

Т. М. ТИШКОВ¹, А. В. ПОГРЕБНЯК¹, А. А. ОЗЕРОВ²

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОЕДИНЕНИЯ VMU-2012-05 (1-[2-(2-БЕНЗОИЛФЕНОКСИ)ЭТИЛ]-6-МЕТИЛУРАЦИЛА) В ТАБЛЕТКАХ

¹Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, проспект Калинина, д. 11, Пятигорск, Россия, 357534.

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, площадь Павших борцов, д. 1, Волгоград, Россия, 400131.

АННОТАЦИЯ

Цель. Разработать методику количественного определения VMU-2012-05 (1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил) в таблетках.

Материалы и методы. Методом капиллярного электрофореза (КЭ) проведена разработка методики количественного определения VMU-2012-05 (1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила) в форме таблеток. В работе показано, что при использовании в качестве ведущего электролита 10 мМ раствора натрия тетраборнокислого 10-водного с pH 11,0 удается обеспечить время анализа до 6 минут. Параметры эксперимента были следующие: кварцевый капилляр (диаметр 75 мкм, $L_{\text{общ}}/L_{\text{эф}} = 60/50$ см), напряжение +20 кВ, температура 25°C, детектирование при 256 нм, ввод пробы в режиме 150 мбар×с.

Результаты. Методом капиллярного электрофореза разработана методика количественного определения VMU-2012-05 в таблетках двух различных составов. С использованием разработанной методики проведено количественное определение VMU-2012-05 в таблетках двух различных составов.

Заключение. Разработанная экспрессная методика количественного определения VMU-2012-05 в таблетках позволит продолжить дальнейшее изучение вещества 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил как перспективного в лечении ВИЧ-1.

Ключевые слова: VMU-2012-05 (1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил), таблетки, капиллярный электрофорез, количественное определение

Для цитирования. Тишков Т.М., Погребняк А.В., Озеров А.А. Разработка и валидация методики количественного определения соединения VMU-2012-05 (1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила) в таблетках. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2018; 25(1): 123-128. DOI: 10.25207 / 1608-6228-2018-25-1-123-128

For citation: Tishkov T.M., Pogrebnyak A.V., Ozerov A.A. Development and validation of the procedure for quantification of compound VMU-2012-05 (1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil) in tablets. *Kubanskij nauchnyj medicinskij vestnik*. 2018; 25(1): 123-128. (In Russ., English abstract). DOI: 10.25207 / 1608-6228-2018-25-1-123-128

Т. М. ТИШКОВ¹, А. В. ПОГРЕБНЯК¹, А. А. ОЗЕРОВ²

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE PROCEDURE FOR QUANTIFICATION OF COMPOUND VMU-2012-05 (1-[2-(2-BENZOYLPHENOXY)ETHYL]-6-METHYLURACIL) IN TABLETS

¹Pyatigorsk Medical-Pharmaceutical Institute – branch of the Federal State Educational Institution for Higher Education Volgograd State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Kalinina str., 11, Pyatigorsk, Russia, 357534.

²Federal State Educational Institution for Higher Education Volgograd State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Pavshikh Bortsov sq., 1, Volgograd, Russia, 400131.

ABSTRACT

Aim. To develop a methodology for quantification of compound VMU-2012-05 (1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil) in tablets.

Materials and methods. The method of capillary electrophoresis (CE) was used to develop and validate the procedure for the quantification of VMU-2012-05 (1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil) in the form of tablets.

It is shown that if 10 mM sodium borate is used as the leading electrolyte with a pH of 11.0, it is possible to assure an analysis time of up to 6 minutes. The experiment parameters were as follows: quartz capillary (diameter 75 μ m, WL/L_{ef} = 60/50 cm), voltage +20 kV, temperature 25°C, detection at 256 nm, sample entry at 150 mbar $\times$ s.

