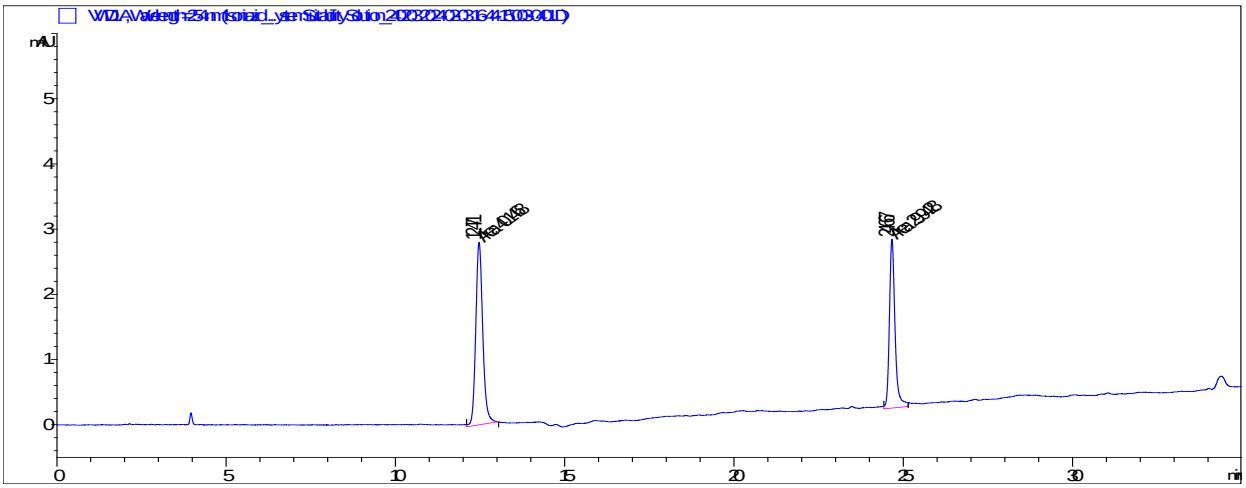


ნახაზი 8. სვეტი Agilent Eclipse Plus C18, 250mmX4,6mm, 5um; ტალღის სიგრძე 266 ნმ, ნაკადის სიჩქარე 1მლ/წთ.

ასევე მიჩნეულ იყო, რომ იზონიაზიდის ერთ-ერთი მინარევის კერძოდ ბენზოჰიდრაზიდის მინარევის გამოძახილი იყო მცირე 266 ნმ ტალღის სიგრძეზე და არსებობდა იმის საშიშროება, რომ დაბალი კონცენტრაციის პირობებში ვერ მოხერხედებოდა მისი დეტექტირება აღნიშნულ ტალღის სიგრძეზე და მოითხოვებოდა ამ კონკრეტული მინარევის გაანალიზება 254 ნმ ტალღის სიგრძეზე, მოვამზადეთ იზონიაზის ხსნარი და მინარევის კონცენტაცია შეადგენდა 0.001 მგ/მლ-ს და გავანალიზეთ 266 ნმ ტალღის სიგრძეზე მიღებულმა შედეგმა აჩვენა, რომ 266ნმ ტალღის სიგრძეზე შესაძლებელია ბენზოჰიდრაზის მინარევის განსაზღვრა 0.001% იზონიაზიდში. როგორც მოტანილი ქრომატოგრამიდან ჩანს 266 და 254 ტალღის სიგრძეებზე ბენზოჰიდრაზიდის გამოძახილი მნიშვნელოვნად არ განსხავდება, იხილეთ ნახაზი 9 და 10.



ნახაზი 9. სვეტი Agilent Eclipse Plus C18, 250mmX4,6mm, 5um; ტალღის სიგრძე 266 ნმ, ნაკადის სიჩქარე 1მლ/წთ.



ნახაზი 10. სვეტი Agilent Eclipse Plus C18, 250mmX4,6mm, 5um; ტალღის სიგრძე 254 ნმ, ნაკადის სიჩქარე 1მლ/წთ.

