

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ИЗОЛИРОВАНИЯ ЭФАВИРЕНЗА ИЗ МОЧИ

© Тютрина В.А.¹, Чмелевская Н.В.², Илларионова Е.А.¹¹ Иркутский государственный медицинский университет (ИГМУ)

Россия, 664003, Иркутская область, г. Иркутск, ул. Красного восстания, д. 1

² Иркутское областное бюро судебно-медицинской экспертизы (ИОБСМЭ)

Россия, 664022, Иркутская область, г. Иркутск, бульвар Гагарина, д. 4

Цель исследования – изучить влияние различных факторов на экстрагирование эфавиренза из растворов и разработать методику его изолирования из мочи, обнаружения и количественного определения.

Материалы и методы. Анализу подвергались отвечающие требованиям нормативных документов фармацевтическая субстанция-порошок и таблетки эфавиренза. Для разработки методики изолирования эфавиренза из биологических объектов использовали методы жидкость-жидкостной экстракции и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Результаты экспериментальных исследований статистически обработаны с применением пакета программ для Windows XP (Microsoft Excel), и с использованием t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при доверительной вероятности $p < 0,05$.

Результаты. С целью оптимизации методики были изучены условия, при которых достигается наибольший выход эфавиренза: органические растворители – эфир диэтиловый, дихлорметан; значение pH – для эфира диэтилового pH=3, для дихлорметана pH=2; электролит, проявляющий высаливающее действие – натрия хлорида раствор 20% (при изолировании эфиром диэтиловым), натрия хлорида насыщенный раствор (при изолировании дихлорметаном); кратность экстракции – трехкратное экстрагирование; время экстракции – в течение трех минут эфиром диэтиловым и в течение семи минут дихлорметаном.

Заключение. Полученные результаты подтверждают пригодность методики, следовательно, она может быть рекомендована для химико-токсикологического и судебно-химического анализа исследуемого лекарственного вещества.

Ключевые слова: судебно-химический анализ, химико-токсикологический анализ, изолирование, эфавиренз, количественное определение, обнаружение.

Тютрина Вера Александровна – аспирант кафедры фармацевтической и токсикологической химии, ИГМУ, г. Иркутск. E-mail: ultr4vox@yandex.ru (автор, ответственный за переписку)

Чмелевская Наталья Владимировна – канд. фарм. наук, зав. судебно-химическим отделением, ИОБСМЭ, г. Иркутск

Илларионова Елена Анатольевна – д-р. хим. наук, профессор, зав. кафедрой фармацевтической и токсикологической химии, ИГМУ, г. Иркутск. E-mail: illelena24@rambler.ru

В настоящее время в мире существует напряженная ситуация по распространению ВИЧ-инфекции. Эфавиренз – один из наиболее часто используемых антиретровирусных препаратов [5, 8]. Резистентность к антиретровирусным препаратам вируса иммунодефицита человека связана с его высокой мутагенностью, позволяющей видоизменять РНК и производить устойчивые к их действию штаммы. Поэтому для воздействия на различные стадии развития вируса и предотвращения возникновения устойчивости высокоактивная антиретровирусная терапия основывается на комбинации 3-4 лекарственных средств с различными механизмами действия [3].

Так как эфавиренз назначается в комплексной терапии с несколькими антиретровирусными препаратами и препаратами других фармакологических групп длительное время, появляется опасность возникновения острых отравлений. Кроме того, одним из главных побочных эффектов является его тяжелое действие на центральную нервную систему [6], что может привести к ошибочному приему дозировки, пре-

вышающей требуемую, а также к намеренному приему более высокой дозы с суицидальной целью.

Проведенный анализ литературы и нормативных документов по контролю качества эфавиренза [4, 7, 9, 10] показал, что рекомендованным методом количественного определения исследуемого лекарственного средства является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Несмотря на то, что эфавиренз широко применяется в комплексной антиретровирусной терапии, исследование литературы показало, что в ней отсутствуют данные о его химико-токсикологическом исследовании. Это означает, что разработка методики изолирования из объектов биологического происхождения, обнаружения и количественного определения эфавиренза является важной задачей.

