

KRYSTYNA OBOJSKA

PRZEMIANA HYDRAZYDU KWASU IZONIKOTYNOWEGO W ORGANIZMIE ZWIERZĘCYM

Z Zakładu Farmakologii Instytutu Leków i Instytutu Gruźlicy w Warszawie
Kierownik: doc. dr *J. Venulet*

Pierwsze prace nad oznaczaniem hydrazydu kwasu izonikotynowego (INH) i jego pochodnych w moczu przy pomocy chromatografii bibułowej pojawiły się w tym samym roku (1951), w którym doniesiono o przeciwpłatkowym działaniu tego związku. Pisali na ten temat *Kodiček i Reddi* (1951), *Huebner* (1951), *Cuthbertson i Ireland* (1952), a następnie *Cuthbertson, Ireland i Wolf* (1953).

Autorzy ci stosowali chromatografię wstępującą i zstępującą, a używali układów: propanol: woda 4:1, n-butanol: woda (4:1), metyloetyloketon — kwas octowy — woda (49:1:50), n-butanol nasycony 1,5 N amoniakiem, metyloetyloketon — amoniak (1:1). Obiektem badań był przeważnie mocz liofilizowany, rzadziej świeżo pobrany. Często zamiast chromatografii stosowano niskowoltową elektroforezę moczu w odpowiednim buforze, co daje dobre wyniki, ponieważ następuje tu jednoczesne odsalanie badanej próbki.

Uzyskane przez cytowanych autorów wyniki, a także ogólne zasady mechanizmów detoksykacji, pozwalają przypuszczać, że ustrój zamienia terapeutycznie czynną postać leku (INH) w pochodne, wśród których bardzo słabym działaniem na prątki odznacza się pochodna acetylowa.

W świetle tego interesujące jest stwierdzenie, że jakkolwiek cytowani wyżej autorzy wśród pochodnych INH wymieniają pochodną acetylową, a nawet podają liczbowe dane o niej, nie można spotkać w ich pracach ani sposobu identyfikacji chromatograficznej tej pochodnej, ani ilościowego oznaczenia.

Pierwszą metodę identyfikacji tej pochodnej przy pomocy chromatografii wstępującej w układzie n-butanol nasycony 0,5 N kwasem octowym podają *Zamboni i Defranceschi* (1954).

Niezbyt dokładne oddzielenie pochodnej acetylowej od INH ze względu na zbliżone Rf., skłoniło nas do opracowania rozdziału metabolitów INH

w moczu, ze szczególnym uwzględnieniem pochodnej acetylowej. Uzyskane wyniki mają duże znaczenie dla badań nad przebiegiem acetylacji INH *in vitro* i wpływem różnych substancji na ten proces.

Celem niniejszej pracy było: 1) Opracowanie preparatyki moczu szczurów dla badań chromatograficznych metabolitów IHN. 2) Opracowanie rozdziału tych metabolitów, ze specjalnym uwzględnieniem wyraźnego oddzielenia pochodnej acetylowej. 3) Wybór odpowiedniej aminy pierwszorzędowej celem ostatecznego wywołania metabolitów INH na bibule, po nasyceniu bibuły bromocyjanem. 4) Zidentyfikowanie otrzymanych metabolitów.

MATERIAŁ DOŚWIADCZALNY I METODY

Do badań użyto białe szczury, samce wagi od 290 do 360 gramów, w ogólnej liczbie 25 sztuk.

1. Przygotowanie bibuły chromatograficznej

Używano bibuły Whatman nr 1, którą cięto na paski długości 40 cm i szerokości 20 cm. W naszym przypadku wysokość chromatogramu przy preparatyce niedosolonego moczu odgrywa dosyć ważną rolę. Chromatogramy rozwijano w dwulitrowych cylindrach miarowych, uszczelnionych plasteliną i płytkami Petri'ego. Powierzchnia kolista, na którą наносzono mocz miała średnicę od 0,6 do 0,7 cm.

2. Przygotowanie moczu

Szczurom białym odżywianym normalnie podawano podskórnie 50 mg/kg INH firmy Bayer, potem zwierzęta te nawadniano solą fizjologiczną, podając ją w ilości stanowiącej 3% w stosunku do wagi ciała. Po podaniu leku i nawodnieniu zwierzęta umieszczano na lejkach Büchnera. Mocz zbierano przez cztery godziny od czasu podania leku. Na lejku zwierzęta otrzymywały kawałek białego buraka pastewnego. Podawania marchwi zamiast buraka powoduje ciemne zbarwienie moczu, które przeszkadza przy chromatografii. Ilość moczu od jednego szczura po upływie 4 godzin wynosiła około 4 ml.

Użycie do badań świeżego moczu nie dawało rezultatów mimo 30 do 40-krotnego nanoszenia go na bibulę, po wywołaniu takiego chromatogramu otrzymywano bardzo słabe zbarwienie jednego, względnie dwóch metabolitów INH. Dlatego mocz zagęszczano odparowując go do sucha pod lampą podczerwoną, firmy Tungsram model Infrasec E 27 H 9045, umieszczoną w odległości 20 cm od parowniczkę z moczem.

Suchy osad moczu rozcieńczano odpowiednią ilością wody destylowanej otrzymując stosunkowo gęstą zawiesinę. Zawiesinę tę наносzono w ilościach od 0,02 do 0,06 ml na chromatogramy i suszono prądem ciepłego powietrza („fenem”).

W niniejszej pracy odstąpiono od wskazówek podręczników chromatograficznych, które mówią, że substancja наносzona musi dobrze wsiąkać w bibulę i że bibuła w miejscu nanoszenia powinna być sucha. Naniesiony gęsty roztwór moczu stanowił po wysuszeniu kroplę mazi o konsystencji słabo wyschniętej olejnej farby. Taki chromatogram wstawiano w odpowiedni układ rozpuszczalników.