როგორც ცნობილია ფარმაკოპეებში მზა სამკურნალო საშუალებების და სუბსტანციების ძირითად ნივთიერების განსასაზღვრის მეთოდი, სასურველია იყოს მარტივი და მოკლე ანალიზის დროით, რადგან ლაბორატორიებს გაცილებით მეტჯერ უწევთ შემცველობის განსაზღვრა, ვიდრე მინარევების ანალიზი (შემომავალი სუბსტანციების ხარისხის განსაზღვრა, ტექნოლოგიურ პროცესებში წარმოების შუალედურ პროდუქტებში მოქმედი სუბსტანციის შემცველობის განსაზღვრა, გამოთავისუფლების ტესტის პროცესში და სამკურნალო საშუალებიდან გამოთავისუფლებული სუბსტანციის კონცენტაციის

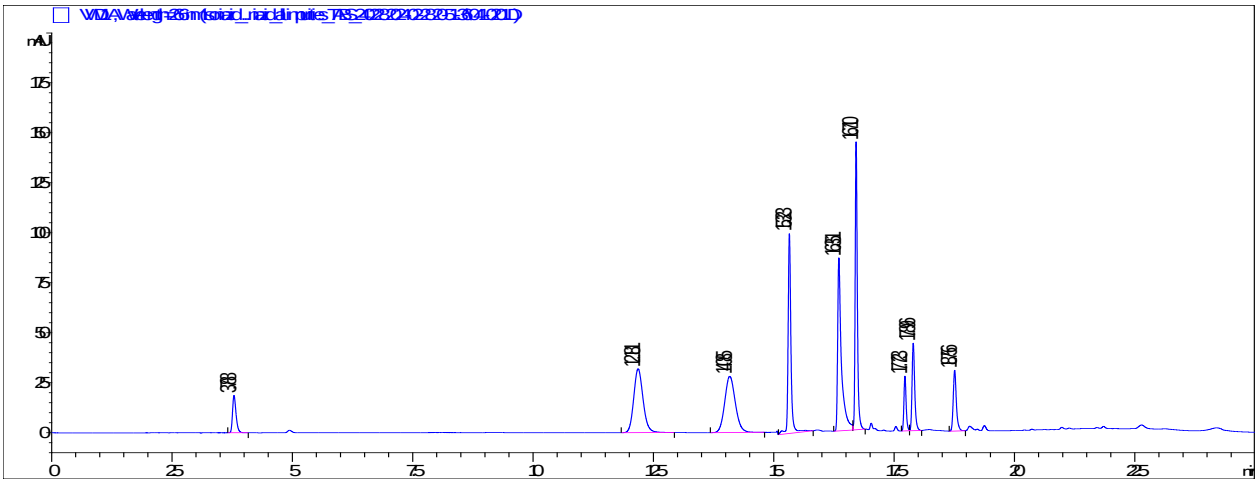
განსაზღვრა, სტაბილურობის ტესტის ჩატარების პროცესში სატესტო ტაბლეტებში აქტიური სუბსტანციის შემცველობის განსაზღვრა და ა.შ)

სწორედ, აღნიშნულიდან გამომდინარე, ჩვენს მიზანს წარმოადგენდა მოგვეხდინა ჩვენს მეთოდში გრადიენტის ისეთი მოდიფიცირება, რომ ის გამოსადეგი ყოფილიყო ყველა ზემოთ აღნიშნულ შემთხვევაში, იზონიაზიდის რაოდენობრივი განსაზღვრისთვის(assay method)). მნიშვნელოვანი იყო მეთოდი ყოფილიყო არაუმტეს 25 წუთისა და ამასთანავე შეგვერჩუნებინა იზონიაზიდსა და მის მინარევებს შორის ფუძისეული დაყოფა.

ჩვენს მიერ შერჩეული ოპტიმალური გრადიენტი, იხილეთ ცხრილი 3.

t	A	D
0	100	0.0
10	100	0.0
18	25.0	75.0
20	25.0	75.0
20.1	100	0.0
25.0	100	0.0

ცხრილი 3.



ნახაზი 11. სვეტი Agilent Eclipse Plus C18, 250mmX4,6mm, 5um; ტალღის სიგრძე 266 ნმ, ნაკადის სიჩქარე 1მლ/წთ.

