УДК 615.07:535.243 **DOI: 10.21626/vestnik/2021-1/08**

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ИЗОЛИРОВАНИЯ СТАВУДИНА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ

© Бородина Д.А., Гончикова Ю.А., Илларионова Е.А., Митина А.Э.

Иркутский государственный медицинский университет (ИГМУ)
Россия, 664003, Иркутская область, г. Иркутск, ул. Красного восстания, 1

Цель – изучение изолирования ставудина из биологических жидкостей (моча, плазма крови).

Материалы и методы. Объекты исследования: субстанция и таблетки ставудина по 30 мг. Реактивы: вода очищенная, хлороформ, этилацетат, дихлорметан, эфир, гептан, толуол, ацетон, спирт этиловый 95%, хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М, аммония гидроксида раствор 10%, растворы натрия сульфата 5%, натрия сульфата насыщенный, натрия хлорида 20%, натрия хлорида насыщенный, аммония сульфата 20%, аммония сульфата насыщенный. Универсальный иономер ИТ-1101. Ставудин изолировали методом жидкость-жидкостной экстракции (ЖЖЭ). Для обнаружения и количественного определения ставудина использовали хроматографию в тонком слое сорбента (ТСХ) и УФ – спектрофотометрию. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ для Windows XP (Microsoft Excel) и с применением t-критерия Стьюдента.

Результаты. При использовании тонкослойной хроматографии для идентификации ставудина было выявлено, что значение R_f пятен извлечений ставудина из биологического материала соответствовало интервалу значений R_f 0,67-0,69. Значение R_f пятна стандартного образца свидетеля ставудина соответствовало (0,68±0,01). Изучение стабильности показало, что раствор ставудина стабилен в хлористоводородной кислоте растворе 0,1 М, в котором спектр поглощения ставудина характеризуется максимумами поглощения при длинах волн 209±1 и 267±1 нм. В качестве аналитической длины волны для количественного определения ставудина выбрана длина волны 267±1 нм. В ходе исследования были изучены различные факторы, влияющие на степень извлечения ставудина из водных растворов. Экстрагент – этилацетат, pH 3, электролит – раствор аммония сульфата насыщенный. Время экстракции – 7 минут, двукратно.

Заключение. Разработаны методики идентификации и количественного определения ставудина в извлечениях из мочи и плазмы крови методами ТСХ и УФ-спектрофотометрии. Разработаны методики изолирования ставудина из мочи и плазмы крови с использованием метода жидкость-жидкостной экстракции (93,33±2,02%; 89,77±2,02% соответственно).

Ключевые слова: ставудин; изолирование; жидкость-жидкостная экстракция; биологические жидкости.

Бородина Дарья Александровна – соискатель кафедры фармацевтической и токсикологической химии, ИГМУ, г. Иркутск. ORCID iD: 0000-0001-6369-8950. E-mail: Dashabor1998@mail.ru

Гончикова Юлия Анатольевна – старший преподаватель кафедры фармацевтической и токсикологической химии, ИГМУ, г. Иркутск. ORCID iD: 0000-0002-2964-3830. E-mail: gonchikova1984@mail.ru

Илларионова Елена Анатольевна – д-р хим. наук, профессор, зав. кафедрой фармацевтической и токсикологической химии, ИГМУ, г. Иркутск. ORCID iD: 0000-0002-3281-9489. E-mail: Illelena24@mail.ru (автор, ответственный за переписку)

Митина Анастасия Эдуардовна – студентка, ИГМУ, г. Иркутск. ORCID iD: 0000-0003-4088-1415. E-mail: nastyamitina98@mail.ru

Ставудин (2',3'-дидегидро-2',3'-дидеокситимидин) – это антиретровирусное лекарственное средство, ингибитор обратной транскриптазы ВИЧ, используется для профилактики и лечения ВИЧ/СПИДа [1, 7, 8, 9, 19]. Ставудин включен ВОЗ в перечень важнейших лекарственных препаратов.

По химической структуре ставудин относится к аналогам тимидина. Растворяется в воде 1:200 с образованием бесцветного коллоидного раствора, а также растворяется в хлороформе, этилацетате, дихлорметане, эфире, гептане.

Структурная формула ставудина представлена на рисунке 1.

Брутто формула ставудина – $C_{10}H_{12}N_2O_4$, молярная масса – 224,213 г/моль.