3. Układy rozpuszczalników

W wyniku prowadzonych doświadczeń za najlepszy uznano układ Huebnera n-butanol nasycony 1,5N amoniakiem [8]. Również korzystne okazało się stosowanie n-butanolu nasyconego 3N amoniakiem i wprowadzonego przez nas układu n-butanol nasycony 25% amoniakiem (c. wł. amoniaku 0,910), zaznaczany na chromatogramach jako układ n-butanol nasycony stężonym amoniakiem. Wymienione układy dały bardzo dobre wyniki i stosowano je przez cały czas pracy, z wyjątkiem rozwijania chromatogramów w układzie słabo kwaśnym, co okazało się konieczne dla hydrazyny rozkładanej w środowisku alkalicznym.

4. Technika chromatografowania

Jednorazowe chromatografowanie w układzie wstępującym nie dało wyników, dlatego wprowadzono rechromatografowanie próbek. Po 28—29 godzinach chromatografowania w temperaturze pokojowej wyjmowano chromatogram z układu, suszono na powietrzu i ponownie wstawiano na ten sam czas do komory chromatograficznej. Taką rechromatografię powtarzano czterokrotnie, jeżeli nanoszono na bibułę duże ilości moczu. Osiągano przez to bardzo dobre oddzielenie poszczególnych metabolitów INH i wyraźne ich zabarwienie po wywołaniu.

W toku doświadczeń przekonaliśmy się, że w przypadku chromatografii wstępującej wyjęcie bibuły, suszenie i ponowne jej wstawienie do układu, daje lepsze wyniki, niż zostawienie chromatogramu w komorze na przeciąg 58 czy więcej godzin.

5. Metody wywoływania chromatogramów

a. Jako test barwny wybrano reakcję Königa [12] dawaną przez pirydynę i niektóre jej pochodne z bromocyjanem. Czas wywoływania krystalicznym bromocyjanem w suchej komorze wynosił 45—50 minut.

Niektóre pochodne INH dają już wtedy reakcję barwną. Należy zwrócić uwagę, aby kończyć wywoływanie chromatogramu natychmiast po wyjęciu go z kamery nasyconej bromocyjanem, przez użycie roztworu jakiejś aminy pierwszorzędowej. Przebywanie chromatogramu przez dłuższy czas poza komorą z bromocyjanem przed wywołaniem ostatecznym przy pomocy aminy, daje po wywołaniu nią osłabienie intensywności zabarwienia metabolitów na bibule. Jako ostatecznego wywoływacza używaliśmy za *Huebnerem* benzydyny w 50% alkoholu etylowym w stężeniu od 0,25% do 0,75%. Roztwór benzydyny należy sporządzić tuż przed użyciem, ponieważ roztwory takie ciemnieją i dają niewyraźne reakcje barwne.

Dla dobrego wyróżniania plam należało wybrać odpowiedni sposób nasycania chromatogramu roztworem aminy. Rozpylanie powoduje rozlewanie barwnych plam metabolitów, a po wysuszeniu, bibuła jest centkowana przez nierównomierne rozmieszczenie wywoływacza. Najdogodniejsze jest rozlewanie wywoływacza na odłuszczonej szybie, możliwie najcieńszą warstwą, szybkie całkowite zwilżenie chromatogramu i szybkie jego zdjęcie. Chromatogram suszymy w temperaturze pokojowej. Podgrzewanie chromatogramu do wyższej temperatury powoduje natychmiastowe znikanie barwnych plam i ciemnienie całej jego powierzchni. Po wysuszeniu utrwalamy chromatogram przez zanurzenie w roztopionej parafinie. Parafina nie powinna jednak być zbyt ciepła, bo powoduje wtedy całkowite zniknięcie plam metabolitów. Zresztą po pewnym czasie chromatogramy zaparafinowane także tracą barwę.

b. Metoda wywoływania chromatogramów przy pomocy chlorku pikrylu. Po rozwinięciu i starannym wysuszeniu, zanurzamy bezpośrednio chromatogram do etanolowego roztworu 1% chlorku pikrylu (2-chloro-1-3-5-trójnitrobenzenu). Następnie suszymy na powietrzu. Po wysuszeniu wkładamy chromatogram do komory z parami amoniaku. Prawie natychmiast otrzymujemy barwne plamy następujących substancji: niebiesko-szare hydrazyny, szmaragdowo-zielone izonikotynoiloglicyny, jasno-brązowe hydrazydu. Inne pochodne INH są słabo zaznaczone na żółtym tle chromatogramu.

c. Metoda uwidoczniania INH. INH może być wywoływany w sposób przedstawiony wyżej, można jednak zastosować metodę pozwalającą na wybiórcze uwidocznienie tego związku, a opartą na wykorzystaniu jego właściwości redukujących tj. test srebrowy. Test ten uwidocznia INH i jest o wiele bardziej czuły od postępowania z bromocyjanem.

Jako odczynnika wywołującego stosujemy 0,2 ml nasycony AgNO_3 rozpuszczony w bezwodnym ocetonie (24 ml); jeżeli w czasie rozpuszczania wytrąci się biały osad, to dodajemy nieco więcej acetonu. Zanurzamy w tym roztworze chromatogram i suszymy na powietrzu. Następnie 1 ml 40% NaOH rozpuszczamy w 20 ml alkoholu metylowego i ponownie zanurzamy chromatogram w tym roztworze, po czym przenosimy go na szybę i natychmiast kilkakrotnie płuczemy stężonym amoniakiem, aż bibuła otrzyma naturalne zabarwienie. Jeżeli odłożymy płukanie na okres dwóch godzin wtedy zaczernienie plam przestaje być swoiste, np. bardzo wyraźnie zaczerni się acetylo-INH.