Цель исследования – изучить влияние различных факторов на степень экстракции эфавиренза из растворов и разработать методику его изолирования из мочи, обнаружения и количественного определения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Аналізу подвергались отвечающие требованиям нормативных документов фармацевтическая субстанция-порошок и таблетки эфавиренза. Применяемые реактивы: вода очищенная, спирт 95%, хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М (приготовлен из фиксаля) и натрия гидроксида раствор 0,1 М (приготовлен из фиксаля). Показатель величины pH контролировался универсальным ионометром ИТ-1101 (ООО «Измерительная техника», г. Москва). Результаты экспериментальных исследований статистически обработаны с применением пакета программ для Windows XP (Microsoft Excel) и использованием t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при доверительной вероятности $p < 0,05$ [2].

Условия экстракции эфавиренза из модельного образца мочи: 25 мл мочи, содержащей раствор таблеток эфавиренза в спирте 95%, настаивается при комнатной температуре в колбе вместимостью 100 мл в течение 24 часов и периодическом взбалтывании на приборе Шейкер S-3.08L (фирмы ELMi). 1 мл (для 0,2 г вещества) или 0,5 мл (для 1,0 и 2,0 г вещества) модельного образца мочи помещается в пробирку, pH среды доводится до pH=3 или pH=2 хлористоводородной кислоты раствором 0,1 М, соответственно, натрия хлорида раствор 20%/натрия хлорида насыщенного раствор 1 мл и эфир диэтиловый/дихлорметан 3 мл. Содержимое пробирки помещается в делительную воронку и взбалтывается в течение 3 мин/7 мин. Экстракция проводится трижды по 3 мл эфиром диэтиловым/дихлорметаном. Слой экстрагента отделяется после разделения фаз, извлечения объединяются. Растворители удаляются при комнатной температуре. Полученный после испарения экстрагента сухой остаток растворяется в 10 мл спирта 95% и доводится до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл этим же растворителем. Аликвотная часть полученного раствора 2 мл (для 0,2 г вещества) или 1 мл (для 1,0 г и 2,0 г вещества) переносится в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводится до объема 100 мл натрия гидроксида раствором 0,1 М. Степень экстракции эфавиренза определяется методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на отечественном хроматографе «Милихром А-02». Использовался обращенно-фазный вариант хроматографии на колонке 75x2 мм, ProntoSIL-120-5-C18 AQ, подвижная фаза – элюент А – 0,2 М лития перхлорат – хлорной кислоты раствор 0,005 М (pH 2,8), элюент Б – MeCN, длина волны – 210 нм, скорость потока – 100 мкл/мин, объем пробы – 2 мкл, температура

тура термостата колонки – 40°C, градиент – 3700 мкл 5% – 70% Б.

Приготовление раствора РСО эфавиренза: точная масса субстанции эфавиренза (около 0,0500 г) помещается в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяется в 80 мл метанола, доводится объем раствора до метки, перемешивается. Полученный раствор вводится в колонку в объеме 2 мкл.

Для разработки методики изолирования эфавиренза из биологических объектов использовали метод жидкость-жидкостной экстракции. Было изучено влияние нескольких факторов на степень экстракции эфавиренза из растворов: природы органического растворителя, pH среды, присутствия электролита, времени и кратности экстракции.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Так как эфавиренз ((4S)-6-хлор-4-(циклопропилэтинил)-1,4-дигидро-4-(трифторметил)-2Н-3,1-бензоксазин-2-он) по химической структуре относится к производным бензоксазина, он обладает слабыми кислотными свойствами и характеризуется гидрофобностью за счет наличия трех атомов фтора и других фрагментов структуры. Изучение растворимости эфавиренза показало, что это лекарственное вещество хорошо растворяется в следующих органических растворителях: хлороформ, дихлорметан, эфир диэтиловый, этилацетат, толуол, бензол, поэтому эти растворители выбраны для изучения процесса экстракции.