Results. The validation assessment of the developed methodology for indicators specificity, analytical area, linearity, accuracy and precision indicates that the methodology is specific, and in terms of indicators, the analytical area and linearity meet the requirements of the GF XIII edition. In addition, it is shown that the technique yields results free of systematic error (the correctness of the technique), and the precision is at a sufficiently low level (RSD = 1,53%). Also, for the developed and validated methodology, the parameters of the system suitability for the parameters were determined by the number of theoretical plates of the VMU-2012-05 peak, the resolution of the VMU-2012-05 peak and the EOS signal and the VMU-2012-05 peak symmetry factor.

Conclusion. The developed rapid method of quantitative determination of VMU-2012-05 in tablets will allow further study of the substance 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil as a promising in the treatment of HIV-1.

Keywords: VMU-2012-05 (1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil), tablets, capillary electrophoresis, quantitation

Введение

По разным оценкам ВИЧ-инфекция уже унесла от 40 до 50 млн жизней, фиксируется большое число заболевших. Синтезированное в Волгоградском государственном медицинском университете вещество VMU-2012-05 (1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил), проявившее противовирусное действие в отношении вируса ВИЧ-1 in vitro, является перспективным для создания новых лекарственных препаратов.

Целью данного исследования явилась разработка методики количественного определения VMU-2012-05 (1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил) в таблетках.

Разработка методики количественного определения позволит подготовить нормативную базу для дальнейшего исследования VMU-2012-05 и последующего внедрения на фармацевтический рынок.

Цель исследования: разработать методику количественного определения VMU-2012-05 (1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил) в таблетках.

Материалы и методы

В качестве стандартного образца использовалась субстанция VMU-2012-05. Исследования выполнялись согласно требованиям ОФС.1.2.1.0022.15 «Капиллярный электрофорез», ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методов» государственной фармакопеи XIII издания [1].

Испытуемые образцы:

Таблетки, содержащие VMU-2012-05 (состав №1):

VMU-2012-05 – 0,1 г

Лактоза – 0,085 г

Плаздон К 29/32 – 0,005 г

Крахмал кукурузный – 0,008 г

Магния стеарат – 0,002 г

Итого: 0,2 грамма на одну таблетку.

Таблетки, содержащие VMU-2012-05 (состав №2):

VMU-2012-05 – 0,1 г

Кальций фосфат кислый двузамещенный – 0,085 г

Полиплаздон XL-10 – 0,008 г

Плаздон К 29/32 – 0,005 г

Магния стеарат – 0,002 г

Итого: 0,2 грамма на одну таблетку.

Таблетки состава №1, не содержащие VMU-2012-05 (плацебо №1).

Таблетки состава №2, не содержащие VMU-2012-05 (плацебо №2).

Соединение VMU-2012-05 представляет собой производное урацила, имеющее следующее химическое название: 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил. Структурная формула представлена на рисунке 1.

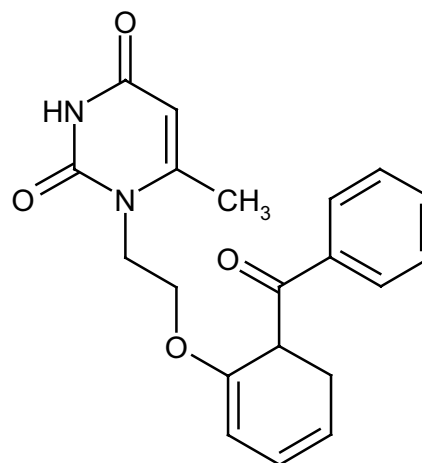


Рис. 1. Структурная формула VMU-2012-05.

Fig. 1. Structural formula VMU-2012-05.

Для VMU-2012-05 как производного урацила характерна лактам-лактимная таутомерия (за счет водорода имидной группы) (рис. 2).