Przez cały czas płukania chromatogramu amoniakiem winien on dobrze przylegać do szyby. To umożliwi bezpośrednio płukanie chromatogramu strumieniem wody bieżącej. Dobrze przyleganie bibuły do szyby powoduje, że mimo silnego strumienia wody chromatogram zostaje niezniszczony i może być dobrze wypłukany. Płukanie kończymy wówczas, gdy kropla fenolftaleiny kapnięta na bibułę przestaje ją barwić. W ten sposób na bibule otrzymujemy brązowe lub czarne plamy INH, są one trwałe.

d. Wywoływanie przy pomocy waniliny. Ze względu na to, że niektórzy autorzy [5, 6], używają do wywoływania INH oraz jego metabolitów waniliny, zbadano jej przydatność do tego celu.

Jak wiadomo wanilina nie jest swoistym odczynnikiem na INH, daje ona barwne reakcje z aminami pierwszorzędowymi i drugorzędowymi, kwasami hydroksamowymi, z hydrazyną, hydroksykwasami, a także z kwasami organicznymi, aldehydami i ketonami (*Bauer*). Użyta w 2% alkoholowym roztworze z dodatkiem paru kropli stężonego H_2SO_4 barwi zanurzony w niej chromatogram jednolitą żółtą smugą od startu, aż do umiejscowienia INH mającego w obranych układach największe R_f .

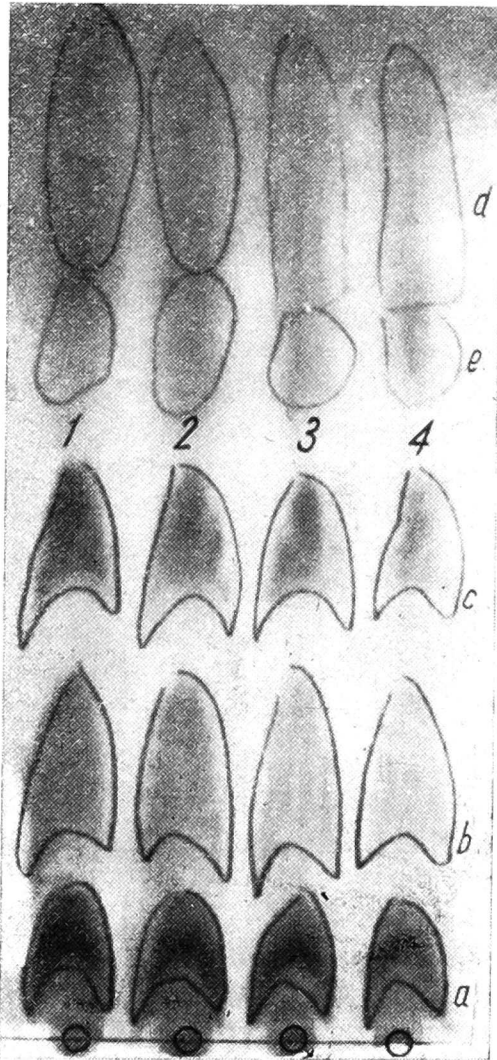
e. Wywoływanie hydrazyny. W celu uwidocznienia hydrazyny chromatografowano mocz w układzie: izopropanol — kwas mrówkowy — woda (80 : 10 : 10) przez 2 do 3 godzin. Chromatogramy wywoływane 1% odczynnikiem Ehrlicha (p-dwumetyloaminobenzaldehyd) w 50% metanolu z dodatkiem 10% kwasu solnego. Po upływie 15—20 minut otrzymywano pomarańczowe zabarwienie hydrazyny. Hydrazynę uwidoczniano także przy użyciu testu srebrowego. Najbardziej specyficznie uwidocznia hydrazynę 1% chlorek pikrylu w 96% etanolu.

WYNIKI

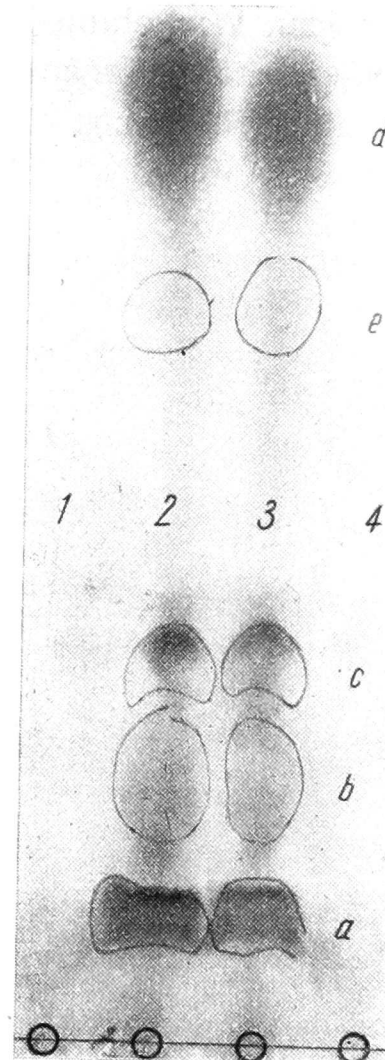
Chromatografując zagęszczony mocz szczura w układach alkalicznych zidentyfikowano w nim następujące pochodne INH: 1) kwas izonikoty-

nowy (b); 2) pochodna acetylowa INH (c); 3) INH (d); 4) izonikotynoiloglicyna (a). Otrzymane wyniki przedstawiają ryc. 1 i 2.

W układach kwaśnych wykryto hydrazynę, która znajduje się w chromatografowanym moczu w minimalnych ilościach, nie większych od paru mikrogramów w pobranej próbce.



Ryc. 1.