В зависимости от pH раствора эфавиренз будет находиться в диссоциированном или молекулярном состоянии, что приведет к увеличению или уменьшению степени экстракции в органический растворитель. pH растворов изменяли от 2 до 12 путем добавления хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М или аммиака раствора 10%.

На рис. 1 представлена графическая зависимость степени извлечения эфавиренза из раствора в зависимости от природы органического растворителя и pH среды.

Установлено, что наибольшую извлекающую способность проявили эфир диэтиловый и дихлорметан, которые экстрагируют в максимальном количестве эфавиренз при pH 3 и 2 соответственно. Степень извлечения эфавиренза из растворов составляет $81,3 \pm 0,53\%$ эфиром диэтиловым при pH 3 и $80,8 \pm 0,43\%$ дихлорметаном при pH 2.

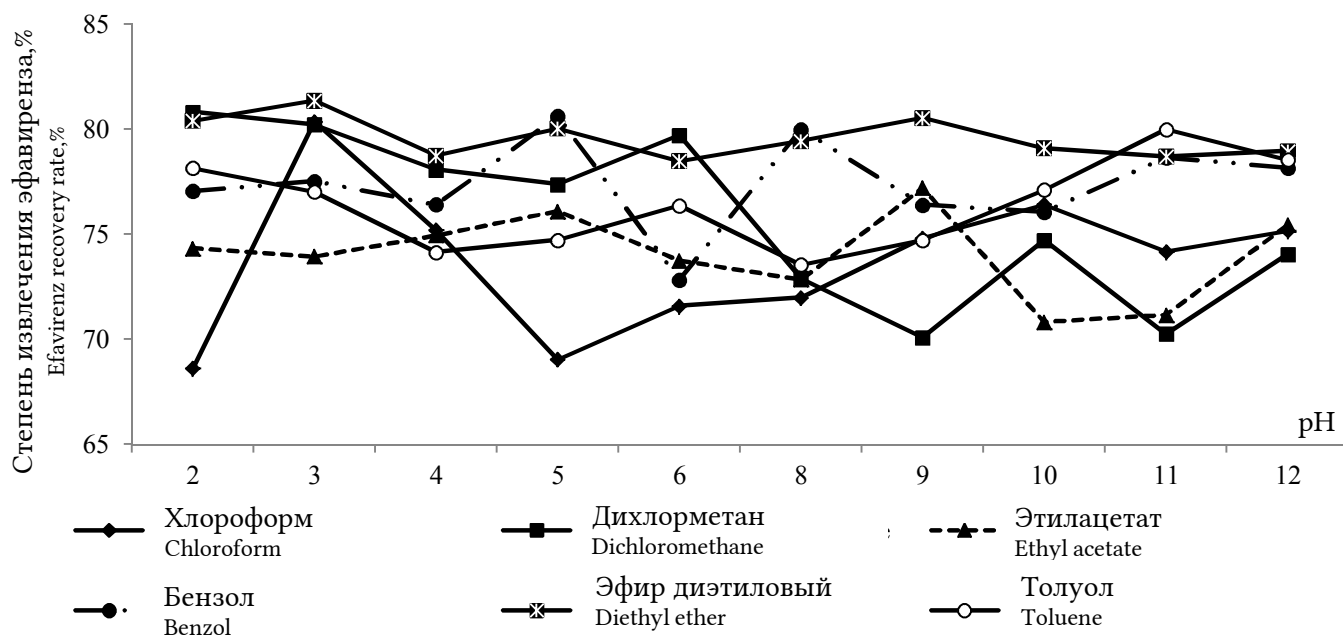


Рис. 1. График зависимости степени извлечения эфавиренза из растворов от органического растворителя и pH среды.

Fig.1. Graph of the degree of extraction of Efavirenz from solutions of an organic solvent and pH.