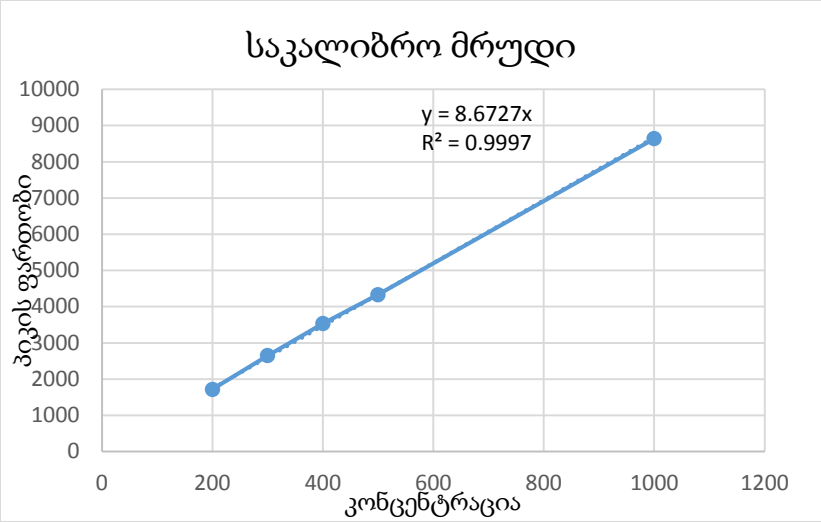
აღნიშნული გრადიენტით მიღებული შედეგი წარმოდგენილია ნახაზ 11-ზე.

რამდენადაც, ჩვენს მიერ საბოლოო სახით ოპტიმიზირებული მეთოდი ანალიზის დროით უკეთესიც კი იყო ევროპულ და ამერიკულ ფარმაკოპეებში აღწერილი იზონიაზიდის რაოდენობრივი ანალიზის მეთოდთან შედარებით, რომელიც გამოიყენება მსოფლიოს მრავალ ფარმაცევტული ანალიზის ლაბორატორიაში როგორც სუბსტანციებისათვის ასევე მზა სამკურნალო საშუალებებისათვის. ექსპერიმენტები გავაგრძელეთ ჩვენ მიერ დამუშავებული ვალიდაციის მიმართულებით, საკალიბრო მრუდის ასაგებად მოვამზადეთ 5 სხვადასხვა კონცენტრაციის სტანდარტული ხსნარი: 200, 300, 400, 500 და 1000 მკგ/მლ კონცენტრაციებით, ჩავატარეთ ანალიზები და ავაგეთ საკალიბრო მრუდი. რომლის კორელაციის კოეფიციენტი არის 0.9997, რაც სრულიად შეესაბამება ფარმაკოპეების მოთხოვნებს რაოდენობრივი ანალიზის მეთოდისათვის. აღნიშნული საკალიბრო მრუდის გამოყენებით განვსაზღვრეთ იზონაზიდის შემცველობა CRS სტანდარტში (გავაანალიზეთ როგორც ნიმუში) და ორ, სხვადასხვა მწარმოებლის, უკრაინულ და გერმანულ მზა სამკურნალო პრეპარატში: Isozid Tab. (გერმანია) და Isoniazid Tab. (უკრაინა).

მზა სამკურნალო საშუალებებიდან საანალიზო ხსნარის მოსამზადებლად, გაფხვიერებულ იქნა 20 ტაბლეტი და აწონილ იქნა 1 ტაბლეტის შესაბამისი საშუალო წონაკი, გადავიტანეთ 200 მლ-იან A კლასის მზომ კოლბში და დავამატეთ 150 მლ რაოდენობის A მოძრავი ფაზა, შევანჯღრიეთ მაგნიტურ სარეველაზე 30 წუთის განმავლობაში, შემდეგ შევავსეთ მოძრავი ფაზით ჭდემდე. ანალოგიურად მოვამზადეთ სამი პარალელური ხსნარი. მიღებული ხსნარი ჩავფილტრეთ, ჯერ ქაღალდის ფილტრის გამოყენებით, ხოლო შემდგომ მემბრანული ფილტრის გამოყენებით საანალიზო ქრომატოგრაფიულ ვიალაში და გაავაანალიზეთ ჩვენს მიერ დამუშავებული იზონიაზის რაოდენობრივი განსაზღვრის მეთოდით.