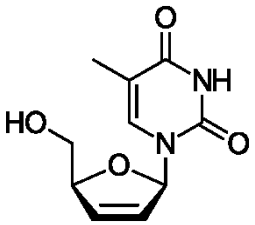

Рис. 1. Структурная формула ставудина.

Fig. 1. Structural formula of Stavudine.

Данное соединение хорошо всасывается при приеме внутрь. В неизменном виде выводится почками около 30% [6, 15, 16, 17, 18].

Ставудин назначается в комплексной терапии длительное время (часто пожизненно), в связи, с чем возникает риск развития острых и хронических отравлений [10, 11, 20, 22, 23]. Одним из наиболее серьезных побочных эффектов ставудина является периферическая невропатия. Острые отравления могут быть связаны с несоблюдением режима дозирования (непреднамеренное отравление), специальным потреблением повышенных доз препарата (преднамеренный суицид), а также отравление может быть генетически обусловлено (генетические отклонения в системе цитохрома P450) [3, 6].

Вопросы, связанные с химико-токсикологическим анализом данного препарата изучены недостаточно.

Цель настоящего исследования – изучение изолирования ставудина из биологических жидкостей (моча, плазма крови).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования являлись субстанция и таблетки ставудина по 30 мг, отвечающие требованиям ФС 42-12774-03, ФС 42-13920-05. Для выбора условий изолирования ставудина из биоматериала методом жидкость-жидкостной экстракции (ЖЖЭ) изучили влияние 6 органических растворителей и 6 электролитов.

Для этого готовили раствор ставудина (0,03 г субстанции растворяли в 1 мл воды), именяли значение pH от 1 до 10, используя хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М и аммония гидроксида раствор 10%. Контроль величины pH осуществляли с помощью универсального иономера ИТ-1101.

В качестве биомоделей использовали мочу и плазму крови здоровых добровольцев. Приготовление биомоделей осуществляли путем добавления раствора таблеток ставудина (0,6, 0,9 и 1,8 г вещества соответственно в 15 мл воды очищенной) к 35 мл мочи или 10 мл плазмы крови соответственно. Выдерживали растворы течение суток при периодическом взбалтывании на приборе Шейкер S-3.08L (фирмы ELMI), после чего 1 мл биообразца доводили до pH 3 хлористоводородной кислоты раствором 0,1 М, вносили 1 мл спирта этилового 75%, 1 мл электролита – аммония сульфата насыщенного. Изолирование проводили этилацетатом дважды по 7 минут.

Объединенные извлечения хроматографировали методом тонкослойной хроматографии (пластинки Сорбфил ПТСХ-АФ-В-УФ, подвижная фаза толуол-ацетон-аммиака раствор концентрированный 25% (50:50:1)) Детекцию пятен проводили путем облучения пластины УФ-светом (длина волны 254 нм).

Идентификацию ставудина в извлечениях осуществляли по УФ-спектру (прибор СФ-2000, толщина слоя 10 мм, растворитель – хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М, диапазон длин волн 220-400 нм).

Количественную оценку ставудина в извлечениях проводили спектрофотометрически (длина волны 267 нм [4], толщина слоя 10 мм, растворитель – хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М, концентрация раствора рабочего стандартного образца (РСО) ставудина 24 мкг/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация ставудина после изолирования методом ТСХ показала, что значение R_f пятен извлечений ставудина из биоматериала соответствовало интервалу значений 0,67-0,69. Значение R_f пятна стандартного образца свидетеля ставудина соответствовало (0,68±0,01).

Для идентификации ставудина методом спектрофотометрии сравнивали УФ-спектры извлечений ставудина из биоматериала с УФ-спектром рабочего стандартного образца (РСО) ставудина. УФ-спектр поглощения РСО ставудина представлен на рис. 2. Видно, что в зависимости от pH среды оптические свойства растворов ставудина не изменяются. Изучение стабильности растворов в течение суток показало, что раствор ставудина стабилен в хлористоводородной кислоты растворе 0,1 М. Характер спектра поглощения и максимумы поглощения ставудина, извлеченного из биоматериала (209 и 267 нм), совпадал с этими же показателями РСО ставудина.

В качестве аналитической длины волны для количественного определения ставудина выбрана длина волны 267±1 нм.

