

Сабирзянов Денис Робертович

**РАЗРАБОТКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДИК
ДЛЯ СТАНДАРТИЗАЦИИ СУБСТАНЦИИ БРОМОКАИНА,
ЕГО ТРАНСДЕРМАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ И
ПРОВЕДЕНИЯ БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук**

Пермь – 2019

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

кандидат фармацевтических наук, доцент **Карпенко Юлия Николаевна**

Официальные оппоненты:

Ремезова Ирина Петровна - доктор фармацевтических наук, доцент, Пятигорский медико-фармацевтический институт - филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармацевтической и токсикологической химии, профессор кафедры;

Белоусов Михаил Валерьевич - доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармацевтического анализа, заведующий кафедрой.

Ведущая организация:

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург.

Защита диссертации состоится «__» _____ 2019 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.068.02 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (614990, г. Пермь, ул. Полевая, 2, тел. (342) 233-55-01).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (614070, г. Пермь, ул. Крупской, 46) и на сайте (<http://www.pfa.ru>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук

Замараева Татьяна Михайловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Создание отечественных высокоэффективных и безопасных лекарственных препаратов – одна из важнейших задач российского здравоохранения. В современной медицинской практике местные анестетики используются в хирургии, травматологии, стоматологии, кардиологии, при проведении диагностических исследований и т.д.

В Пермской государственной фармацевтической академии под руководством профессора Панцуркина В.И. синтезирован местный анестетик из группы замещенных амидов – анилокаин (непатентованное наименование – бромокаин), проявляющий высокую поверхностную, инфильтрационную и проводниковую анестезию. Структурные аналоги анилокаина – лидокаин и тримекаин, давно используемые в медицинской практике, значительно уступают ему по выраженности поверхностноанестезирующего и антиаритмического действия. Кроме того, лидокаин обладает достаточно высокой токсичностью, что обуславливает развитие различных осложнений при его применении. Клинические исследования анилокаина доказали его высокую эффективность в различных областях медицины. Ряд лекарственных форм с анилокаином (инъекционные растворы, растворы для наружного применения, перевязочные средства) доведены до медицинского применения. С перспективой внедрения в медицинскую и ветеринарную практику разработаны и другие лекарственные средства для наружного применения: мазь, гель для проведения инструментальных вмешательств, аэрозоль, суппозитории и пленки. В «Федеральном научном центре трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» (г. Москва) впервые разработана первая отечественная трансдермальная терапевтическая система местного анестетика (бромокаина) на основе биосовместимой микроэмульсионной композиции.

Поэтому актуальной является разработка аналитических методик для стандартизации субстанции бромокаина, а также лекарственных форм на его основе. В связи возрастающими требованиями к качеству активных фармацевтических субстанций и гармонизацией ГФ РФ с ведущими зарубежными фармакопеями требует пересмотра нормативная документация на субстанцию анилокаина (1997 г.) с целью включения в неё современных хроматографических методов (ВЭЖХ и ГЖХ). Кроме того, перспектива внедрения в медицинскую и ветеринарную практику лекарственных препаратов бромокаина определяет необходимость разработки высокочувствительных методик его определения в биологических объектах для проведения фармакокинетических исследований.

Степень разработанности темы исследования. В разные годы учеными (Малкова Т.Л., Алексеева И.В., Чекрышкина Л.А., Гайсинович М.С. и др.) проведены исследования по разработке способов оценки качества анилокаина в субстанции и лекарственных формах, на основе которых были созданы проекты временных фармакопейных статей. Предложенные методы (ТСХ, ГХ на насадочных колонках, титриметрия) для оценки показателей «родственные примеси», «остаточные органические растворители», «количественное определение» недостаточно специфичны и не удовлетворяют современным требованиям. Исследования, касающиеся разработки высокочувствительных биоаналитических методик для целей изучения фармакокинетики анилокаина, не проводились.

Цель работы – разработка методик для стандартизации субстанции бромокаина, его трансдермальной лекарственной формы и проведения фармакокинетических исследований с использованием высокоэффективных хроматографических методов.

Задачи исследования:

- разработать и валидировать методику количественного определения остаточных органических растворителей в субстанции бромокаина методом ГЖХ на капиллярных хроматографических колонках;
- выбрать условия определения «родственных» примесей в субстанции бромокаина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии;
- провести исследование серийных образцов субстанции бромокаина по показателю «Родственные примеси» и нормировать их содержание;
- разработать методику количественного определения бромокаина в субстанции методом ВЭЖХ и провести ее валидацию;
- разработать методики количественного определения и определения «родственных примесей» в ТТС бромокаина методом ВЭЖХ;
- разработать и валидировать методики количественного определения бромокаина в биологических объектах (плазме крови, внутренних органах лабораторных животных) для фармакокинетических исследований.

Научная новизна. Разработана методика определения остаточных органических растворителей в субстанции бромокаина методом ГЖХ на капиллярных колонках.

Установлены оптимальные условия определения бромокаина, идентифицированных (2-броманилина и N-(2-бромфенил)акриламида) и неидентифицированных «родственных» примесей методом ВЭЖХ.

На основе метода ВЭЖХ разработаны методики для стандартизации субстанции бромокаина и трансдермальной лекарственной формы по показателям «Количественное определение» и «Родственные примеси».

Проведена оптимизация условий определения бромокаина в плазме крови методом микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием.

Разработан эффективный способ пробоподготовки плазмы крови к последующему хроматографическому анализу на основе экстракции бромокаина из биожидкости после предварительного осаждения белков ацетонитрилом.

Практическая значимость и внедрение результатов работы.

На основании проведенных исследований разработаны и валидированы хроматографические методики для стандартизации субстанции бромокаина по показателям «Остаточные органические растворители», «Родственные примеси» и «Количественное определение». Методики включены в проект НД на субстанцию бромокаина. Апробация предлагаемых методик с положительным результатом была проведена в химической лаборатории Отдела контроля качества ФКП «Армавирская биофабрика» на трех сериях субстанции (акт апробации от 20 февраля 2017 г).

Разработанные методики на основе метода ВЭЖХ для оценки «родственных» примесей и количественного определения бромокаина в трансдермальных терапевтических формах включены в проект НД «ТТС бромокаина, терапевтическая система трансдермальная, 0,05 (0,10)» (акты внедрения от 17 февраля 2015 г, АНО «ИМБИИТ»).

Методики количественного определения бромокаина в плазме крови, тканях и органах лабораторных животных методом микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии использованы при проведении доклинических фармакокинетических

исследований образцов микроэмульсионной трансдермальной терапевтической системы бромокаина (акты внедрения от 17 февраля 2015 г, АНО «ИМБИИТ»).

Разработанные методики определения бромокаина с использованием газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии используются в учебном процессе Пермской государственной фармацевтической академии при обучении студентов на дисциплине по выбору «Методы инструментальной хроматографии в анализе лекарственных и наркотических средств» (акт внедрения от 09.10.2018 г.), а также на цикле повышения квалификации для преподавателей ВУЗов и колледжей химического профиля «Стандартизация, подтверждение соответствия и контроль качества лекарственных средств» (акт внедрения от 12.12.2018 г.)