Лактимная или аци-форма обуславливает кислотный характер данного химического соединения. В этой связи, в щелочной среде VMU-2012-05

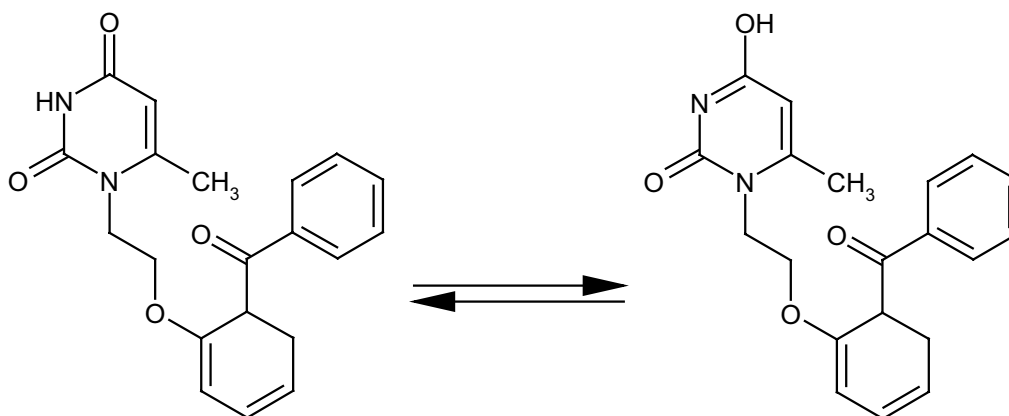


Рис. 2. Схема лактам-лактимной таутомерии VMU-2012-05.
Fig. 2. Scheme of lactam-lactimium tautomerism VMU-2012-05.

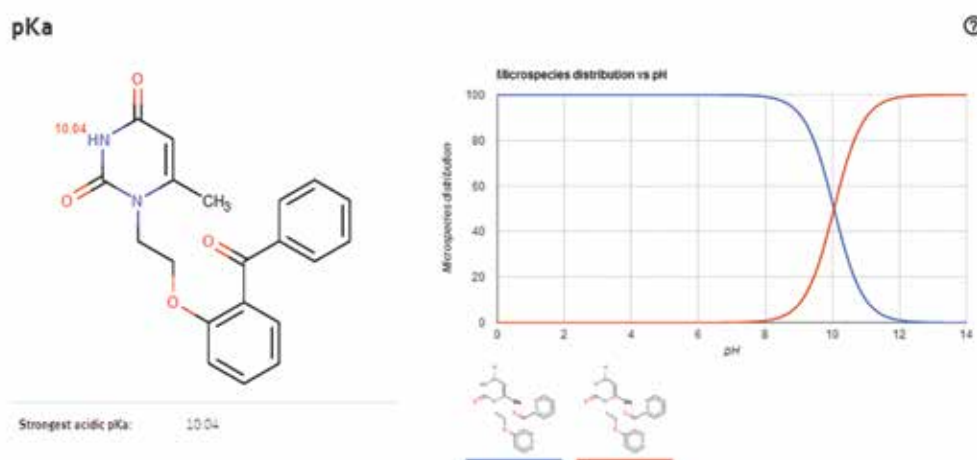


Рис. 3. Расчет значения pK_a для соединения VMU-2012-05 (по данным chemicalize.com).
Fig. 3. Calculation of the pK_a value for VMU-2012-05 compound (according to chemicalize.com).

диссоциирует как кислота, являясь анионом. Это, в свою очередь, позволяет реализовывать в анализе VMU-2012-05 методом капиллярного электрофореза вариант зонного электрофореза.

При выборе необходимого pH ведущего электролита следует ориентироваться на значения pK_a анализируемого соединения. Так как соединение VMU-2012-05 является новым, и значения его pK_a на сегодня не установлены, то для расчета данного показателя был применен программный продукт ChemAxon (chemicalize.com). Результаты расчета значения pK_a для химического соединения VMU-2012-05 по данным chemicalize.com представлены на рисунке 3.

Таким образом, учитывая, что значения pK_a химического соединения VMU-2012-05 составляет 10,04, то для его достаточной ионизации необходимо ориентироваться на ведущий электролит с $pH \geq 10$.

В капиллярном электрофорезе одним из наиболее популярных щелочных электролитов является боратный буферный раствор [3], что связано, прежде всего, с простотой его приготовления и достаточно широким диапазоном pH (7,6-11,0).

Поэтому при выборе необходимого pH ведуще-

го электролита использовались боратные буферные растворы с pH 10, 10,4 и 11,0. Концентрация всех буферных растворов составляла 10 мМ. Характеристики пика VMU-2012-05 на электрофореграммах раствора СО, полученных в ведущих электролитах с различным уровнем pH, представлены в таблице 1.