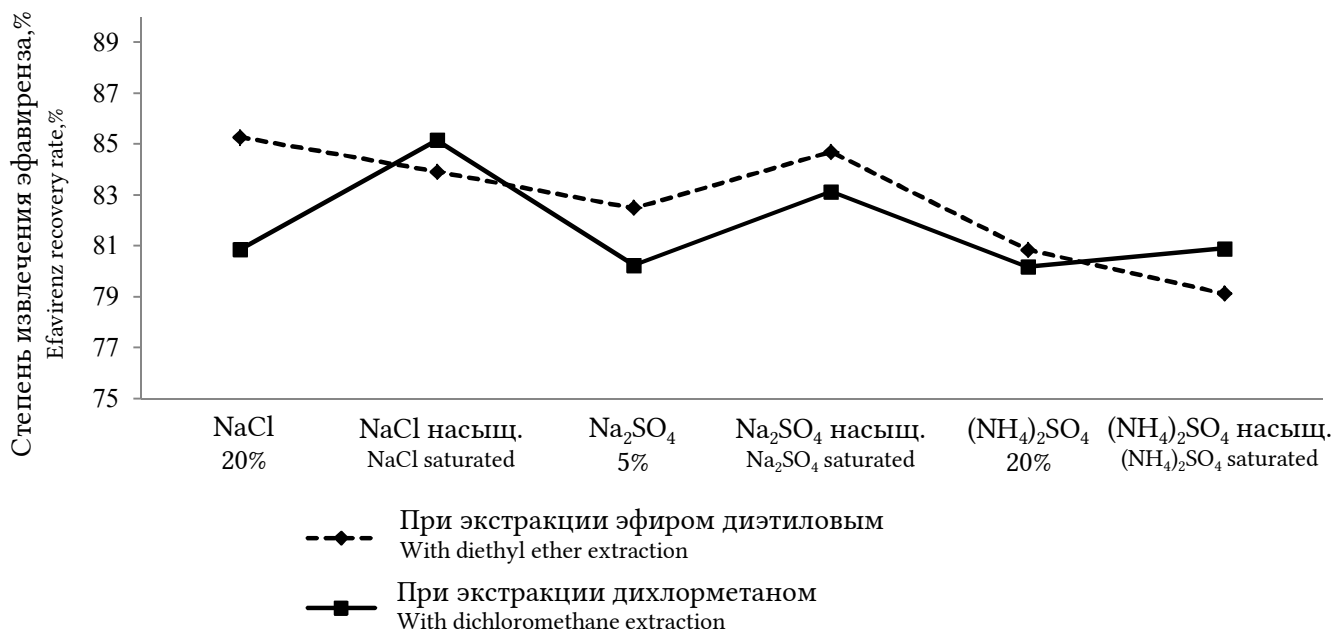


Рис. 2. График зависимости степени извлечения эфавиренза из растворов от добавляемого электролита.

Fig. 2. Graph of the degree of extraction of Efavirenz from solutions of the added electrolyte.

Следующим этапом экспериментальных исследований являлось изучение влияния электролита на степень извлечения эфавиренза из растворов (рис. 2).

Согласно полученным данным установлено, что добавление натрия хлорида раствора 20% приводит к повышению количества извлекаемого вещества при применении эфира диэтилового до $85,27 \pm 0,32\%$. Натрия хлорида насыщенный раствор улучшает экстрагируемость эфавиренза при применении в качестве органическо-

го растворителя дихлорметана до $85,16 \pm 0,26\%$. Аммония сульфата насыщенный раствор проявил высаливающее действие в случае экстракции эфиром диэтиловым, а при экстракции дихлорметаном высаливателем является аммония сульфата раствор 20%.

Дальнейшим этапом в разработке методики стало определение влияния на степень извлечения эфавиренза из растворов времени и кратности экстрагирования (табл. 1, 2).