Методология и методы диссертационного исследования. Методология исследования включала анализ литературных данных, оценку актуальности работы, постановку цели и задач, выполнение эксперимента по разработке и валидации аналитических и биоаналитических методик на основе хроматографических методов, статистическую оценку полученных результатов.

Апробация работы. Основные положения и результаты работы доложены на Российской научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Современные проблемы фармацевтической науки», посвященной 75-летию ПГФА (Пермь, 2012), Международной научно-практической конференции «Роль и место медицины в обеспечении здоровья человека в современном обществе» (Одесса, 2013), первой Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Проблемы разработки новых лекарственных средств» (Москва, 2013), научно-практической конференции с международным участием «Современная фармация: образование, наука, бизнес», посвященной 50-летию фармацевтического факультета (Тюмень, 2014), научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Актуальные вопросы разработки новых лекарственных средств» (Харьков, 2016).

Объем и структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (5 глав), общих выводов, списка литературы, включающего 162 наименования (67 источников зарубежной литературы), приложения. Работа изложена на 144 страницах машинописного текста, включает 53 таблицы, 28 рисунков и 7 страниц приложения.

Личный вклад автора. Вклад автора заключается в непосредственном участии в планировании и реализации экспериментальных исследований, анализе полученных данных, их статистической обработке, подготовке публикаций, написании диссертационной работы.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 научных работ, в том числе в изданиях Перечня ВАК – 3.

Связь темы диссертации с проблемным планом фармацевтических наук. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России. Номер государственной регистрации темы – 01.9.50 007417.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия, конкретно п. 3 – разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления; п. 4 – разработка методов анализа лекарственных веществ и их метаболитов в биологических объектах для

фармакокинетических исследований, эколого-фармацевтического мониторинга, судебно-химической и наркологической экспертизы.

Положения, выносимые на защиту:

- Результаты исследований по выбору условий определения остаточных органических растворителей в субстанции бромокаина методом ГЖХ.
- Разработка и валидация методик стандартизации субстанции бромокаина методом ВЭЖХ по показателям «Родственные примеси» и «Количественное определение».
- Разработка и валидация методик количественного определения и определения «родственных» примесей в ТТС бромокаина 0,05 г и 0,10 г.
- Разработка условий пробоподготовки и анализа бромокаина в биологических объектах для фармакокинетических исследований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В **первой главе** (обзор литературы) дана общая оценка состояния и перспектив внедрения бромокаина в медицинскую и ветеринарную практику, а также сформулированы современные требования к стандартизации фармацевтических субстанций. Описаны методы анализа бромокаина и анестетиков родственной структуры в фармацевтических субстанциях, лекарственных препаратах и биологических объектах. Представлена характеристика трансдермальных терапевтических систем как современной лекарственной формы.

Вторая глава включает описание объектов исследования (используемые в эксперименте субстанции, лекарственные формы и биологические объекты), оборудования, приготовление модельных смесей и реагентов.

В **третьей главе** представлены результаты эксперимента по выбору оптимальных условий количественного определения остаточного органического растворителя ацетона в субстанции бромокаина методом ГЖХ на капиллярных хроматографических колонках с использованием внутреннего стандарта (пропанола-1). При проведении исследований использован газовый хроматограф «Хроматэк-Кристалл 5000.2» (ЗАО СКБ «Хроматэк», г. Йошкар-Ола) с пламенно-ионизационным детектором (ПИД) и капиллярной колонкой HP-FFAP (50 м, 0,32 мм, 0,52 мкм).

Для извлечения ацетона и пропанола-1 из водных растворов субстанции для дальнейшего анализа методом ГЖХ/ПИД предложен современный вариант статической парофазной экстракции, позволяющий избежать загрязнения хроматографической колонки нелетучими компонентами. Путём апробирования различных режимов термостатирования образца установлено, что оптимальными условиями являются нагрев при 60 °С в течение 10 минут. Дальнейшее увеличение времени термостатирования и температуры не привело к усилению сигнала детектора от анализируемых веществ, что свидетельствует об установившемся равновесии. Газохроматографический анализ водных растворов субстанции в данных условиях подготовки пробы показал наличие в парогазовой фазе и летучих продуктов деградации бромокаина, количество которых существенно возросло с увеличением температуры нагрева.

В результате эксперимента выбраны следующие условия определения ацетона в субстанции бромокаина методом ГЖХ/ПИД, позволяющие эффективно разделить хроматографические пики ацетона, пропанола-1 (внутреннего стандарта) от пиков летучих продуктов деградации бромокаина : хроматографическая колонка – HP-FFAP (50 м × 0,32 мм × 0,52 мкм); газ-носитель – азот; температура испарителя – 180 °С; температура детектора – 220 °С; температура колонки программируемая: начальная температура 75 °С, выдержка 5 минут,

подъем со скоростью 10 °С/мин до 150 °С; скорость газа-носителя – 7 мл/мин; расход водорода – 30 мл/мин; расход воздуха – 300 мл/мин; деление потока – 1:5. Параметры ДРП: температура термоблока (пробы) – 60 °С, температура крана ДРП – 95 °С, время отбора пробы – 5 с.

В данных условиях времена удерживания ацетона и пропанола-1 составили 4,4 и 6,4 мин. соответственно (рис. 1).

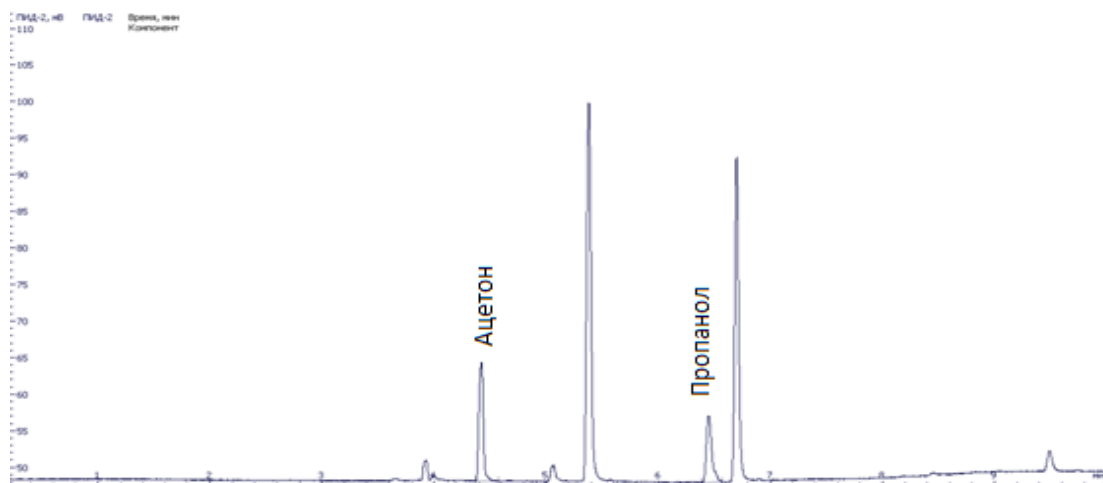


Рисунок 1 – Хроматограмма испытуемого раствора субстанции бромокаина

Для валидационной оценки методики использовали высокоочищенный образец субстанции бромокаина, по результатам ГЖХ-анализа не содержащий ацетон. На хроматограмме водного раствора данной субстанции отсутствовали мешающие пики со временами удерживания, соответствующими пикам ацетона и пропанола-1, что подтверждает специфичность предлагаемой методики.