Полученные результаты свидетельствуют, что наилучшие значения параметров пика VMU-2012-05 достигаются при использовании боратного буферного раствора с pH 11, в связи с чем, он был выбран в качестве ведущего электролита при определении VMU-2012-05 в таблетках. Для выбора аналитической длины волны измеряли спектр поглощения раствора VMU-2012-05 на спектрофотометре СФ-2000. В качестве растворителя использовался раствор ведущего электролита. Спектр поглощения раствора VMU-2012-05 представлен на рисунке 4.

В результате, в данном растворителе максимум поглощения раствора VMU-2012-05 наблюдается при 199 и 256 нм. Но в качестве аналитической была выбрана длина волны 256 нм, как более селективная. Типичная электрофореграмма (ЭФГ) раствора СО VMU-2012-05, полученная в

Характеристики пика VMU-2012-05 в зависимости от pH ведущего электролита **Characteristics of the VMU-2012-05 peak depending on the pH of the lead electrolyte**

pH электролита	Параметр		
	R_s	N	A_s
10,0	3,25	18293	1,29
10,4	5,47	198010	2,88
11,0	6,15	235784	1,83

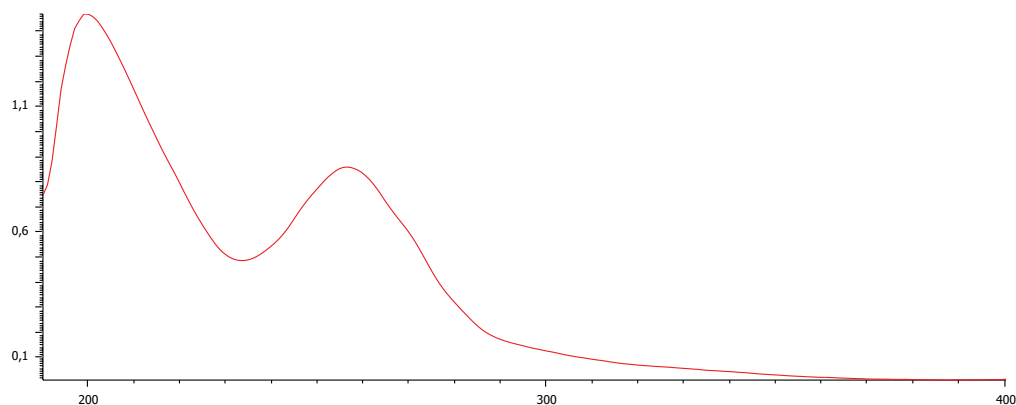


Рис. 4. Спектр поглощения раствора VMU-2012-05.

Fig. 4. Absorption spectrum of the VMU-2012-05 solution.

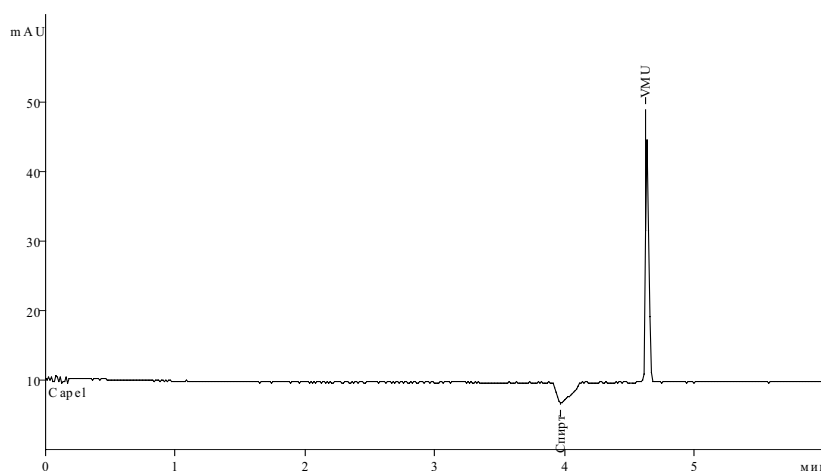


Рис. 5. ЭФГ раствора CO VMU-2012-05 с концентрацией 62,4 мкг/мл ($\lambda=256$ нм, $T=25^\circ\text{C}$, электролит: 10 мМ боратный буфер с pH 11,0).