С целью разработки методики изолирования ставудина из биологических жидкостей проводили ЖЖЭ с учетом влияния различных факторов [5, 6, 12, 13, 21]. Было изучено изолирование ставудина хлороформом, этилацетатом, дихлорметаном, эфиром, гептаном при pH от 1 до 10. Результаты влияния различных экстрагентов и pH среды на полноту экстракции ставудина графически представлены на рисунке 3.

Экспериментально установлено, что наибольшей изолирующей способностью обладает этилацетат при значении pH 3, степень извлечения составляет 50,4%.

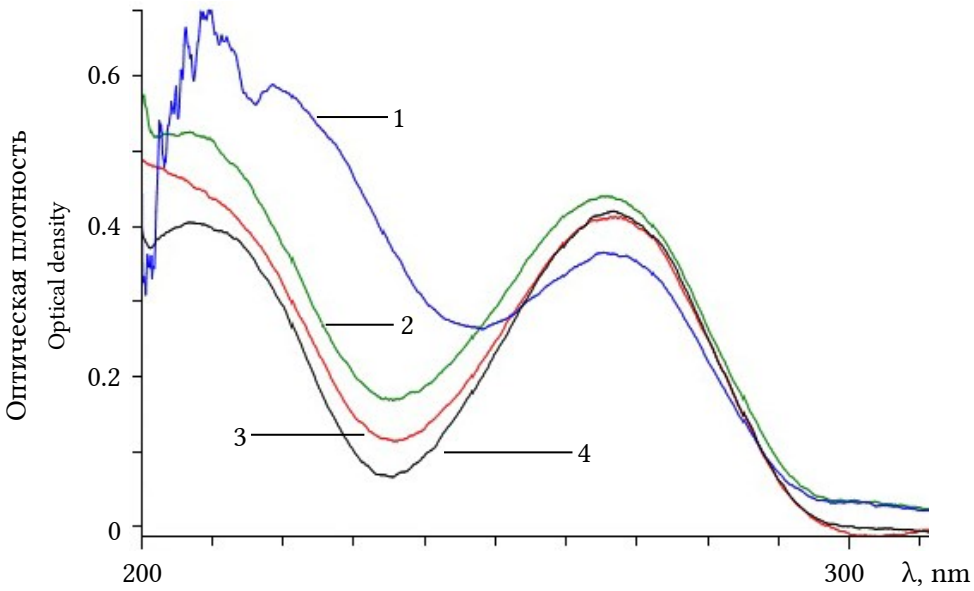

Рис. 2. УФ спектр 0,0016% раствора ставудина при различных pH.
Примечание: 1 – pH=13,0; 2 – pH=7,5; 3 – pH=6,1; 4 – pH=1,1.

Fig. 2. UV spectrum of 0.0016% Stavudine solution at different pH.
Note: 1 – pH=13.0; 2 – pH=7.5; 3 – pH=6.1; 4 – pH=1.1.