Для установления линейности методики определения ацетона по методу внутреннего стандарта проанализированы калибровочные растворы ацетона в диапазоне концентраций от 5 до 600 мкг/мл (соответствует содержанию ацетона в субстанции от 10 до 1200 ppm) с введением к 5 мл калибровочного раствора 500 мкл внутреннего стандарта пропанола-1 с концентрацией 2,50 мг/мл. Линейная зависимость наблюдалась во всем изучаемом диапазоне, коэффициент корреляции калибровочного графика (рис. 2) составил 0,9986.

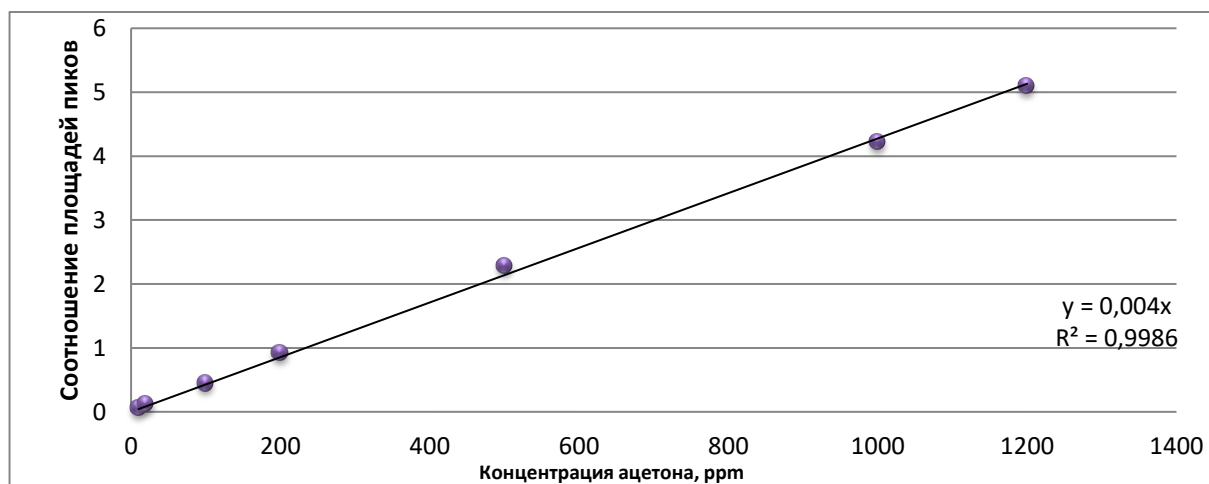


Рисунок 2 – Калибровочный график определения ацетона методом ГЖХ/ПИД (метод внутреннего стандарта)

Определение правильности методики осуществляли путём анализа модельных растворов субстанции бромокаина с концентрацией ацетона: 50 мкг/мл (100 ppm), 250 мкг/мл (500 ppm),

500 мкг/мл (1000 ppm), 600 мкг/мл (1200 ppm). Результаты оценки правильности методики представлены в таблице 1. Значения, принимаемые за истинные, лежат внутри доверительных интервалов полученных средних результатов анализа, что свидетельствует о правильности методики. Незначимость систематической ошибки подтверждает и рассчитанный коэффициент Стьюдента, значение которого не превышает табличного.

Таблица 1 – Результаты оценки правильности методики анализа ацетона в субстанции бромокаина методом ГЖХ/ПВД

Концентрация ацетона в растворе, ppm	Найденная концентрация, ppm			Открываемость (R), %			Метрологические характеристики (n=12, P=95 %)
100	112	102	89	112,00	102,00	89,00	$R_{cp} = 99,23$ $SD = 5,54$ $RSD = 5,58$ $\Delta R_{cp} = 3,52$ $t_{расч.} = 0,48$ $t_{табл.} = 2,20$
500	484	516	508	96,80	103,20	101,60	
1000	962	982	958	96,20	98,20	95,80	
1200	1200	1188	1153	100,80	99,00	96,10	

Прецизионность методики оценивалась на 2 уровнях: как повторяемость (сходимость) и как внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность, в условиях, регламентированных ГФ РФ XIII. В качестве объекта исследования использовали однородную модельную смесь на основе высокоочищенной субстанции бромокаина с добавлением ацетона на уровне 1000 ppm. Результаты оценки прецизионности представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты оценки прецизионности методики анализа ацетона в субстанции бромокаина методом ГЖХ/ПВД

Содержание ацетона, ppm	Найденное содержание ацетона, ppm					
	1 химик-аналитик			2 химик-аналитик		
1000	976	987	965	1005	989	992
	1023	1010	980	972	1012	979
Метрологические характеристики (n = 6, P = 95%)						
X _{ср.}	990,20			991,50		
D	483,77			229,10		
SD	22,00			15,14		
RSD	2,23			1,53		
Критерий Фишера (табл. 5,05)	2,11					

Относительное стандартное отклонение результатов анализа, полученных каждым из аналитиков, не превышает 2,5%, что свидетельствует о прецизионности методики на уровне сходимости. Поскольку величина расчетного значения критерия Фишера меньше табличного значения, различия между результатами определений, проведенных двумя аналитиками, статистически незначимы.

С использованием разработанной методики были проанализированы серийные образцы субстанции бромокаина. Содержание ацетона в испытуемых образцах не превышало 0,5% (5000 ppm), рекомендуемых для растворителей третьего класса токсичности.

Четвертая глава 4 включает в себя результаты экспериментальных исследований по разработке методик анализа показателей «Родственные примеси» и «Количественное определение» в субстанции бромокаина методом ВЭЖХ.

Специфическими примесями в субстанции могут являться N-(2-бромфенил)акриламид (продукт деструкции бромокаина) и 2-броманилин (как исходный продукт при синтезе и как продукт гидролиза бромокаина).

Исследования по разработке методики количественного определения родственных примесей проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) с диодноматричным детектором (SPD-M20A). Хроматографическая колонка – Zorbax SB-C18 (4,6 × 250 мм, 5 мкм). При выборе оптимальных условий разделения исследуемых веществ в режиме обращенно-фазной жидкостной хроматографии были апробированы элюенты на основе водно-ацетонитрильных смесей. В качестве модификаторов использовали фосфатные буферы с различными значениями pH (3,0; 5,0; 8,0). Поскольку изучаемые вещества характеризуются максимальным поглощением при 210 нм, данная длина волны выбрана для детектирования при анализе примесей.