Таблица 1
Table 1

Результаты определения степени извлечения эфавиренза из растворов
в зависимости от времени экстракции эфиром диэтиловым и дихлорметаном

The results of determining the degree of extraction of Efavirenz from solutions,
depending on the time of extraction with ether, diethyl and dichloromethane

Время, мин Time, min	Степень извлечения эфиром диэтиловым, % The degree of extraction of ether diethyl, %	Степень извлечения дихлорметаном, % The degree of extraction with dichloromethane, %
3	85.27±0.32	85.16±0.26
5	84.83±0.13	86.86±0.12
7	85.90±0.71	88.21±0.14

Таблица 2
Table 2

Результаты определения степени извлечения эфавиренза из растворов в зависимости от кратности
экстракции эфиром диэтиловым в течение трех минут и дихлорметаном в течение семи минут

The results of determining the degree of extraction of Efavirenz from solutions, depending on the frequency of extraction with diethyl
ether for three minutes and dichloromethane for seven minutes

Кратность Multiplicity	Степень извлечения эфиром диэтиловым, % The degree of extraction with ether diethyl, %	Степень извлечения дихлорметаном, % The degree of extraction with dichloromethane, %
Однократная Occurring once	85.27±0.32	88.21±0.14
Двукратная Double	88.00±0.11	87.94±0.23
Трехкратная Threefold	89.17±0.18	91.58±0.10

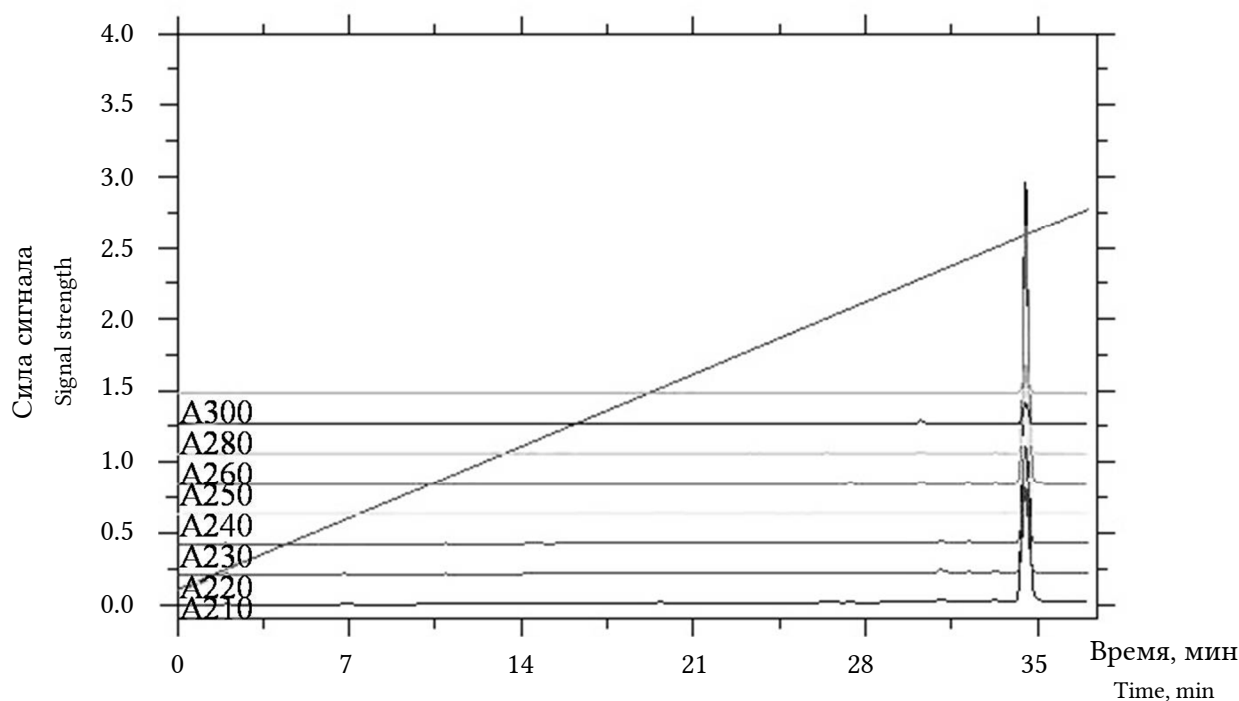


Рис. 3. Хроматограмма стандартного раствора эфавиренза с концентрацией 0,5 мг/мл в метаноле.
Пик 1 – эфавиренз ($T_R = 3449$ мкл).