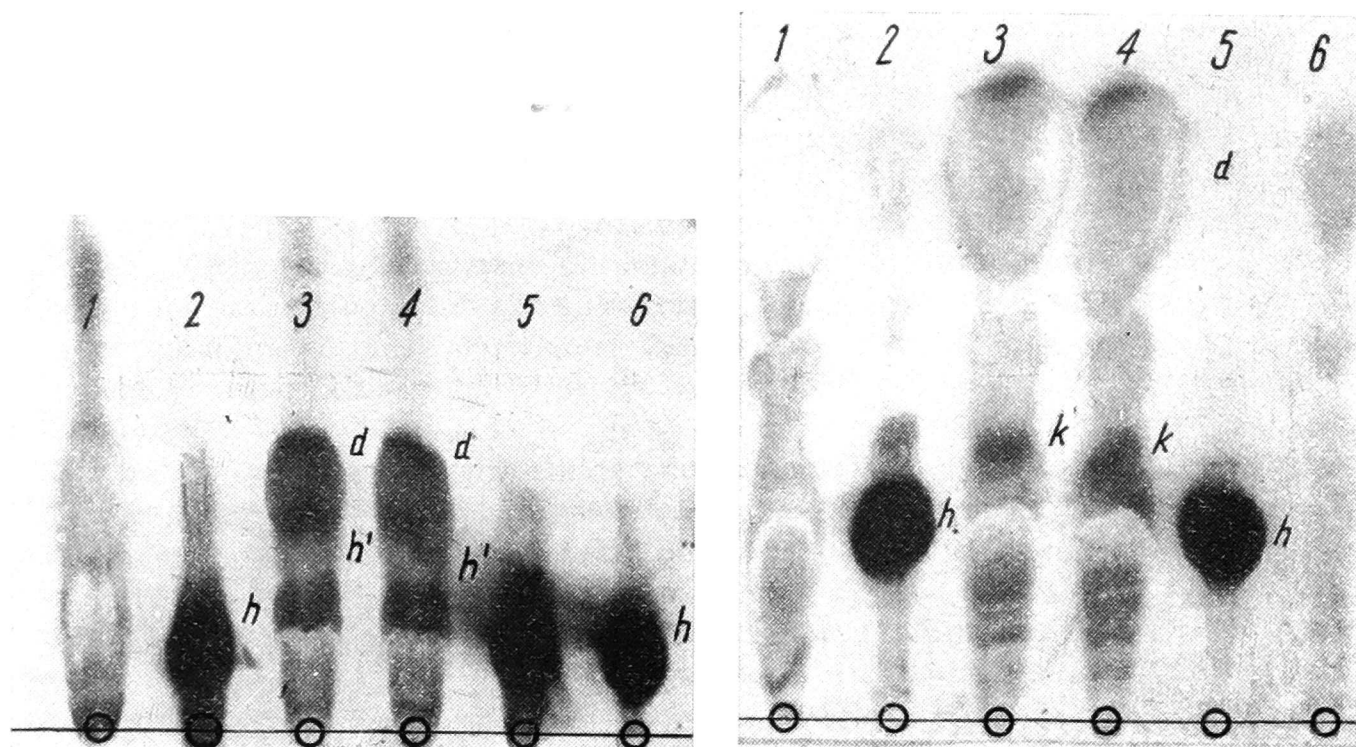


Ryc. 2.

Ryc. 1. Chromatogram moczu szczura, któremu podano INH. Rozwijano trzykrotnie w układzie n-butanol nasycony stężonym (25%) amoniakiem. Pochodne INH oznaczono przy pomocy reakcji z bromocyjanem i benzydynam (reakcja Königa). Zidentyfikowano następujące metabolity: a — izonikotynoiloglicyna; b — kwas izonikotynowy; c — acetylowa pochodna INH; d — INH; e — niezidentyfikowany metabolit INH.

Ryc. 2. Chromatografia kontrolna moczu szczura. Mocz rechromatografowano dwukrotnie w układzie n-butanol nasycony 1,5N amoniakiem, wywołany bromocyjanem i benzydynam. Mocz kontrolny próbki 1 i 4 nie daje zabarwienia przy wywołaniu chromatogramu. Próbki 3 i 4 pochodzą z moczu zwierzęcia, które otrzymało INH. Mocz kontrolny nie dawał zabarwienia we wszystkich wywoływanych przez nas chromatogramach. Mocz zwierzęcia, któremu podano lek wykazuje obecność: a — izonikotynoiloglicyny; b — kwasu izonikotynowego; c — acetylowa pochodna INH; d — INH; e — pochodna niezidentyfikowana INH.

Celem przekonania się czy nie ma jakich różnic jakościowych w metabolitach INH w moczu zależnie od czasu jego wydalania, zbierano oddzielnie mocz w czasie 2 godziny po podaniu leku, między 3 i 4 godziną po podaniu leku. Mocz zbierany przez pierwsze 2 godziny oznaczamy 2h, między 3 i 4 godziną 4h, a mocz zbierany bez leku, jako kontrolny. W obranych warunkach nie wykazano różnic spowodowanych czasem pobrania próbki moczu. Wywołanie chromatogramu metodą srebrową pozwoliło na uwidocznienie takich różnic (ryc. 3).



Ryc. 3. Uwidocznienie hydrazyny w moczu zwierząt, które otrzymały INH. Chromatogram moczu rozwijano w układzie izopropanol: kwas mrówkowy: woda (80:10:10). Wywołano metodą srebrową, celem uwidocznienia związków redukujących. Próbki moczu zbierano w różnym czasie. a — przedstawia: 1 mocz kontrolny, 2 hydrazyna, 3,4 — mocz zwierząt, którym podano INH chromatografowany po upływie 2 godzin, widoczna hydrazyna (h'). b — przedstawia: 1,6 mocz kontrolny, 2,5 hydrazyna syntetyczna (h), 3,4 — mocz zwierzęcia, któremu podano lek zebrany po upływie 4 godzin. — Na obu ryc. INH zaznaczono literą d . Na ryc. 1 i 2 widzimy zmniejszenie po upływie 4 godz. ilości hydrazyny (K) oraz zanik prawie całkowity wolnego INH.