Наилучшее разделение «идентифицированных» примесей бромокаина наблюдалось при использовании изократического элюирования подвижной фазой состава: фосфатный буфер (pH 3,0) – ацетонитрил (60: 40) при скорости потока 1 мл/мин. Хроматографическое исследование концентрированных растворов субстанции бромокаина (4000 мкг/мл) показало, что в данных условий на хроматограммах обнаруживается дополнительная неидентифицированная примесь с относительным временем удерживания по бромокаину около 1,9, не детектируемая в других условиях (рис. 3).

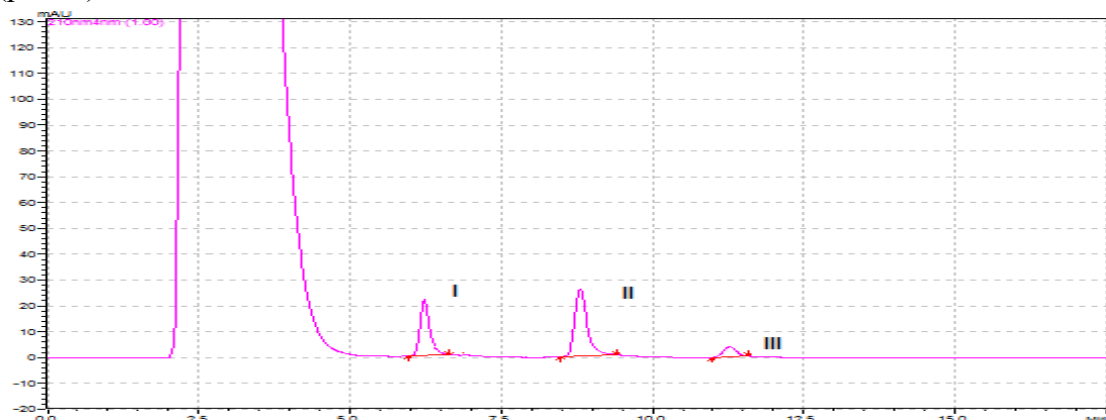


Рисунок 3 – Хроматограмма раствора субстанции бромокаина (4000 мкг/мл):
I – неидентифицированная примесь, II – N-(2-бромфенил)акриламид , III – 2-броманилин

Выбранные хроматографические условия характеризуются высокой эффективностью (не менее 8000 ТТ), достаточной разрешающей способностью и воспроизводимостью. Рассчитанные критерии пригодности хроматографической системы удовлетворяют принятым критериям приемлемости (табл. 3).

Таблица 3 – Оценка пригодности хроматографической системы

Образец	Время удерживания мин.	Разрешение (Rs)	Коэффициент асимметрии пика	Воспроизводимость инъекций (RSD)
Бромокаин	3,20 ± 0,02	-	-	-
Неидентифицир. примесь	6,22 ± 0,02	6,15	1,35	1,05
N-(2-бромфенил)акриламид	8,80 ± 0,02	7,84	1,40	0,87
2-броманилин	11,30 ± 0,03	6,40	1,24	0,52
		Критерии приемлемости		
		Более 2	0,75 – 2,5	Менее 2

Разработанные условия положены в основу методики определения родственных примесей в субстанции бромокаина методом ВЭЖХ. Для приготовления испытуемого раствора 0,1 г субстанции бромокаина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят до метки метанолом (концентрация бромокаина 4000 мкг/мл). Идентификацию и количественное определение идентифицированных примесей осуществляют с использованием стандартных метанольных растворов N-(2-бромфенил)акриламида и 2-броманилина. При оценке содержания неидентифицированных примесей используют разведения испытуемой субстанции до концентрации 4,0 мкг/мл (0,1 % от концентрации бромокаина гидрохлорида в испытуемом растворе).

Хроматографический анализ растворителя (метанола) показал отсутствие пиков со временами удерживания, близкими к временам удерживания бромокаина и примесей, что характеризует специфичность методики.

Линейность методики определяли на 7 уровнях концентрации: от 0,02 % до 0,4 % – для N-(2-бромфенил)акриламида, от 0,0014 % до 0,044 % – для 2-броманилина. Коэффициент корреляции в обоих случаях составил не менее 0,999, что свидетельствует о линейности методики в выбранном диапазоне концентраций (таб. 4-5).

Таблица 4 – Определение линейности методики количественного определения N-(2-бромфенил)акриламида методом ВЭЖХ

Концентрация N-(2-бромфенил)акриламида в калибровочном растворе, мкг/мл	Концентрация, % от содержания бромокаина	Средняя площадь пика (n=3), mAU·min
0,85	0,0213	95188
1,70	0,0425	18576
3,41	0,085	362138
5,12	0,128	573289
6,82	0,171	753534
10,22	0,255	1164350
17,04	0,426	1905517
Уравнение регрессии ($Y = aX + b$); $a = 112011,7$; $b = 0,0$ Коэффициент корреляции r : 0,9998		

Таблица 5 – Определение линейности методики количественного определения 2-броманилина методом ВЭЖХ

Концентрация 2-броманилина в калибровочном растворе, мкг/мл	Концентрация, % от содержания бромокаина	Средняя площадь пика (n=3), mAU·min
0,055	0,00138	7794
0,11	0,00275	13598
0,22	0,0055	26865
0,33	0,0083	42907
0,44	0,011	57927
0,88	0,022	116526
1,76	0,044	227928
Уравнение регрессии ($Y = aX + b$); $a = 130047,7$; $b = 0,0$ Коэффициент корреляции r : 0,9999		

Повторяемость (сходимость) валидируемой методики оценивали при анализе модельных смесей субстанции бромокаина с содержанием примесей на 3 уровнях концентраций: 0,05 %; 0,1 % и 0,15 % – для N-(2-бромфенил)акриламида; 0,005 %; 0,01 % и 0,015 % – для 2-броманилина (таб. 6-7).

Таблица 6 – Оценка повторяемости (сходимости) определения N-(2-бромфенил)акриламида

Содержание N-(2-бромфенил)акриламида в растворе, мкг/мл	Найденное содержание N-(2-бромфенил)акриламида, мкг/мл			Метрологические характеристики (n=6; P=0,95)				
				n	$\bar{X}$	SD	RSD	$\Delta \bar{X}$
1,96 (0,049%)	2,11	1,87	2,07	6	1,99	0,128	6,44	0,17
	1,79	1,91	2,2					
3,92 (0,098%)	3,83	3,74	3,99	6	3,94	0,194	4,93	0,23
	4,21	3,69	4,16					
5,88 (0,147%)	6,08	6,19	5,91	6	5,98	0,142	2,37	0,18
	6,11	5,82	5,74					

Таблица 7 – Оценка повторяемости (сходимости) определения 2-броманилина

Содержание 2-броманилина в растворе, мкг/мл	Найденное содержание 2-броманилина, мкг/мл			Метрологические характеристики (n=6; P=0,95)				
				n	$\bar{X}$	SD	RSD	$\Delta \bar{X}$
0,212 (0,0053%)	0,229	0,216	0,195	6	0,206	0,0164	7,96	0,017
	0,209	0,182	0,202					
0,424 (0,0106%)	0,418	0,442	0,430	6	0,447	0,0323	7,22	0,043
	0,489	0,399	0,503					
0,636 (0,0159%)	0,711	0,632	0,619	6	0,670	0,0581	8,67	0,062
	0,606	0,754	0,698					

Установлено, что относительное стандартное отклонение (RSD) результатов измерений не превышает 10 %, что свидетельствует об их удовлетворительной сходимости на всех уровнях рассмотренных концентраций.