Fig. 3. Chromatogram of the standard solution of Efavirenz with a concentration of 0.5 mg / ml in methanol. Peak 1 - Efavirenz ($T_R = 3,449$ μ l).

Таблица 3
Table 3Определение степени извлечения эфавиренза эфиром диэтиловым
из модельного образца мочи методом ВЭЖХ

Determination of the degree of extraction of Efavirenz with diethyl ether from a model urine sample by HPLC

Добавлено исследуемого вещества, г Added test substance, g	n	f	\bar{X}	S^2	S	S_x	ΔX	E, %	CV
0.2	6	5	76.35	0.14	0.37	0.15	0.39	0.51	0.49
1.0	6	5	74.59	0.21	0.45	0.19	0.48	0.64	0.60
2.0	6	5	84.46	0.25	0.50	0.20	0.52	0.62	0.59

Примечание: здесь и далее: n – объем выборки, f – число степеней свободы, \bar{X} – среднее значение результата, S^2 – дисперсия, S – стандартное отклонение, S_x – стандартное отклонение среднего результата, ΔX – полуширина доверительного интервала величины, E, % – относительная ошибка среднего результата, CV – коэффициент вариации.

Note: hereafter: n – sample size, f – number of degrees of freedom, \bar{X} – average result, S^2 – dispersion, S – standard deviation, S_x – standard deviation of the average result, ΔX – half-width of the confidence interval of magnitude, E, % – relative error of the average result, CV – coefficient of variation.

Таблица 4
Table 4Определение степени извлечения эфавиренза дихлорметаном
из модельного образца мочи методом ВЭЖХ

Determination of the degree of Efavirenz extraction with dichloromethane from a model urine sample by HPLC

Добавлено исследуемого вещества, г Added test substance, g	n	f	\bar{X}	S^2	S	S_x	ΔX	E, %	CV
0.2	6	5	81.67	0.39	0.62	0.25	0.65	0.80	0.76
1.0	6	5	75.27	0.31	0.56	0.23	0.59	0.78	0.74
2.0	6	5	84.29	0.24	0.49	0.20	0.51	0.60	0.58

Экспериментально доказано, что наилучшие результаты достигнуты при трехкратном экстрагировании эфиром диэтиловым в течение 3 минут и дихлорметаном в течение 7 минут. За этот промежуток времени большинство молекул эфавиренза переходит в органическую фазу, а данное количество ступеней экстракции за счет поступления свежих порций растворителей обеспечивает наибольшую полноту извлечения вещества.

Таким образом, применяя предложенные оптимальные условия экстрагирования, была разработана методика изолирования из модельного образца мочи, обнаружения и количественного определения эфавиренза.

Обнаружение эфавиренза проводили методом ВЭЖХ по времени удерживания, которое соответствует 34,49 мин (рис. 3).

Полученные данные определения степени изолирования исследуемого вещества из модельного образца мочи представлены в таблицах 3 и 4.

Как свидетельствуют полученные данные, определено, что из модельного образца мочи при экстракции эфиром диэтиловым изолируется от 73,94% до 85,21% эфавиренза и от 74,45% до 84,94% при извлечении дихлорметаном.

Валидационная оценка методики, проведенная по показателям прецизионности и правильности [1], доказала пригодность разработанной методики для анализа.