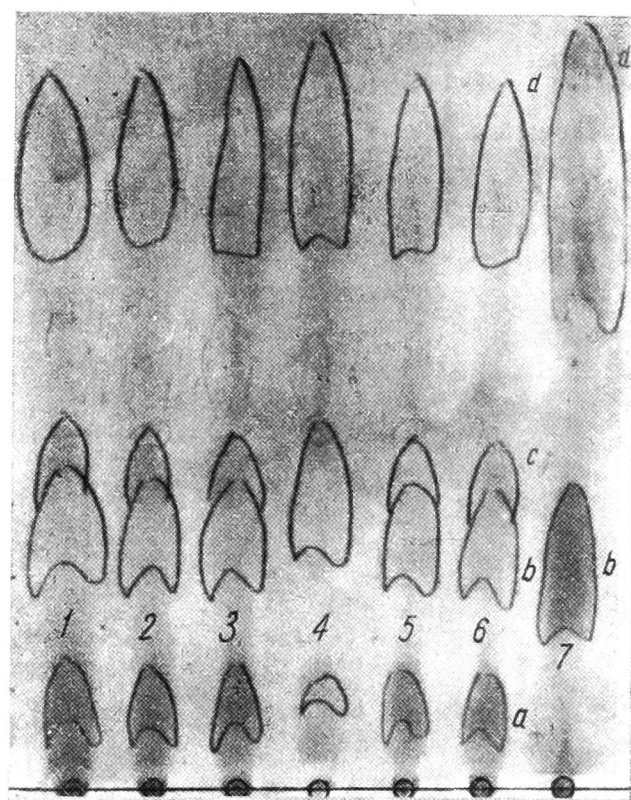
Mocz oznaczony 2h posiada związki redukujące jakich nie widzimy w innych próbkach. Są to INH i hydrazyna. Związki te w ustroju zwierzęcym szybko zostają rozkładane [2] i dlatego nie można ich uwidocznnić po upływie 4 godzin.

Identyfikację pochodnej b , która okazała się kwasem izonikotynowym oparto na dwóch rodzajach doświadczeń. W pierwszym identyfikację przeprowadzono wg Wenzla, który stwierdził, że surowica krwi inkubowana z INH rozkłada go na kwas izonikotynowy o ile zachowane będą pewne warunki. Na chromatogramy z próbkami moczu nakroplono dla porów-

nania przesącz uzyskany z odbiałzonej jałowej surowicy bydlecej inkubowanej przez 3 godziny w 37° C z 1% roztworem INH w stosunku 2:1. Wyniki ilustruje ryc. 4. Przykładem drugiego sposobu identyfikacji przez porównanie z syntetycznym kwasem izonikotynowym jest ryc. 5.

W podobny sposób zidentyfikowaliśmy INH i jego pochodną acetylową. Izonikotynoiloglicynę zidentyfikowano w sposób następujący: po rozwinięciu i wysuszeniu chromatogramu, wycięto krążki bibuły z miejsc, gdzie znajdowała się nieznana pochodna, bibułę eluowano, eluat zagęszczony hydrolizowano 5N kwasem solnym [15] przez 5 godzin. Hydrolizat zobojętniony bezwodnym węglanem sodu nanoszono na bibułę. Jeden z chro-

Ryc. 4. Chromatogram identyfikacyjny kwasu izonikotynowego. Chromatogram moczu zwierząt, którym podano INH, oraz surowicy inkubowanej z INH. Mocz i odbiałzony przesącz rozwijano dwukrotnie w układzie n-butanol nasycyony stężonym amoniakiem. Wywoływano bromocyjanem i benzydynam. Próbkę przedstawiają — 1, 2, 3, 5 i 6 mocz zwierzęcia, które otrzymało INH: 4 — nakropione roztwory: INH, pochodnej acetylowej INH oraz nieco moczu zwierzęcia, które otrzymało INH. 7 — odbiałzona surowica, którą uprzednio inkubowano z INH. Na ryc. widoczne są metabolity: a — izonikotynoiloglicyna; b — kwas izonikotynowy; c — acetylowa pochodna INH; d — INH.



matogramów zawierający jako próbkę kontrolną kwas izonikotynowy wywołano bromocyjanem i benzydynam, drugi jako próbkę kontrolną zawierał glicynę i ten wywołano przy użyciu 0,1% ninhydryny w roztworze acetonowym. Wykrycie na chromatogramach glicyny i kwasu izonikotynowego pozwala stwierdzić, że substancją eluowaną jest izonikotynoiloglicyna.

Metabolity wywoływane na chromatogramach dają następujące reakcje barwne:

Acetylopochodna INH — zabarwienie żółte

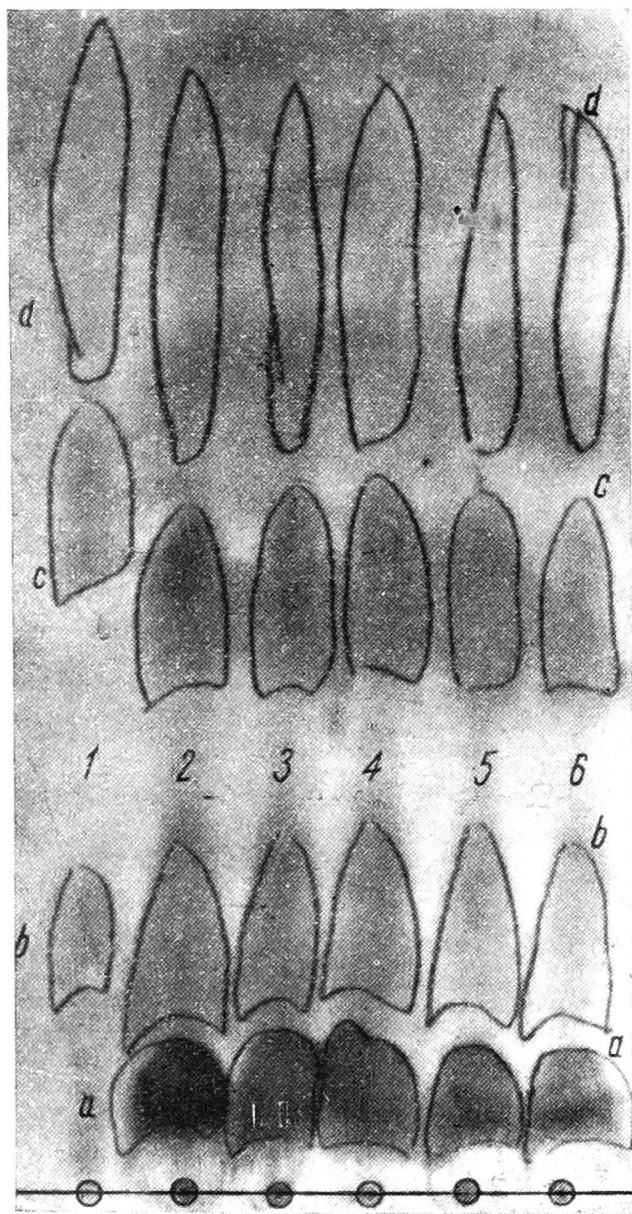
INH — jasno-brązowe

Kwas izonikotynowy — ciemno-niebieskie

Izonikotynoiloglicyna — różowo-fioletowo

Wiadomo, że kwas nikotynowy w różnych układach chromatograficznych na podobne Rf., jak kwas izonikotynowy, lecz różni się zabarwie-

niem. Aby przekonać się jakie zabarwienie ma kwas wywołany z naszego układu i czy nie występuje obok izonikotynowego, sporządzono chromatogram czystych substancji obu kwasów i porównano z kwasem izonikotynowym w moczu zwierzęcia, które otrzymało INH. Wyniki ilustruje ryc. 6.



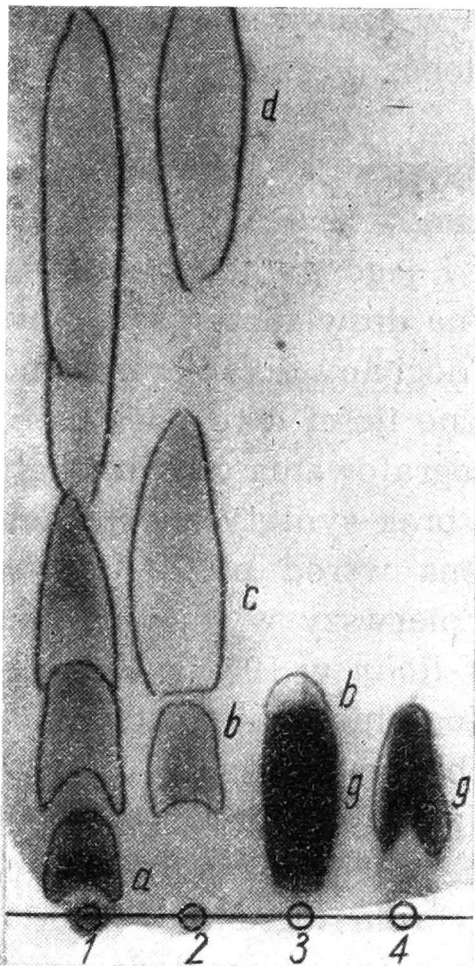
Ryc. 5. Porównanie rozdziału moczu naturalnego z INH i moczu naturalnego wzbogaconego metabolitami INH uzyskanymi syntetycznie. Chromatogram moczu szczura rozwijano trzykrotnie w układzie n-butanol nasycony 1,5N amoniakiem, wywołany benzydyną i bromocyjanem. Chromatogram miał na celu ostateczne zidentyfikowanie kwasu izonikotynowego. Próbkę przedstawiają: 1 — mocz kontrolny do którego dodano INH, pochodnej acetylowej INH, oraz syntetyczny kwas izonikotynowy; 2, 3, 4, 5, 6 — przedstawiają metabolity INH w moczu: a — izonikotynoiloglicynę; b — kwas izonikotynowy; c — pochodną acetylową INH¹; d — INH. Na ryc. widzimy, że substancje syntetyczne mają nieco większe Rf.

Na podstawie chromatografii wykazano, że kwas nikotynowy ma charakterystyczne czerwone zabarwienie i może być na podstawie samej barwy łatwo odróżniony od izozwiązku. A więc, gdyby kwas nikotynowy występował łącznie z izonikotynowym, to po rechromatografii mógłby być w naszym przypadku uwidoczniiony. W naszych doświadczeniach kwas izonikotynowy jest jednym z głównych metabolitów w organizmie szczura. Ciekawe było wyjaśnienie, czy podanie zwierzęciu znacznie większych ilości

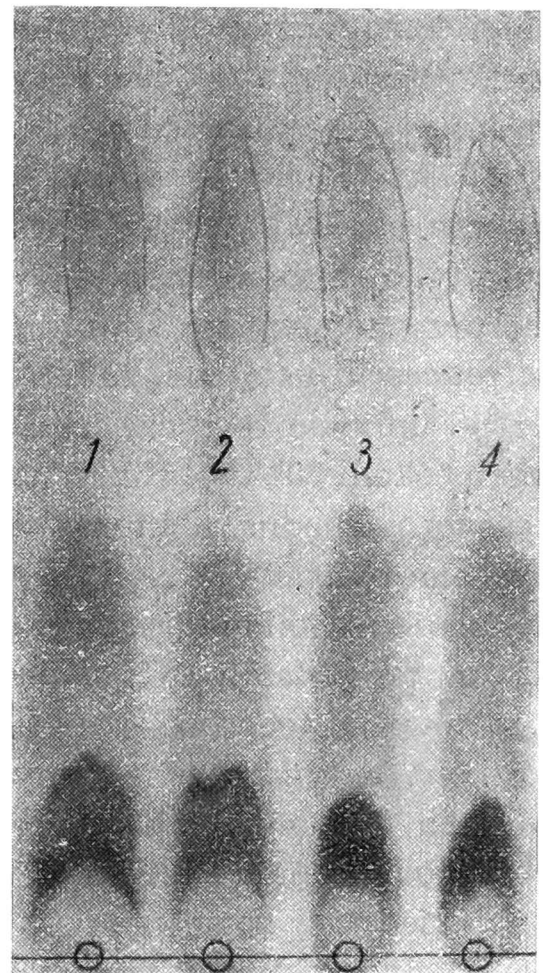
¹ Acetylową pochodną INH otrzymano z Pracowni Syntezy Leków Instytutu Gruźlicy w Warszawie.