Внутрилабораторная прецизионность разработанной методики установлена по результатам анализа модельных смесей (раствора субстанции бромокаина с содержанием N-(2-бромфенил)акриламида 0,1 % и 2-броманилина 0,01 %) двумя химиками-аналитиками в разные дни. Полученные значения критерия Фишера (1,89 – для N-(2-бромфенил)акриламида; 1,05 – для 2-броманилина) не превышают табличных (5,05), что свидетельствует о незначимости различий между результатами измерений.

Правильность методики оценивали с помощью тестирования открываемости идентифицируемых примесей. Исследования проводили на трех уровнях концентраций примесей (табл. 8-9). Границы открываемости (2-бромфенил)акриламида и 2-броманилина с учетом доверительного интервала не выходят за нормируемые пределы (80–120 % – для примесей с содержанием до 0,05 %; 85–115 % – с содержанием от 0,051 до 0,50 %), что свидетельствует о правильности методики.

Таблица 8 – Оценка правильности определения N-(2-бромфенил)акриламида

Содержание (2-бромфенил)акриламида, %	Открываемость (R), %			Метрологические характеристики (n=6; P=0,95)				
				n	$\bar{R}$	SD	RSD	$\Delta \bar{R}$
0,05	94,15	104,30	88,18	6	98,13	7,68	7,82	8,56
	90,52	107,29	104,33					
0,1	104,72	96,22	100,9	6	99,73	5,55	5,57	6,38
	93,71	108,64	94,18					
0,15	97,30	101,17	104,62	6	100,77	3,39	3,37	4,26
	99,59	106,16	95,76					

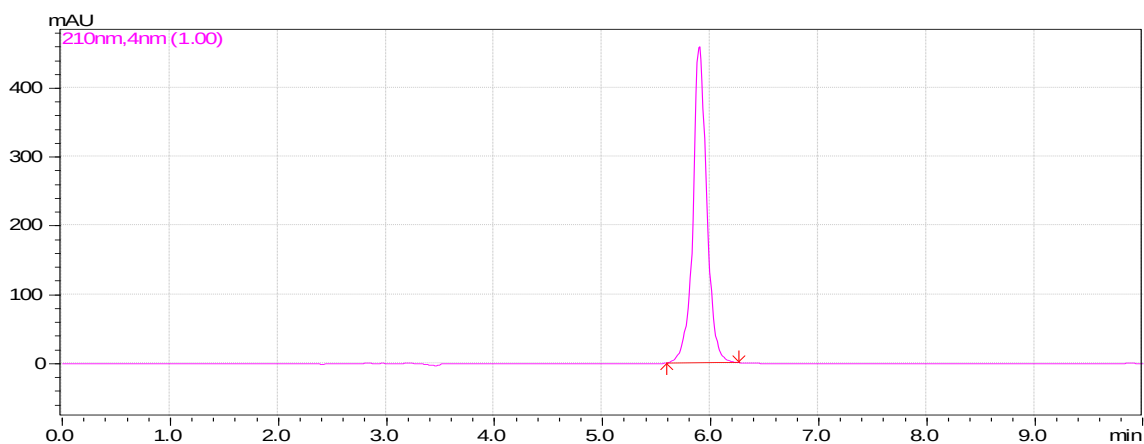
Таблица 9 – Оценка правильности определения 2-броманилина

Содержание 2-броманилина, %	Открываемость (R), %			Метрологические характеристики (n=6; P=0,95)				
				n	$\bar{R}$	SD	RSD	$\Delta \bar{R}$
0,005	107,2	98,23	104,26	6	101,04	5,65	5,59	6,81
	96,3	92,05	108,19					
0,01	99,59	106,82	114,34	6	103,55	6,91	6,67	7,84
	95,02	108,37	97,17					
0,015	105,36	96,01	101,25	6	103,16	7,42	7,19	7,90
	115,35	94,96	106,03					

На основании данных, полученных при анализе 4 серий субстанции, предложено нормировать содержание: 2-броманилина – не более 0,01%; N-(2-бромфенил)акриламида – не более 0,10 %; единичной неидентифицированной примеси с относительным временем удерживания 1,9 по бромокаину – не более 0,10 %; любой другой примеси – не более 0,10 %; общее содержание примесей – не более 0,50 %.

При разработке аналитической методики для установления подлинности и количественного определения бромокаина в субстанции методом ВЭЖХ в качестве элюента использована подвижная фаза на основе фосфатного буфера (pH3) и ацетонитрила, предложенная для анализа «родственных» примесей. Оптимальных характеристик удерживания бромокаина удалось достичь при 20 % содержании ацетонитрила в элюенте (рис. 4). Содержание бромокаина (%) в субстанции рассчитывали с использованием рабочего стандартного образца (PCO).

Проверка специфичности разработанной методики в процессе валидации осуществлялась путем анализа хроматограмм испытуемого раствора субстанции, раствора стандартного образца и растворителя. Установлено, что времена удерживания бромокаина на хроматограммах испытуемого раствора и PCO совпадают, на хроматограмме растворителя (10% метанола в ПФ) отсутствуют пики, мешающие определению основного аналита.



**Рисунок 4 – Хроматограмма раствора субстанции бромокаина
(ПФ: фосфатный буферный раствор (рН 3,0) – ацетонитрил (80:20))**

Линейность методики количественного определения бромокаина в субстанции оценивали по результатам анализа калибровочных растворов (таблица 10), приготовленных из стандартного образца в диапазоне концентраций от 80 до 120% от номинальной концентрации испытуемого раствора (100 мкг/мл). Калибровочный график представлен на рис. 5.

Таблица 10 – Определение линейности методики количественного определения бромокаина в субстанции

Навеска бромокаина, г (% от номинальной концентрации)	Концентрация бромокаина в калибровочном растворе, мкг/мл	Средняя площадь пика (n=3), mAU·min
0,08020 (≈ 80%)	80,20	2999110
0,08985 (≈ 90%)	89,85	3333785
0,10010 (≈ 100%)	100,10	3707940
0,11030 (≈ 110%)	110,30	4092129
0,12015 (≈ 120%)	120,15	4460772
Уравнение регрессии ($Y = aX + b$); $a = 37134,01$; $b = 0,0$ Коэффициент корреляции r : 0,9999		

Полученный коэффициент корреляции 0,9999 указывает на линейность отклика детектора от концентрации бромокаина в растворе.