Fig. 5. EPG of CO VMU-2012-05 solution with a concentration of 62.4 $\mu\text{g/ml}$ ($\lambda = 256$ nm, $T=25^\circ\text{C}$, electrolyte: 10 mM borate buffer with pH 11.0).

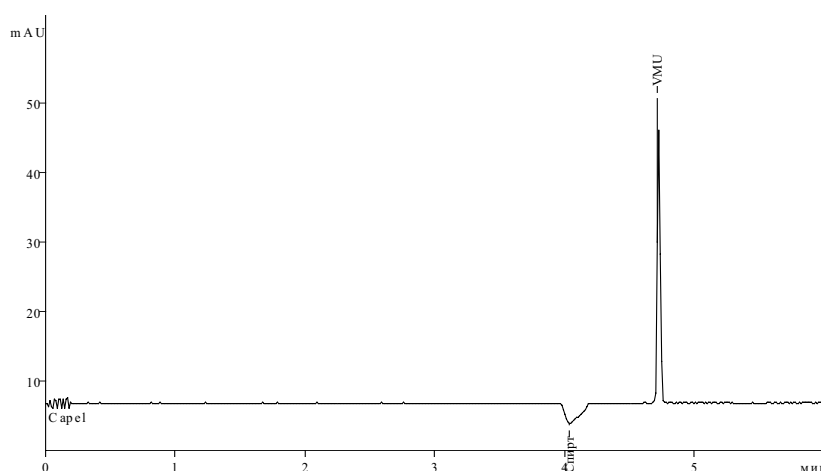


Рис. 6а. ЭФГ извлечения таблеток состава №1 (условия анализа см. рисунок 5)

Fig. 6a. EPG of tablets of composition No. 1 extraction (for analysis conditions see Fig. 5)

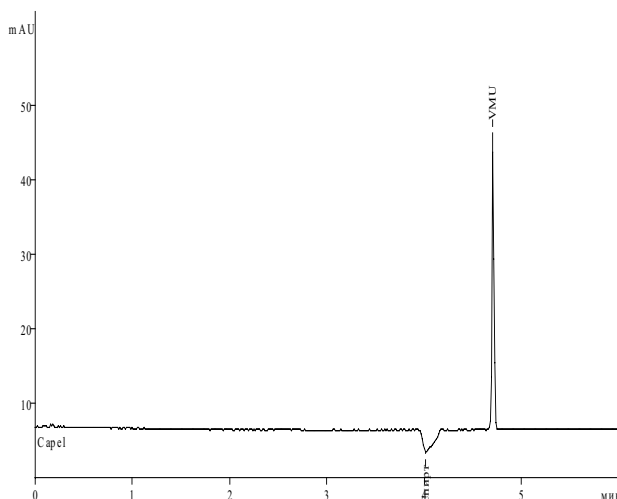


Рис. 66. ЭФГ извлечения таблеток состава №2 (условия анализа на рис. 5).

Fig. 66. EPG of tablets of composition No. 2 extraction (for analysis conditions see Fig. 5).

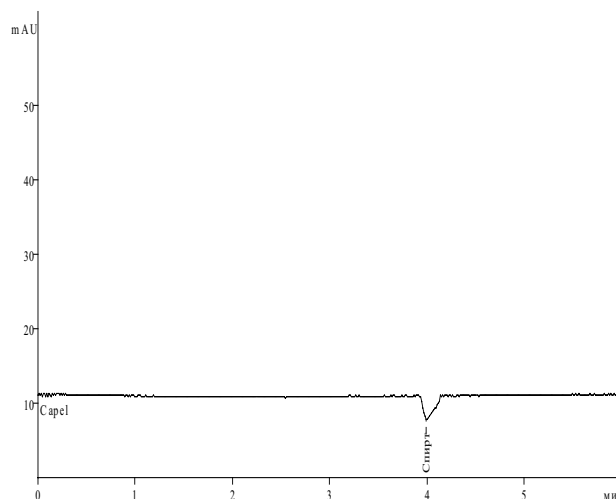


Рис. 7а. ЭФГ извлечения таблеток плацебо №1 (условия анализа на рис. 5).