² Kwas izonikotynowy otrzymano z firmy „Motor” w Warszawie.

tego metabolitu, po uprzednim podaniu INH może spowodować zmianę drogi metabolizowania leku. Celem przekonania się o tym, podano kontrolnej grupie szczurów INH w normalnej dawce, a drugiej grupie szczurów, prócz dawki INH podano dodatkowo 25 mg/kg kwasu izonikotyno-



Ryc. 6.



Ryc. 7.

Ryc. 6. Uwidocznianie kwasu nikotynowego i izonikotynowego występujących pojedynczo i łącznie. Chromatogram zawierający metabolity naturalne i syntetyczne INH, rozwijano trzykrotnie w układzie n-butanol nasycony stężonym amoniakiem wywoływany jak w przypadku ryc. 5. Poszczególne próbki przedstawiają: 1 — mocz zwierzęcia, które otrzymało INH; 2 — mieszanina INH, pochodnej acetylowej INH; przesączu surowicy inkubowanej z INH; 3 — syntetyczny kwas nikotynowy i izonikotynowy nakroplono łącznie; 4 — mocz kontrolny szczura z dodatkiem kwasu izonikotynowego. Oznaczenia metabolitów jak w innych chromatogramach, a — oznacza kwas nikotynowy.

Ryc. 7. Wpływ kwasu izonikotynowego na metabolizowanie INH. Chromatogram moczu rozwijany trzykrotnie w układzie n-butanol nasycony 1,5N amoniakiem. Próbkę przedstawiają: 1, 2 — mocz zwierząt, którym podano sam INH, 3, 4 — mocz zwierząt, którym podano dodatkowo kwas izonikotynowy.

wego. W wyniku doświadczenia nie stwierdzono w czasie 4 godzin od chwili podania leku wystąpienia nowych pochodnych INH, stwierdzono natomiast w porównaniu z warunkami kontrolnymi szybszą zmianę INH na pochodną acetylową, oraz pojawienie się większych ilości izonikotynoiloglicyny (ryc. 7).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Stosując n-butanol nasycony roztworami amoniaku o różnym stężeniu, otrzymano wyraźny rozdział pochodnej acetylowej od reszty metabolitów INH. Próby z innymi układami nie dały pomyślnych rezultatów. Z kolei ważnym zagadnieniem w ostatecznym wywoływaniu chromatogramów po nasyceniu ich bromocyjanem, jest dobór do tego celu odpowiedniej aminy pierwszorzędowej.

Kodiček i *Reddi* wywołują chromatogramy stosując jako aminę PAB. Podobnie jak *Cuthbertson* i wsp. stwierdziliśmy, że PAB daje wyraźną barwę tylko z kwasem nikotynowym. INH i jego pochodne barwią się słabo przy pomocy tej aminy. Opierając się na doświadczeniach *Zamboni* i *Defranceschi* ustalono, że czas 4 godz. jest dogodny do zbierania moczu, gdyż po upływie tego czasu mamy już znaczne ilości leku poza ustrojem szczura (około 80% — 16). W czasie chromatografowania otrzymywaliśmy okresowo pochodną e, której ze względu na brak syntetycznych metabolitów nie byliśmy w stanie określić, nie ma wśród niej z pewnością N-N-izonikotynoilohydrazyny, którą po raz pierwszy wykazali w moczu ludzkim, po podaniu INH, *Kimming* i *Meyer-Rohn* w 1954 r. Ze względu na stosowaną technikę rozwijania chromatogramów nie podajemy Rf. związków, a tylko zaznaczamy kolejność ich występowania.

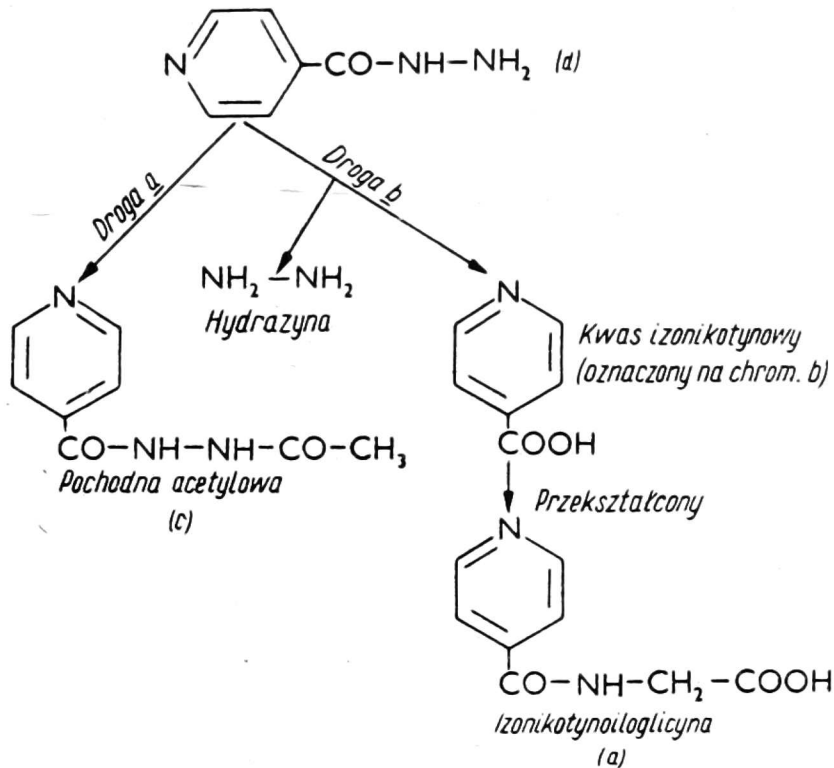
Metoda wywoływania samego INH amoniakalnym roztworem azotanu srebra podana przez *El. Masri* i wsp. w 1958 r. [7] okazała się nie przydatna, kiedy ją stosowano po rozwinięciu chromatogramów z układów amoniakalnych. W związku z tym opracowano własną metodę wywoływania, ale opartą na tej samej zasadzie. Na podstawie oznaczonych metabolitów, stwierdzamy dwie zasadnicze drogi metabolizowania leku: a i b (ryc. 8).