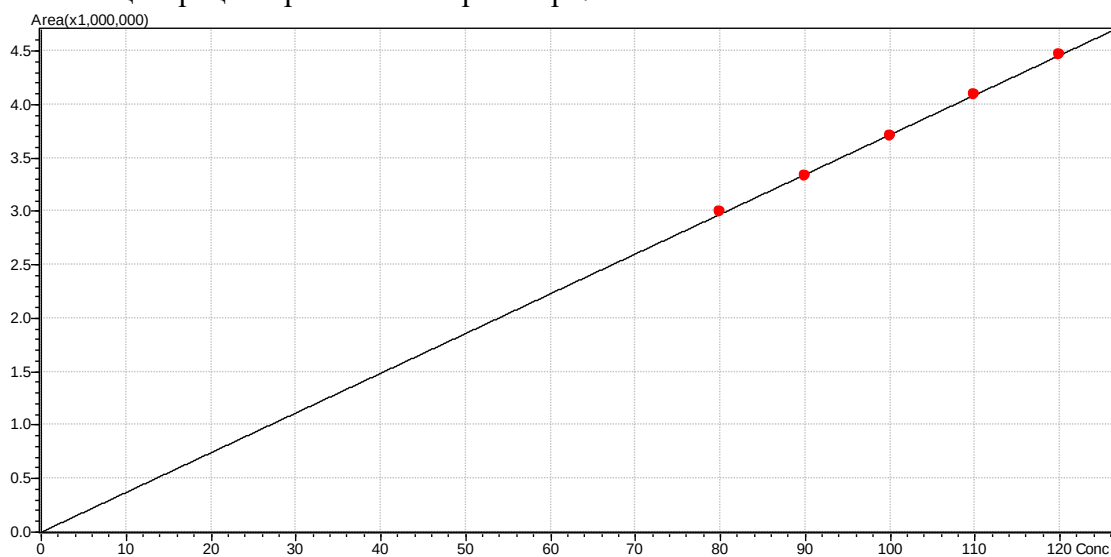


Рисунок 5 – Зависимость площади хроматографического пика от концентрации бромокаина

Правильность аналитической методики оценивали путем анализа растворов с известным содержанием стандарта бромокаина на трех уровнях концентраций (80 %, 100 %, 120 % от номинальной). Доверительные интервалы полученных средних результатов анализа включают значения, принимаемые за истинные (таб. 11).

Таблица 11 – Оценка правильности методики количественного определения бромокаина методом ВЭЖХ

№	80 %			100 %			120 %		
	Введено, г	Найдено, г	R	Введено, г	Найдено, г	R	Введено, г	Найдено, г	R
1	0,08125	0,08132	100,09	0,09890	0,09874	99,84	0,12115	0,12082	99,73
2	0,08080	0,08075	99,94	0,11005	0,10984	99,81	0,11965	0,12004	100,33
3	0,08215	0,08208	99,91	0,10450	0,10424	99,76	0,12200	0,12176	99,80
4	0,07990	0,07999	100,11	0,10245	0,10254	100,09	0,12080	0,12001	99,35
5	0,08310	0,08217	98,88	0,09950	0,09944	99,94	0,11950	0,11955	100,04
6	0,08105	0,08107	100,02	0,10175	0,10182	100,07	0,12035	0,12047	100,10
	$R \pm \Delta R$ 99,83 $\pm$ 0,49			$R \pm \Delta R$ 99,92 $\pm$ 0,15			$R \pm \Delta R$ 99,89 $\pm$ 0,36		

При оценке повторяемости и внутрилабораторной прецизионности в соответствии с разработанной методикой был проанализирован образец субстанции бромокаина (20.05.2012) двумя аналитиками на одном оборудовании (хроматографе) в течение двух рабочих дней. По результатам каждого из аналитиков рассчитывали средний результат ($X_{\text{ср}}$), стандартное отклонение (SD), относительное стандартное отклонение (RSD) и дисперсии этих данных (таб. 12).

Относительное стандартное отклонение результатов анализа каждого из аналитиков не превышает 0,5 %, что свидетельствует о хорошей сходимости результатов. Для оценки внутрилабораторной воспроизводимости методики по результатам измерений двумя аналитиками рассчитывали критерий Фишер. Величина расчетного значения критерия Фишера оказалась меньше табличного значения, что говорит о статистически незначимом различии между результатами определений двумя аналитиками.

Таблица 12 – Определение прецизионности методики количественного определения бромокаина в субстанции методом ВЭЖХ

Найденное содержание бромокаина, %						
Результаты 1 аналитика				Результаты 2 аналитика		
99,71 100,17 100,06				100,23 98,98 99,32		
99,58 99,19 99,42				99,71 99,58 99,16		
Метрологические характеристики (n= 6, P=95%)						
X _{ср}	99,69			99,50		
SD	0,38			0,45		
RSD	0,38			0,45		
S ²	0,1444			0,2025		
F _{расч.}	1,43					
F _{табл.}	5,05 (P=95 %, f ₁ и f ₂ = 5)					

В ходе сравнительной оценки разработанной методики количественного определения бромокаина в субстанции методом ВЭЖХ с методикой, ранее включенной в нормативную документацию (экстракционное титрование), установлена их сопоставимость по воспроизводимости (сходимости) получаемых результатов.

В пятой главе приводятся результаты разработки и валидации методик количественного определения и определения родственных примесей в трансдермальной терапевтической системе бромакаина 0,05 г и 0,10 г.

В качестве исходных были апробированы условия ВЭЖХ, предложенные для количественного определения бромакаина в субстанции. Разработку методики проводили с использованием хроматографической колонки Discovery® C18 (5 мкм, 250×4,6 мм, Phenomenex). С учетом хорошей растворимости бромакаина предложен вариант пробоподготовки ТТС к хроматографическому анализу по показателю «Количественное определение», основанный на трехкратном настаивании с водой на водяной бане (температура не выше 40 °С) при периодическом перемешивании. Для расчета количественного содержания бромакаина в ТТС использован метод внешнего стандарта (стандартный раствор бромакаина с концентрацией 100 мкг/мл).

Специфичность методики подтверждена путем хроматографического анализа испытуемого раствора, раствора стандартного образца бромакаина и раствора «плацебо». Для приготовления раствора «плацебо» использовали пластыри без содержания действующего вещества. Время удерживания бромакаина на хроматограммах раствора РСО и испытуемого раствора составило $5,80 \pm 0,02$ мин. Коэффициент асимметрии пика бромакаина, характеризующий надежность определения границ пика, равен 1,07 (рекомендуемое значение – от 0,8 до 1,5). Относительное стандартное отклонение (RSD) площадей пиков бромакаина (воспроизводимость инъекций) для трёх последовательных инъекций составило 0,84 %, что соответствует критериям приемлемости (не более 2 %). Анализ хроматограммы раствора «плацебо» показал отсутствие мешающих определению целевого аналита посторонних пиков, что свидетельствует о специфичности предложенных условий.