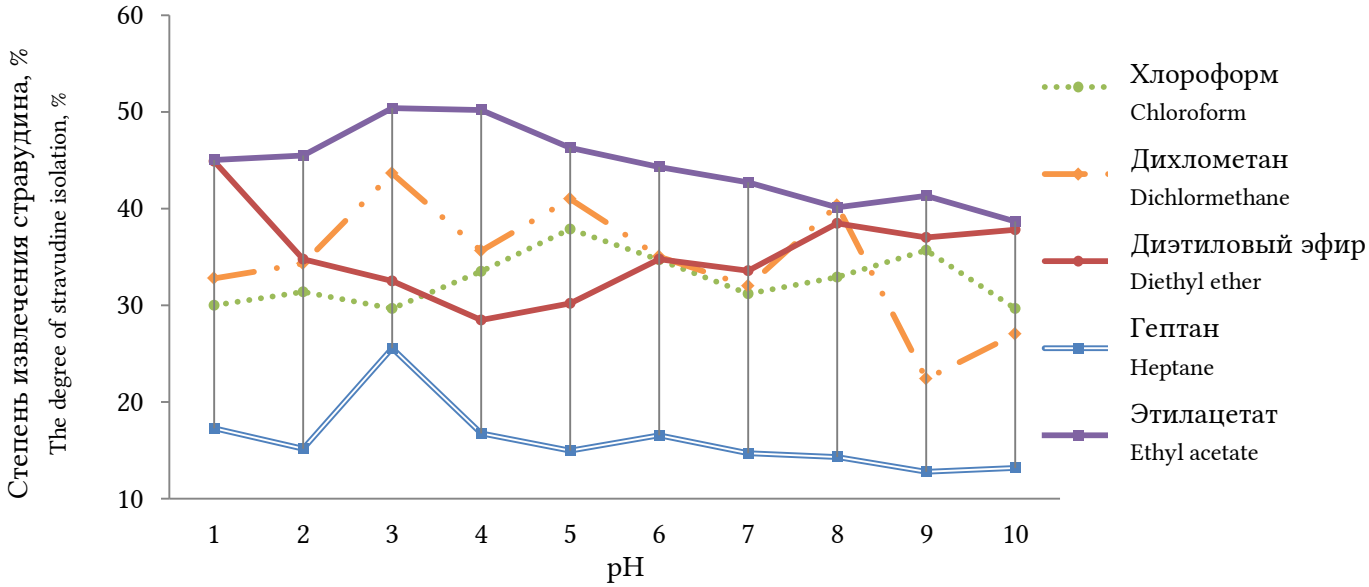

Рис. 3. График зависимости степени извлечения ставудина из растворов от значения pH и органического растворителя.

Fig. 3. Graph of the dependence of the degree of Stavudine extraction from solutions on the pH and organic solvent.

Для более полного перевода ставудина из водного раствора в органическую фазу использовали различные электролиты. Результаты влияния электролитов на полноту экстракции ставудина графически представлены на рисунке 4.

Наибольшее высаливающее действие происходит при добавлении $(NH_4)_2SO_4$ насыщенного, степень извлечения при этом составляет 68,4%.

Следующим этапом проведения эксперимента является изучение влияния времени и кратности экстракции на степень извлечения действующего вещества. Результаты представлены в таблицах 1 и 2.

Видно, что степень экстракции ставудина из водного раствора составила 95,0±2,5% при двукратном экстрагировании этилацетатом (pH 3) и добавлении электролита – $(NH_4)_2SO_4$ насыщенного в течение 7 минут.

Согласно полученным результатам была разработана методика изолирования ставудина из биологических жидкостей (моча и плазма крови). Степень экстракции ставудина из биомоделей мочи и плазмы крови оценивали методом УФ-спектрофотометрии. Статистически обработанные результаты представлены в таблицах 3 и 4.