Таким образом, было изучено влияние различных факторов на извлечение эфавиренза из растворов методом жидкость-жидкостной экстракции (органический растворитель, pH среды, электролит, время и кратность). Разработана методика изолирования, обнаружения и количественного определения эфавиренза из модельного образца мочи методом жидкость-жидкостной экстракции и ВЭЖХ. Проведен валидационный анализ предложенной методики. Полученные результаты подтверждают ее пригодность для анализа, следовательно, разработанная методика позволяет получить достаточно надежные и воспроизводимые результаты для предполагаемой области применения и может быть рекомендована для химикотоксикологического и судебно-химического анализа.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации [11] и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава России от 19.06.2003 № 266 и одобрено этическим комитетом ИГМУ. До включения в исследование все здоровые добровольцы подписали информированное согласие установленной формы (протокол № 2 от 17.09.2018 г.).

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Барсегян С.С., Саломатин Е.М., Плетенева Т.В., Максимова Т.В., Долинкин А.О. *Методические рекомендации по валидации аналитических методов, используемых в судебно-химическом и токсикологическом анализе биологического материала*. Москва: Российский центр судебно-медицинской экспертизы, 2014. 52 с. [Barsegyan S.S., Salomatin E.M., Pleteneva T.V., Maksimova T.V., Dolinkin A.O. *Guidelines for validation of analytical techniques used in forensic chemical and chemical Toxicological analysis of biological material*. Moscow: Russian center of forensic medical examination, 2014. 52 p. (in Russ.)].
2. *Государственная фармакопея Российской Федерации*. XIII издание. Т. 1. Москва: Федеральная электронная медицинская библиотека, 2015. 1469 с. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIII edition. Vol.1. Moscow: Federal electronic medical library, 2015. 1469 p. (in Russ.)].
3. Еременко Н.Н., Губенко А.И., Зебрев А.И., Лысикова И.В. Современные подходы в лечении ВИЧ-инфицированных больных. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2014;2:40-45 [Eremenko N.N., Gubenko A.I., Zebrev A.I., Lysikova I.V. Modern approaches to the treatment of HIV-positive patients. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya*. 2014;2:40-45 (in Russ.)].
4. *Нормативный документ ФС 000520-260313. Эфавиренз*. Москва, 2013. 15 с. [Normative document FS 000520-260313. *Efavirenz*. Moscow, 2013. 15 p. (in Russ.)].
5. Прокофьева М.М., Кочетков С.Н., Прасолов В.С. Терапия ВИЧ-инфекции: методы и перспективы. *Acta Naturae (Русскоязычная версия)*. 2016; 8(4-31):26-36. [Prokofjeva M.M., Kochetkov S.N., Prassolov V.S. Therapy of HIV Infection: Current Approaches and Prospects. *Acta Naturae (English version)*. 2016; 8(4): 23-32]
6. Юрин О.Г., Ефремова О.С. Европейские и американские рекомендации по лечению ВИЧ-инфекции. *Медицинский совет*. 2017; 4:67-72. [Yurin O.G., Efremova O.S. The European and American guidelines for treatment of HIV infection. *Meditsinsky sovet*. 2017; 4:67-72 (in Russ.)] DOI: 10.21518/2079-701X-2017-4-67-72.
7. Danilo C.G. Bedor, Jose H. de Souza Filho, Virna L.S. Ramos, Talita M. Gonçalves, Carlos E.M. de Sousa, Davi P. de Santana. A sensitive and robust Lc-MS/MS method with monolithic column and electrospray ionization for the quantitation of efavirenz in human plasma: Application to a bioequivalence study. *Química Nova*. 2011; 34(6):950-955 DOI: 10.1590/S0100-40422011000600007.
8. De Clercq E. Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs): Past, Present, and Future. *Chem Biodivers*. 2004; 1(1):44-64. DOI: 10.1002/cbdv.200490012.
9. Hamrapurkar P., Phale M., Shah N. Quantitative Estimation of Efavirenz by High Performance Thin Layer Chromatography. *Journal of Young Pharmacists*. 2009; 1(4): 359-363. DOI: 10.4103/0975-1483.59328.
10. Srivastava P., Moorthy G.S., Gross R., Barrett J.S. Sensitive and Selective Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Method for Quantitative Analysis of Efavirenz in Human Plasma. *PLoS One*. 2013; 8(6):e63305. DOI: 10.1371/journal.pone.0063305.
11. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. 2013; 310(20):2191-2194. DOI: 10.1001/jama.2013.281053.