Fig. 7a. EPG of placebo No. 1 tablets extraction (for analysis conditions see Fig. 5).

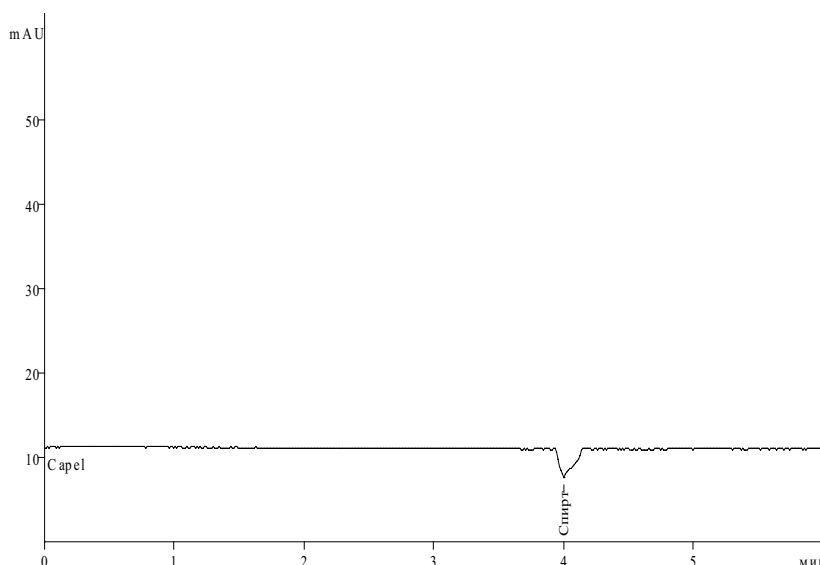


Рис. 7б. ЭФГ извлечения таблеток плацебо №2 (условия анализа на рис. 5).

Fig. 7б. EPG of placebo No. 2 tablets extraction (for analysis conditions see Fig. 5).

выбранных условиях, представлена на рисунке 5. Пробоподготовку выполняли по приведенной ранее схеме.

Таким образом, достигнутые характеристики пика VMU-2012-05 (таблица), а также продолжительность анализа не более 6 мин позволяют использовать выбранные условия для дальнейших исследований.

На следующем этапе для установления возможного влияния сопутствующих компонентов таблеток на определение VMU-2012-05 готовили извлечение, как из таблеток, содержащих VMU-2012-05 (использовались образцы состава №1 и №2), так и таблеток, не содержащих VMU-2012-05 (плацебо №1 и №2). В качестве экстрагента был выбран спирт этиловый, так как по данным разработчиков субстанции данное вещество является растворимым в нем. Предварительно, в опытах на СО было установлено, что указанная навеска вещества полностью растворяется в приведенном

в методике объеме спирта этилового в ходе обработки ультразвуком в течение 15-ти минут. Извлечение проводили согласно приведенной процедуре. ЭФГ извлечений таблеток состава №1 и №2 представлены на рисунках 6а и 6б, а также таблеток плацебо обоих составов – на рисунках 7а и 7б.

Результаты и обсуждение

В результате показано, что сопутствующие компоненты таблеток обоих составов не оказывают влияние на определение VMU-2012-05, при этом на ЭФГ извлечения таблеток, как состава №1, так и состава №2 обнаруживается только один пик, соответствующий, как по времени миграции, так и по эффективности и разрешению, пику VMU-2012-05 на ЭФГ раствора СО. Таким образом, выбранные условия позволяют вести определение VMU-2012-05 в таблетках состава №1 и №2.