Для доказательства линейности методики использовали модельные растворы на основе пластырей «плацебо» с добавлением известного количества бромакаина до получения концентраций в диапазоне от 50 до 150 мкг/мл (50 % – 150 % от номинального содержания).

Градуировочный график представлен на рисунке 6. Рассчитанный коэффициент корреляции (0,9998) позволяет использовать разработанную методику в указанном диапазоне концентраций исследуемого вещества.

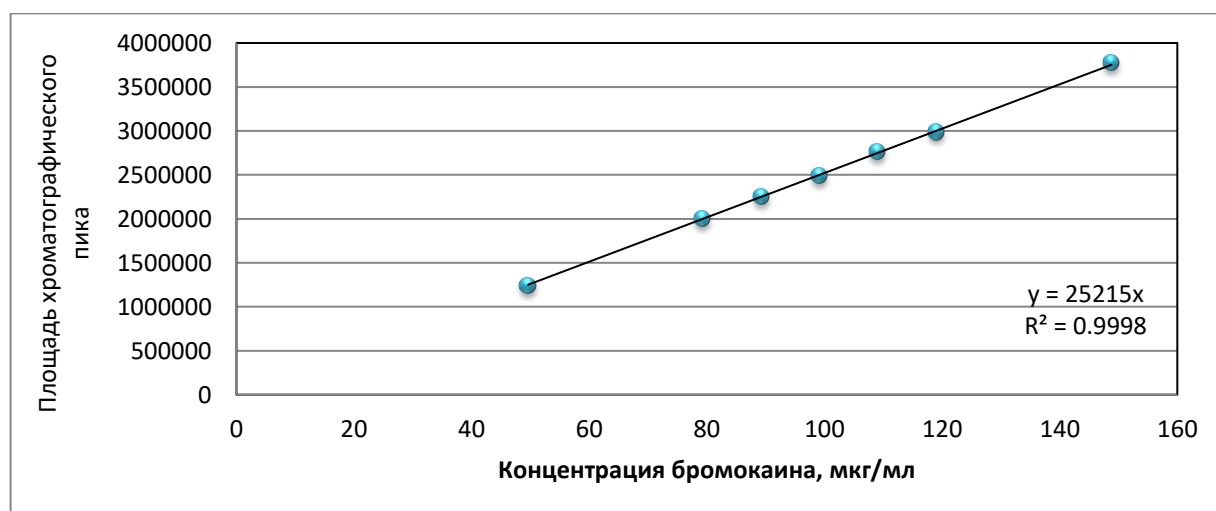


Рисунок 6 – График зависимости площади хроматографического пика от концентрации бромакаина в растворе

Объектом исследования для оценки методики по параметрам «Повторяемость» и «Внутрилабораторная прецизионность» были однородные образцы пластырей с содержанием бромокаина 0,05 г и 0,10 г. Готовили по шесть испытуемых растворов для каждой дозировки ТТС. Результаты оценки прецизионности методик представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Определение прецизионности методики количественного определения бромокаина в ТТС 0,05 г и 0,10 г

№ п/п	ТТС 0,05 г		ТТС 0,10 г	
	Найденное содержание бромокаина, г		Найденное содержание бромокаина, г	
	1 аналитик	2 аналитик	1 аналитик	2 аналитик
1	0,0479	0,0488	0,0966	0,0997
2	0,0489	0,0504	0,0992	0,0965
3	0,0492	0,0481	0,0997	0,0987
4	0,0481	0,0496	0,0969	0,0972
5	0,0495	0,0478	0,0986	0,0988
6	0,0502	0,0486	0,0959	0,0977
Метрологические характеристики (n= 6, P=95%)				
X _{ср}	0,0490	0,0489	0,0978	0,0981
SD	0,0009	0,00097	0,0015	0,0012
RSD	1,84	1,98	1,53	1,22
S ²	0,00000081	0,00000097	0,00000225	0,00000144
F _{расч.}	1,08		1,56	
F _{табл.}	5,05 (P=95 %, f ₁ и f ₂ = 5)			

Полученные значения RSD результатов анализа, полученными каждым из аналитиков не превышают 2 %, что является приемлемым при анализе лекарственных форм методом ВЭЖХ. Величины расчетных значений критерия Фишера меньше табличного значения, что говорит о статистически незначимом различии между результатами определений, полученных двумя аналитиками.

Для определения правильности методики количественного определения бромокаина в ТТС был использован метод введенного в плацебо аналита на уровнях 80, 100 и 120 % от его номинальной концентрации в испытуемом растворе. Правильность выражали в виде открываемости (R) известного количества введенного бромокаина. Результаты исследования представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Определение правильности методики количественного определения бромокаина в ТТС 0,05 г и 0,10 г

ТТС 0,05 г									
№	80 %			100 %			120 %		
	Введено, г	Найдено, г	R	Введено, г	Найдено, г	R	Введено, г	Найдено, г	R
1	0,03985	0,03951	99,15	0,05160	0,05094	98,72	0,05795	0,05771	99,59
2	0,04010	0,03966	98,90	0,05015	0,05020	100,10	0,06180	0,06051	97,91
3	0,04065	0,04067	100,05	0,04990	0,04991	100,02	0,05940	0,05989	100,82
4	0,03890	0,03883	99,82	0,04805	0,04725	98,34	0,06245	0,06319	101,18
5	0,04105	0,04141	100,87	0,05265	0,05244	99,60	0,06085	0,06171	101,41
6	0,04075	0,04084	100,22	0,05080	0,04986	98,15	0,06115	0,06040	98,77
	R ± ΔR 99,84 ± 0,76			R ± ΔR 99,16 ± 0,90			R ± ΔR 99,95 ± 1,49		

ТТС 0,10 г									
№	80 %			100 %			120 %		
	Введено, г	Найдено, г	R	Введено, г	Найдено, г	R	Введено, г	Найдено, г	R
1	0,08120	0,07966	98,10	0,09825	0,10464	100,02	0,12360	0,12510	101,21
2	0,07805	0,07830	100,32	0,11110	0,09785	99,97	0,11955	0,12017	100,52
3	0,08340	0,08167	97,92	0,09890	0,09769	100,09	0,11780	0,11708	99,39
4	0,08050	0,07978	99,11	0,10310	0,10782	99,92	0,12090	0,12334	102,02
5	0,07995	0,07910	98,94	0,11055	0,10702	99,71	0,12365	0,12207	98,72
6	0,08175	0,08188	100,16	0,09970	0,10097	100,10	0,11970	0,11987	100,14
	$R \pm \Delta R$ 99,09 $\pm$ 1,05			$R \pm \Delta R$ 100,16 $\pm$ 1,20			$R \pm \Delta R$ 100,33 $\pm$ 1,26		

Границы открываемости бромокаина с учетом доверительных интервалов не выходят за пределы 98,0 – 102,0 %, что свидетельствует о валидности методики по показателю правильность.