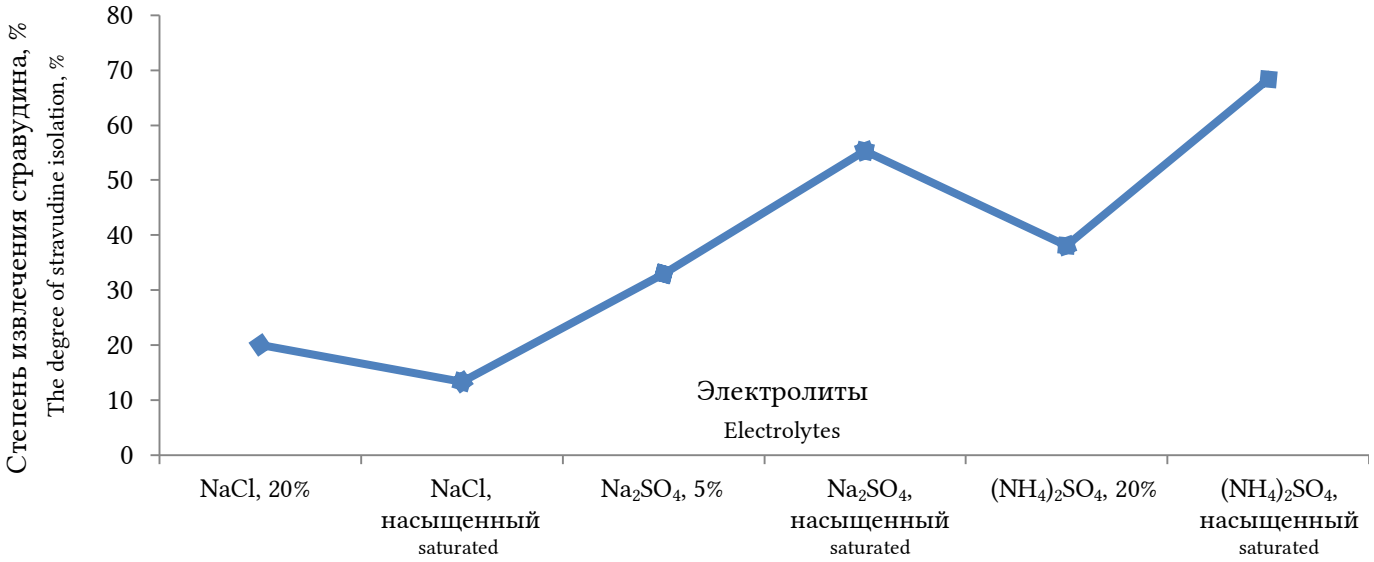

Рис. 4. График зависимости степени извлечения ставудина из растворов от электролитов.

Fig. 4. Graph of the dependence of the degree of Stavudine extraction from solutions on electrolytes.

Таблица 1

Table 1

Результаты влияния времени экстрагирования на степень изолирования ставудина

Results of the effect of extraction time on the degree of isolation of Stavudine

Время, мин Time, min	3	5	7
Степень извлечения этилацетатом, % The degree of extraction by ethyl acetate , %	68.4±1.6	80.9±2.3	81.5±2.4

Таблица 2

Table 2

Результаты влияния кратности экстрагирования на степень изолирования ставудина

Results of the influence of the extraction multiplicity on the degree of isolation of Stavudine

Кратность Multiplicity	Однократная Single	Двукратная Double	Трехкратная Threefold
Степень извлечения этилацетатом, % The degree of extraction by ethyl acetate, %	81.5±2.4	95.0±2.5	94.9±2.3

Таблица 3

Table 3

Результаты изолирования ставудина из модельного образца мочи методом УФ-спектрофотомерии

Results of isolation of Stavudine from a model urine sample by UV-spectrophotometry

Добавлено исследуемого вещества, г Added test substance, g	n	f	$\bar{X}$	S^2	S	S_x	ΔX	E, %	CV
0.6	6	5	94.45	2.71	1.65	0.67	1.36	1.44	0.71
0.9	6	5	95.57	3.97	1.99	0.81	1.64	1.72	0.85
1.8	6	5	89.97	13.93	3.73	1.52	3.07	3.40	1.69

Примечание: здесь и далее: n – объем выборки, f – число степеней свободы, $\bar{X}$ – среднее значение результата, S^2 – дисперсия, S – стандартное отклонение, Sx – стандартное отклонение среднего результата, ΔX – полуширина доверительного интервала величины, E, % – относительная ошибка среднего результата, CV – коэффициент вариации [3].

Note: hereafter: n – sample size, f – number of degrees of freedom, $\bar{X}$ – average result, S^2 – dispersion, S – standard deviation, Sx – 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 [3].

Таблица 4

Table 4

Результаты изолирования ставудина из модельного образца плазмы крови методом УФ-спектрофотомерии

Results of isolation of Stavudine from a model blood plasma sample by UV-spectrophotometry

Добавлено исследуемого вещества, г Added test substance, g	n	f	$\bar{X}$	S^2	S	S_x	ΔX	E, %	CV
0.6	6	5	92.58	4.72	2.17	0.89	1.78	1.92	0.96
0.9	6	5	89.10	2.73	1.65	0.67	1.36	1.53	0.75
1.8	6	5	87.63	12.57	3.55	1.45	2.92	3.33	1.65

Из таблиц 3 и 4 видно, что в результате изолирования из биомоделей мочи и плазмы крови извлекается 89,97-95,57 и 87,63-92,58% ставудина соответственно. Валидационная оценка [1, 14] разработанной методики изолирования ставудина показала ее пригодность для химико-токсикологического анализа (сходимость и внутрилабораторная воспроизводимость не превышали 5,4% для мочи; 5,7% для плазмы крови). Методика экспрессна и дает хорошо воспроизводимые результаты.