Поступила в редакцию 20.03.2019

Подписана в печать 20.06.2019

Для цитирования: Тютрина В.А., Чмелевская Н.В., Илларионова Е.А. Разработка методики изолирования эфавиренза из мочи. *Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье»*. 2019;(2):95–101. DOI: 10.21626/vestnik/2019-2/11.

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR ISOLATING EFVIRENZ FROM A MODEL URINE MIXTURE

© Tyutrina V.A.¹, Chmelevskaya N.V.², Illarionova E.A.¹

¹ Irkutsk State Medical University (ISMU)

1, Krasnogo Vosstaniya St., Irkutsk, Irkutsk Region, 664003, Russian Federation

² Irkutsk Regional Bureau of Forensic Medical Expertise (IRBFME)

4, Gagarin Boulevard, Irkutsk, Irkutsk Region, 664022, Russian Federation

Objective: to study the effect of various factors on the extraction of Efavirenz from solutions and to develop a method for its isolation, detection and quantification from urine.

Materials and methods. Pharmaceutical substance-powder and Efavirenz tablets, which meet the requirements of regulatory documents, were analyzed. To develop a method for isolating Efavirenz from biological objects, liquid-liquid extraction and high-performance liquid chromatography (HPLC) were used. The results of experimental studies are statistically processed using the software package for Windows XP (Microsoft Excel) using Student's t-test. Differences were considered significant at a confidence level of $p < 0.05$.

Results. In order to optimize the methods, the conditions under which the highest yield of Efavirenz is achieved are studied: organic solvents – diethyl ether, dichloromethane; pH value – for diethyl ether pH = 3, for dichloromethane pH = 2; the electrolyte exhibiting a salting out effect is a sodium chloride solution of 20% (when isolated with diethyl ether), sodium chloride is a saturated solution (when isolated with dichloromethane); the multiplicity of extraction – triple extraction; extraction time – for three minutes with diethyl ether and for seven minutes with dichloromethane.

Conclusion. The obtained results confirm method suitability, therefore, the technique can be recommended for chemical-toxicological and forensic-chemical analysis of the studied medicinal substance.

Key words: forensic chemical analysis, analytical toxicology, sample preparation, Efavirenz, quantitation, detection.

Tyutrina Vera A. – Postgraduate Student of Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, ISMU, Irkutsk, Russian Federation. E-mail: ultr4vox@yandex.ru (correspondence author)

Chmelevskaya Natalia V. – PhD in Pharmaceutical Sciences, Head of the Forensic Chemistry Department, IRBFME, Irkutsk, Russian Federation.

Illarionova Elena A. – Doctor in Chemical Sciences, Professor, Head of the Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, ISMU, Irkutsk, Russian Federation. E-mail: illelena24@rambler.ru

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

SOURCE OF FINANCING

The authors state that there is no funding for the study.

CONFORMITY WITH THE PRINCIPLES OF ETHICS

The study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration of the World Medical Association [11] and the "Rules of Clinical Practice in the Russian Federation", approved by Order of the Ministry of Health of Russia of 19.06.2003 № 266 and approved by the Ethical Committee of ISMU. Prior to inclusion in the trial, all healthy volunteers signed an informed consent form (Protocol № 2 of 17.09.2018).

Received 20.03.2019

Accepted 20.06.2019

For citation: Tyutrina V.A., Chmelevskaya N.V., Illarionova E.A. Development of a method for isolating Efavirenz from a model urine mixture. *Kursk Scientific and Practical Bulletin "Man and His Health"*. 2019;(2):95–101. DOI: 10.21626/vestnik/2019-2/11.