მიღებული შედეგები წარმოდგენილია ცხრილ 4-ში.

როგორც, ცხრილი 4-დან დასტურდება ჩვენს მიერ დამუშავებული იზონიაზიდის რაოდენობრივი ანალიზის მეთოდი ზუსტი და საიმედოა იზონიაზიდის რაოდენობრივი შემცველობის განსაზღვრისთვის, სხვადასხვა მწარმოებლის აქტიურ ფარმაცევტულ სუბსტანციებებსა და მზა სამკურნალო საშუალებებში.



გრაფიკი 1.

	კონცენტრაცია მკგ/მლ	პიკის ფართობი	გამოთვლილი კონცენტრაცია მკგ/მლ	%
Sigma	1000	8766		
CRS	1000	8637	985.28	98.528
	500	4333	494.30	98.859
	400	3534	403.15	100.787
	300	2651	302.42	100.806
	200	1718	195.98	97.992
Isozid Tab.	300	2584	292.47	97.491
Isoniazid Tab. UKR	300	2632	300.25	100.084

ცხრილი 4.

6 დასკვნები

1. შემუშავებულ იქნა მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიის ახალი, სტაბლური და განმეორებადი მეთოდი აქტიურ ფარმაცევტულ სუბსტანციასა და მზა სამკურნალო საშუალებებში იზონიაზიდის მინარევების რაოდენობრივი განსაზღვრისათვის;

2. შემუშავებულ იქნა მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიის ახალი, სტაბლური და განმეორებადი მეთოდი აქტიურ ფარმაცევტულ სუბსტანციასა და მზა სამკურნალო საშუალებებში იზონიაზიდის რაოდენობრივი განსაზღვრისათვის;

3. ახალი მეთოდის გამოყენებით, განსაზღვრულ იქნა იზონიაზიდის რაოდენობრივი შემცველობა სხვადასხვა მწარმოებლის მიერ დამზადებულ იზონიაზიდის ტაბლეტებში.

7 გამოყენებული ლიტერატურა

[1] "https://www.emro.who.int/media/news/world-tuberculosis-day-2024-many-more-tb-cases-could-be-prevented.html," [Online].

[2] T. Ebtisam, Badawy1*, E. Amany, Ragab1 and A. K. Kabbash1, "Isoniazid, Mechanism of Action, Biological Activity, Resistance and Biotransformation," 2023.

[3] ბ. ჭანკვეტაძე, "ნარევთა დაყოფის ინსტრუმენტული მეთოდები," *სალექციო კურსი,* 2015.

[4] ლ. ჭანკვეტაძე, სითხური ქრომატოგრაფია, თბილისი, 2019.

[5] მ. რუხაძე, "ნორმალურ და შებრუნებულ ფაზიანი ქრომატოგრაფია," 2022.

[6] G. Guiochon , A. Felinger, D. G. Shirazi and A. M. Katti, "Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography," *Academic Press,* p. 975, 2006.

[7] ბ. ჭანკვეტაძე, "„ქრომატოგრაფიული დაყოფის პრინციპები ,“," *სალექციო კურსი,* 2023.

[8] გ. ჯიბუტი, "რაოდენობრივი ანალიზი სითხურ ქრომატოგრაფიაში," *ლაბორატორიული კურსი - ფიზიკური ქიმია 4,* 2017.

[9] მ. რუხაძე, "შესავალი ქრომატოგრაფიაში," 2023.

[10] D. R. Taylor and k. Maher, "Chiral Separations by High-Performance Liquid Chromatography. J. Chromatogra," vol. 30, pp. 67-85, 1992.

[11] "https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isoniazid," [Online].

[12] "https://www.aversi.ge/aversi/act/medicineAnnotation/?id=1133," [Online].

[13] ლ. ჭანკვეტაძე, მინარევების განსაზღვრის აუცილებლობა API-სა და მზა სამკურნალო საშუალებებისათვის სალექციო კურსი, თბილისი, 2023.

[14] D. Fanali, R. P. Haddad, C. Poole, P. Schoenmakers and D. Lloyd, "Lloyd Liquid Chromatography Fundamentals and Instrumentation," p. 520, 2013.