Таким образом, проведенные исследования показали, что условия изолирования ставудина из биожидкостей методом жидкость-жидкостной экстракции следующие: органический растворитель – этилацетат, pH 3, электролит – раствор $(NH_4)_2SO_4$ насыщенный, время – 7 минут, двукратная экстракция. В биомоделях мочи и плазмы крови определили 93,33±2,02% и 89,77±2,02 % ставудина соответственно. Разработанная методика может быть рекомендована для определения ставудина в биожидкостях организма в случае проведения химико-токсикологического 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 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 № 1 от 24.09.2019 г.).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Барсегян С.С., Саломатин Е.М., Плетенева Т.В., Максимова Т.В., Долинкин А.О. *Методические рекомендации по валидации аналитических методик, используемых в судебно-химическом и химико-токсикологическом анализе биологического материала.* Москва: Российский центр судебно-медицинской экспертизы, 2014. 75 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. 75 p. (in Russ.)].
2. *Государственная фармакопея Российской Федерации.* XIV издание. Том I. Москва: Федеральная электронная медицинская библиотека [*State Pharmacopoeia of the Russian Federation.* XIV edition. Vol. I. Moscow: Federal electronic medical library (in Russ.)].
URL: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php
3. Дарикулова Б.У., Мусабек Ш. Конструктивные подходы к проведению химико-токсикологического анализа и некоторые аспекты совершенствования химико-токсикологических исследований на примере Англии. *Вестник КазНМУ.* 2018;(3):101–103 [Darikulova B.U., Mussabek Sh. Constructive approaches to conduct chemical-toxicological analysis and some aspects of improvement of chemical-toxicological studies by the example of England. *Vestnik KazNMU.* 2018;(3):101–103 (in Russ.)].
4. Илларионова Е.А., Чмелевская Н.В., Гончикова Ю.А. Химико-токсикологическое определение ламивудина в биологических объектах. *Судебно-медицинская экспертиза.* 2020;63(1):42–46 [Illarionova E.A., Chmelevskaya N.V., Gonchikova Yu.A. Chemical and toxicological determination of Lamivudine in biological substances. *Forensic Medical Expertise / Sudebno-Meditsinskaya Ekspertisa.* 2020;63(1):42–46 (in Russ.)].
DOI: 10.17116/sudmed20206301142
5. Илларионова Е.А., Чмелевская Н.В., Гончикова Ю.А., Скрипко А.А. Химико-токсикологический анализ зидовудина. *Фармация.* 2019;68(7):16–20 [Illarionova E.A., Chmelevskaya N.V., Gonchikova Yu.A., Scripko A.A. Chemical toxicological analysis of Zidovudine. *Farmatsiya,* 2019;68(7):16–20 (in Russ.)]. DOI: 10.29296/25419218-2019-07-03