Być może zidentyfikowanie pochodnej e wykazałoby jeszcze inną drogę. Stwierdzone przez drogi metabolizowania leku wydają się być zasadniczymi, gdyż pochodna acetylowa i kwas izonikotynowy są najwybitniej reprezentowanymi metabolitami.

Stosując układy alkaliczne nie widzimy hydrazyny na chromatogramach, gdyż jest ona nie trwała w środowisku alkalicznym, dlatego w celu jej uwidocznienia chromatografowano mocz w układzie: izopropanol — kwas mrówkowy — woda. (80:10:10), wg danych niektórych autorów hydrazyna w środowisku słabo kwaśnym jonizuje na NH-NH_3^+ , a dodatni ładunek chroni ją przed rozpadem na amoniak.

O interesującej drodze rozpadu hydrazyny pisał *Cedrangolo*. Z powodu małej specyficzności testów na hydrazynę srebrowego i Ehrlicha wywoływano chromatogramy dodatkowo przy pomocy chlorku pikrylu, test ten daje pewność, że mamy do czynienia z hydrazyną. W niniejszej pracy

o ilości występującego metabolitu sędziliśmy na podstawie wielkości plamy oraz intensywności jej zabarwienia. Mimo wykonania około 120 chroma-



Ryc. 8. Drogi metabolizowania INH w organizmie szczura białego.

togramów nie otrzymaliśmy, jak badacze włoscy, 9 różnych metabolitów, a wykrywano ustawicznie 4 pochodne z okresowym pojawianiem się 5 niezidentyfikowanej e.

*
* *

Paniom: Elżbiecie Baliszewskiej i Marii Paś pragniemy złożyć podziękowanie za pomoc techniczną przy wykonywaniu niniejszej pracy.

K. Obойска

ОБМЕН ГИДРАЗИДА ИЗОНИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ОРГАНИЗМЕ ЖИВОТНЫХ

Содержание

Автор разработала метод препарирования мочи белой крысы и условия идентификации в этой моче метаболитов гидразида изоникотиновой кислоты (ГИНК). Уточнено хроматографическое распределение для четкого разделения метаболитов ГИНК, а в особенности его ацетиловой производной. Разработана методика проявления хроматограммов, применяя кроме общепризнанных собственные методы проявления ГИНК, его ацетиловой производной и гидразина. В концентрированной моче крыс, которым вводили ГИНК, обнаруживались: ацетиловая производная ГИНК, гидразин, изоникотиновая кислота изоникотиноилоглицин и неизмененный ГИНК.

K. Obojska

ISONICOTINIC ACID HYDRAZIDE METABOLISM IN ANIMAL ORGANISM

Summary

Methods of preparing urine of white rats have been devised and conditions for identifying in it INH metabolites, determined. Systems for accurate chromatographic separation of particular INH metabolites, especially its acetyl derivative, have been compiled. Methods of developing chromatograms have been laid down, and an own method added for demonstrating INH, its acetyl derivative, and hydrazine. In the concentrated urine from rats treated beforehand with INH the following metabolites have been demonstrated: INH acetyl derivative, hydrazine, isonicotinic acid, isonicotinoilglycine, and unchanged INH.

PIŚMIENICTWO

1. Bauer K.: Analiz Organiczeskich Sojedineniji. Moskwa 1953, Gł. 9, 191.
2. Cedrangolo F.: La Petizione Dell Enzymologia nella Biologia e nella Medicina d'oggi Enzimi in Medicina. Simposia Internationale. Milano 1958, 1.
3. Cuthbertson W. F. J., Ireland D. M.: Biochem. J., 1952, 34, 52.
4. Cuthbertson W. F. J., Ireland D. M., Wolf I. W.: Biochem. J. 1953, 55, 4, 669.
5. Deeb E. N.: Drug Standarts, 1954, 22, 194.
6. Deeb E. N., Vitagliano G. R. J.: Am. Pharm. Assoc., 1955, 44, 182.
7. El. Masri A. M., Smith J. N., Williams R. T.: Biochem. J., 1958, 68, 4, 587.
8. Huebner Ch. F.: Nature, 1951, 167, 4238, 119.
9. Jakimowska K.: Przemiana INH, PAS i T-40 w ustroju zwierzęcym. Post. Biochem., 1958, 4, 4, 471.
10. Kimmig J., Meyer-Rohn J.: Jahresbericht Borstel 1956/7, 349.
11. Kodiček E., Reddi R. K.: Nature 1951, 168, 4272, 475.
12. König W.: J. Prakt. Chemie, 1904, 69, 105, 70, 19.
13. Stempekl A., Zelanskas J., Aeschlimann F.: Org. Chemie, 1955, 20, 412.
14. Wenzel M.: Naturwiss, 1955, 42, 370.
15. Defranceschi A., Zamboni V.: Biochim., Biophys. Acta, 1954, 13, 304.
16. Zamboni V., Defranceschi A.: Arch. Phizjol, 1955, 10, 184.

Otrzymano: 3. 12. 1959.