Далее с использованием разработанной методики проведено количественное определение

VMU-2012-05 в таблетках состава №1 и состава №2. Эксперимент проводился в трех повторностях, для каждой пробы выполнялось два последовательных ввода. Расчет проводился по формуле:

$$X, \% = \frac{S_x \cdot a_0 \cdot W_x^1 \cdot W_x^2 \cdot V_0 \cdot P}{S_0 \cdot a_x \cdot W_0^1 \cdot W_0^2 \cdot V_x}$$

S_x и S_0 – площади пика VMU-2012-05 на электрофореграмме (ЭФГ) раствора испытуемого образца и СО, соответственно;

a_x – навеска порошка растертых таблеток, г;

a_0 – навеска СО VMU-2012-05, г;

W_x^1 , W_x^2 и W_0^1 , W_0^2 – объемы мерных колб, используемые для разведения извлечения из порошка растертых таблеток и СО VMU-2012-05, соответственно, мл;

V_0 и V_x – аликвоты, используемые для разведения извлечения из порошка растертых таблеток и СО VMU-2012-05, соответственно, мл;

P – Средняя масса таблеток, г.

Таблица 2 / Table 2

Результаты количественного определения VMU-2012-05 в таблетках состава №1 и состава №2 (n=3, P=95%)

Results of quantification of VMU-2012-05 in tablets of composition No. 1 and composition No. 2 (n=3, P=95%)

Номер состава таблеток	Содержание VMU-2012-05 в таблетках, г ($\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$)
1	0,0979±0,0042
2	0,0972±0,0049

Результаты представлены в таблице 2.

Полученные данные свидетельствуют, что с учетом значений доверительного интервала содержание VMU-2012-05 в таблетках, в целом, соответствует заявленному (см. состав таблеток). Однако, для установления соответствующих норм содержания необходимо проведение дополнительных исследований по стандартизации с использованием нескольких серий данных составов таблеток.

Заключение

Методом капиллярного электрофореза разработана методика количественного определения VMU-2012-05 в таблетках двух различных составов. Установлено, что использование 10 mM боратного буферного раствора с pH 11,0 позволяет провести анализ менее чем за 6 минут, при этом достигаются достаточно высокие параметры эффективности (более 200 000 т.т.) и необходимое разрешение ($R_s \geq 1,5$).

С использованием разработанной методики проведено количественное определение VMU-2012-05 в таблетках состава №1 и состава №2. Показано, что содержание VMU-2012-05 в составе №1 составило 0,0979±0,0042 г, а в составе №2 – 0,0972±0,0049 г.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Государственная фармакопея Российской Федерации. – 13 изд.: в 3 т. М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2015. – Режим доступа: <http://www.femb.ru/feml>. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. – 13th ed.: in 3 T. M.: Ministry of health of the Russian Federation, 2015. – Mode of access: <http://www.femb.ru/feml>].
2. ГОСТ 4919.2-77 Реактивы и особо чистые вещества. Методы приготовления растворов индикаторов и буферных растворов. М.: Стандартинформ; 2010. 34 с. [GOST 4919.2-77 Reagents and highly purified substances. Methods of preparing solutions of indicators and buffer solutions. Moscow: Standartinform; 2010. 34 p.].
3. Комарова Н.В., Каменцев Я.С. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза "КАПЕЛЬ". СПб: Веда; 2006. 212 с. [Komarova N.In., Kamentsev J.S. A practical guide to the use of capillary electrophoresis "KAPEL". SPb: Veda; 2006. 212 p.].
4. Береговых В.В. Валидация аналитических методик для производителей лекарств: Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств. Под редакцией В.В. Береговых. М.: Литтерра; 2008. 132 с. [Beregovoy V.V. Validation of analytical methods for drug manufacturers: the Model management of the enterprise on manufacture of medicines / edited by Vladimir Beregovoy. Moscow: Litterra; 2008. 132 p.].
5. Guidelines for standard method performance requirements. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.aoac.org/imis15_prod/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/eoma_appendix_f.pdf.

Поступила / Received 20.09.2017

Принята в печать / Accepted 10.12.2017

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов / The authors declare no conflict of interest

Контактная информация: Тишков Тимур Михайлович; тел.: (918) 778-40-62; e-mail: timur.tishkov@yandex.ru; Россия, 357532, г. Пятигорск, проспект Калинина, 11.

Corresponding author: Timur M. Tishkov; tel.: (918) 778-40-62; e-mail: timur.tishkov@yandex.ru; 11, avenue Kalinina, Pyatigorsk, Russia, 357532.