6. Комаров Т.Н., Белова М.В., Столярова Д.Д., Шохин И.Е., Богданова Д.С., Мискив О.А., Медведев Ю.В., Коренская И.М. Химико-токсикологический анализ антиретровирусных препаратов. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2019;8(4):53–60 [Komarov T.N., Belova M.V., Stolyarova D.D., Shohin I.E., Bogdanova D.S., Miskiv O.A., Medvedev Y.V., Korenskaya I.M. Chemical and toxicological analysis of antiretroviral drugs. *Drug development and registration.* 2019;8(4):53–60 (in Russ.)]. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-4-53-60
7. Мошкович Г.Ф., Минаева С.В., Варлова Л.В., Горяева М.П., Гуляева С.С., Тихонова Е.В. Сравнительное исследование применения нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы в схемах антиретровирусной терапии у больных, получающих лечение хронического гепатита С. *Вопросы вирусологии.* 2016;61(1):34–39 [Moshkovich G.F., Minaeva S.V., Varlova L.V., Goryaeva M.P., Gulyaeva S.S., Tichonova E.V. Clinical and pharmacoeconomic results of the usage of various HIV reverse transcriptase inhibitors in the schemes of antiretroviral therapy of patients receiving therapy for the chronic hepatitis C virus. *Problems of Virology.* 2016;61(1):34–39 (in Russ.)]. DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-1-34-39
8. Нечаева О.Б. Мониторинг туберкулеза и ВИЧ-инфекции в Российской Федерации. *Медицинский алфавит.* 2017;3(30):24–33 [Nechaeva O.B. Monitoring of tuberculosis and HIV-infection in Russian Federation. *Medical alphabet.* 2017;3(30):24–33 (in Russ.)].
9. Покровский В.В., под ред. *Вич-инфекция и СПИД. Национальное руководство.* Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2013. 630 с. [Pokrovskiy V.V., editor. *HIV infection and AIDS. National guidelines.* Moscow: GEOTAR-media, 2013. 630 p.].
10. Турсунов Р.А., Канестри В.Г., Симонова Е.Г., Раичич Р.Р. Антиретровирусная терапия – новая эпоха профилактики ВИЧ-инфекции. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии.* 2018; 10(1):37–46 [Tursunov R.A., Kanestri V.G., Simonova E.G., Raichich R.R. Antiretrovirus therapy – a new epoch of prevention of HIV infection. *HIV Infection and Immunosuppressive Disorders.* 2018;10(1):37–46 (in Russ.)]. DOI: 10.22328/2077-9828-2018-10-1-37-46
11. Шалдина М.В., Пирогова И.А. Антиретровирусная терапия как основной метод лечения ВИЧ-инфекции. *Вестник Совета молодых ученых и специалистов Челябинской области.* 2017;2(4): 71-74 [Shaldina M.V., Pirogova I.A. The antiretroviral therapy as the main method of treatment of HIV infection. *Vestnik Soveta molodykh uchenykh i spetsyalistov Chelyabinskoy oblasti.* 2017; 2(4):71–74. (in Russ.)].
12. Bedor D.C.G., de Souza Filho J.H., Ramos V.L.S., Gonçalves T.M., de Sousa C.E.M., de Santana D.P. 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
13. Capparelli E.V., Letendre S.L., Ellis R.J., Patel P., Holland D., McCutchan J.A. Population pharmacokinetics of abacavir in plasma and cerebrospinal fluid. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(6): 2504–2506. DOI: 10.1128/AAC.49.6.2504-2506.2005
14. Kiran B.V., Rao B.S., Dubey S.S. Validation of Abacavir Sulfate in Pharmaceutical dosage by Reverse phase HPLC with Internal standard method. *International Journal of pharmaceutical sciences and research.* 2012;3(8):2590–2598. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.3(8).2590-98
15. Lea A.P., Faulds D. Stavudine: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and clinical potential in HIV infection. *Drugs.* 1996;51(5):846–864. DOI: 10.2165/00003495-199651050-00009
16. McDowell J.A., Lou Y., Symonds W.S., Stein D.S. Multiple-dose pharmacokinetics and pharmacodynamics of abacavir alone and in combination with zidovudine in human immunodeficiency virus-infected adults. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(8): 2061–2067. DOI: 10.1128/AAC.44.8.2061-2067.2000
17. Melroy J., Nair V. The antiviral activity, mechanism of action, clinical significance and resistance of abacavir in the treatment of pediatric AIDS. *Curr Pharm Des.* 2005;11(29):3847–3852. DOI: 10.2174/138161205774580642
18. Nayak D., Boxi A., Ashe S., Thathapudi N.C., Nayak B. Stavudine loaded gelatin liposomes for HIV therapy: Preparation, characterization and in vitro cytotoxic evaluation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;(73):406–416. DOI: 10.1016/j.msec.2016.12.073
19. Riddler S.A., Anderson R.E., Mellors J.W. Antiretroviral activity of stavudine (2',3'-didehydro-3'-deoxythymidine, D4T). *Antiviral Res.* 1995;27(3):189–203. DOI: 10.1016/0166-3542(95)00016-f
20. Sanne I., Piliero P., Squires K., Thiry A., Schnittman S.; AI424-007 Clinical Trial Group. Results of a phase 2 clinical trial at 48 weeks (AI424-007): a dose-ranging, safety, and efficacy comparative trial of atazanavir at three doses in combination with didanosine and stavudine in antiretroviral-naive subjects. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2003;32(1):18–29. DOI: 10.1097/00126334-200301010-00004
21. Savaser A., Goraler S., Tasoz A., Uslu B., Lingeman H., Ozkan S.A. Determination of abacavir, lamivudine and zidovudine in pharmaceutical tablets, human serum and in drug dissolution studies by HPLC. *Chroma.* 2007;65(5-6):259–265. DOI: 10.1365/s10337-006-0166-6
22. Sungkanuparph S., Manosuthi W., Kiertiburanakul S., Piyavong B., Chumpathat N., Chantratita W. Options for a second-line antiretroviral regimen for HIV type 1-infected patients whose initial regimen of a fixed-dose combination of stavudine, lamivudine, and nevirapine fails. *Clin Infect Dis.* 2007;44(3):447–452. DOI: 10.1086/510745
23. Venter W.D.F., Kambugu A., Chersich M.F., Becker S., Hill A., Arulappan N., Moorhouse M., Majam M. et al. Efficacy and Safety of Tenofovir Disoproxil Fumarate Versus Low-Dose Stavudine Over 96 Weeks: A Mul-

ticountry Randomized, Noninferiority Trial. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2019;80(2):224–233.

DOI: 10.1097/QAI.0000000000001908

Поступила в редакцию 14.12.2020
Подписана в печать 23.06.2021

Для цитирования: Бородина Д.А., Гончикова Ю.А., Илларионова Е.А., Митина А.Э. Разработка и валидация методики изолирования ставудина из биологических жидкостей. *Человек и его здоровье.* 2021;24(1):62–68. DOI: 10.21626/vestnik/2021-1/08

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A METHOD FOR ISOLATING STAVUDINE FROM BIOLOGICAL FLUIDS

© *Borodina D.A., Gonchikova Yu.A., Illarionova E.A, Mitina A.E.*

Irkutsk State Medical University (ISMU)
1, Krasnogo Vosstaniya St., Irkutsk, Irkutsk Region, 664003, Russian Federation

Objective – study of isolating Stavudine from biological fluids (urine, blood plasma).

Materials and methods. Objects of research: substance and tablets of 30 mg Stavudine. Reagents: purified water, chloroform, ethyl acetate, dichloromethane, ether, heptane, toluene, acetone, 95% ethyl alcohol, 0.1 M hydrochloric acid solution, 10% ammonium hydroxide solution, 5%solutions of sodium sulfate, 20%sodium sulfate saturated, sodium chloride, sodium chloride saturated, 20%ammonium sulfate, ammonium sulfate saturated. Universal ionomer IT-1101. Stavudine was isolated by liquid-liquid extraction. To detect and quantify Stavudine, thin – layer sorbent chromatography (TLC) and UV spectrophotometry were used. Statistical data processing was performed using the software package for Windows XP (Microsoft Excel), and using the Student's t-test.

Results. When using thin-layer chromatography to identify Stavudine, it was found that the R_f value of the spots of Stavudine extracts from biological material corresponded to the R_f value range of 0.67-0.69. The R_f spot value of the standard Stavudine witness sample corresponded to (0.68±0.01). The stability study showed that the Stavudine solution is stable in a hydrochloric acid solution of 0.1 M, in which the absorption spectrum of Stavudine is characterized by absorption maxima at wavelengths of 209±1 and 267±1 nm. The wavelength of 267±1 nm was chosen as the analytical wavelength for the quantitative determination of Stavudine. In the course of the study, various factors affecting the degree of extraction of Stavudine from aqueous solutions were studied. The extractant is ethyl acetate, pH 3, the electrolyte is a saturated solution of ammonium sulfate. The extraction time is 7 minutes, twice.

Conclusion. Methods of identification and quantitative determination of Stavudine in extracts from urine and blood plasma by TLC and UV spectrophotometry have been developed. Methods of isolation of Stavudine from urine and blood plasma using the liquid-liquid extraction method have been developed (93.33±2.02%; 89.77±2.02% respectively).

Keywords: Stavudine; isolation; liquid-liquid extraction; biological fluids.

Borodina Daria A. – Postgraduate Student of the Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, ISMU, Irkutsk, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0001-6369-8950. E-mail: Dashabor1998@mail.ru

Gonchikova Yulia A. – Cand. Sci. (Pharm.), Senior lecturer of the Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, ISMU, Irkutsk, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0002-2964-3830. E-mail: gonchikova1984@mail.ru

Illarionova Elena A. – Dr. Sci. (Chem.), Professor, Head of the Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, ISMU, Irkutsk, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0002-3281-9489. E-mail: Illelena24@mail.ru (correspondence author)

Mitina Anastasia E. – Student, ISMU, Irkutsk, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0003-4088-1415. E-mail: nastyamitina98@mail.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 and the "Rules of Clinical Practice in the Russian Federation", approved by the Order of the Ministry of Health of Russia of 19.06.2003 No. 266 and approved by the Ethical Committee under ISMU. Prior to inclusion in the trial, all healthy volunteers signed an informed consent form (Protocol No. 1 of 24.09.2019).

Received 14.12.2020
Accepted 23.06.2021

For citation: Borodina D.A., Gonchikova Yu.A., Illarionova E.A, Mitina A.E. Development and validation of a method for isolating stavudine from biological fluids. *Humans and their Health.* 2021;24(1):62–68. DOI: 10.21626/vestnik/2021-1/08