Методику количественного определения родственных примесей бромокаина в ТТС разрабатывали с целью включения в соответствующую нормативную документацию (проект НД), а также для изучения стабильности лекарственного препарата.

В качестве растворителя для приготовления испытуемого раствора при определении родственных примесей в ТТС был использован метанол. Количественное определение идентифицированных примесей в ТТС проводили с использованием стандартных растворов 2-броманилина и N-(2-бромфенил)акриламида (метод внешнего стандарта). Хроматографический анализ осуществляли на разделительной колонке Discovery® C18 (5 мкм, 250×4,6 мм, Phenomenex) в условиях, разработанных для субстанции бромокаина Объем вводимой пробы – 20 мкл.

Времена удерживания бромокаина, N-(2-бромфенил)акриламида и 2-броманилина составили 3,23 мин, 8,83 мин, 11,21 мин. соответственно. Анализ хроматограмм раствора плацебо и растворителя показал отсутствие мешающих определению посторонних пиков. Рассчитанные параметры пригодности хроматографической системы представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Параметры пригодности хроматографической системы

Образец	Время удерживания мин.	Разрешение (Rs)	Фактор асимметрии пика	Воспроизводимость инъекций (RSD)
Бромокаин	3,23 $\pm$ 0,02	-	-	-
N-(2-бромфенил)акриламид	8,83 $\pm$ 0,02	6,9	1,21	0,91
2-броманилин	11,21 $\pm$ 0,03		1,29	1,52
		Критерии приемлемости		
		Более 2	0,75 – 2,5	Менее 2

Для доказательства линейности методики были приготовлены и проанализированы метанольные растворы на основе плацебо с добавлением 2-N-(2-бромфенил)акриламида и 2-броманилина до получения концентраций от 1 до 10 мкг/мл (от 0,05 % – 0,5 % от содержания действующего вещества). В результате обработки экспериментальных данных получены уравнения линейной регрессии для N-(2-бромфенил)акриламида $S = 41169 \times C$; для 2-броманилина $S = 130830 \times C$ с коэффициентами корреляции 0,9986; и 0,9997, соответственно

(рис.7). Полученные данные свидетельствуют о линейности методики в исследованном диапазоне концентраций.

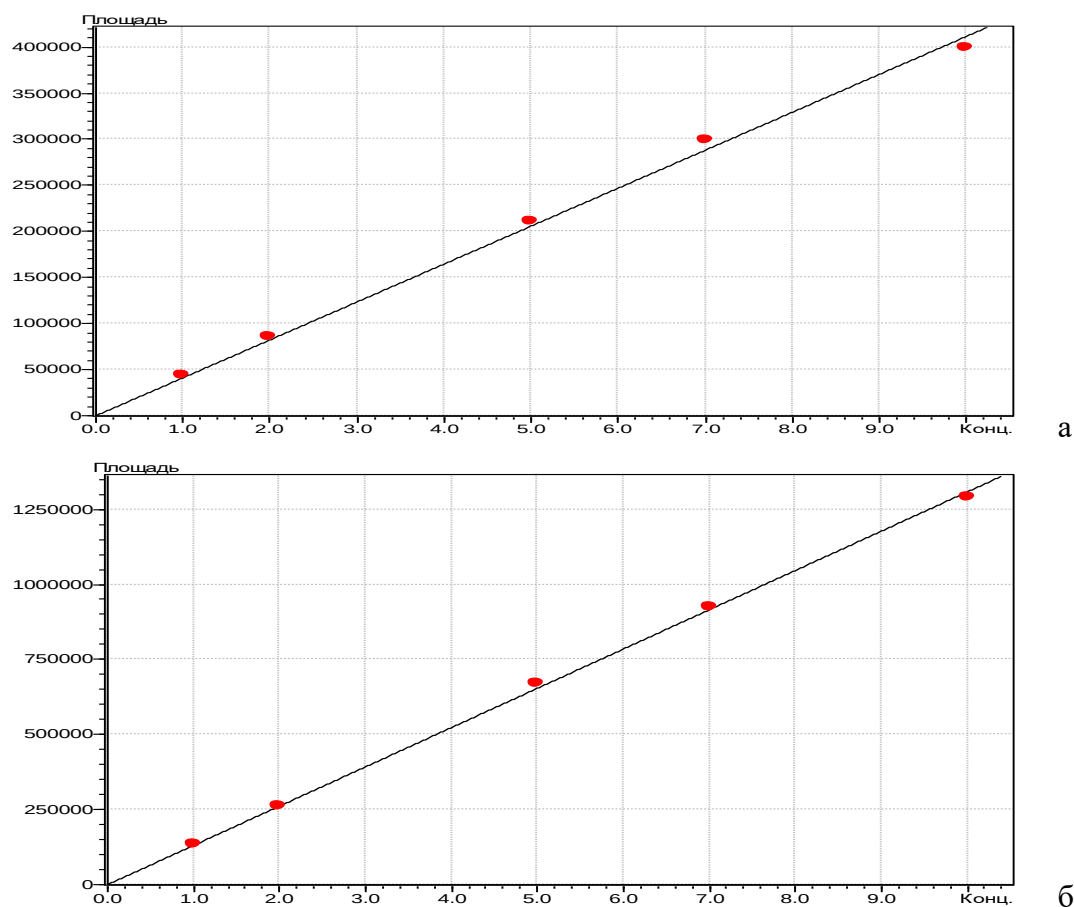


Рисунок 7 – Градуировочные графики количественного определения N-(2-бромфенил)акриламида (а) и 2-броманилина (б) в ТТС методом ВЭЖХ

При определении правильности методики рассчитывали открываемость известного количества посторонних примесей, введенных в раствор плацебо. Исследования проведены на четырех уровнях содержания примесей: 0,05 %, 0,1 %, 0,25 % и 0,5 % от содержания бромокаина в ТТС бромокаина (таб. 16 -17).

Таблица 16 – Оценка правильности методики определения N-(2-бромфенил)акриламида

Содержание в модельном растворе, мкг/мл (% от содержания бромокаина)	Открываемость, (R), %			Метрологические характеристики (P=0,95; n=6)			
				R _{ср.}	SD	RSD	ΔR
1 (0,05%)	87,19	97,90	90,67	93,63	7,21	7,70	7,56
	94,52	105,28	86,20				
2 (0,1%)	105,31	100,09	89,93	97,35	5,25	5,39	5,51
	96,20	94,25	98,31				
5 (0,25%)	96,11	102,32	103,89	98,46	3,70	3,76	3,88
	94,98	96,18	97,30				
10 (0,5%)	100,16	100,10	97,67	99,51	1,43	1,44	1,50
	98,34	101,66	99,13				

Таблица 17– Оценка правильности методики определения 2-броманилина

Содержание в модельном растворе, мкг/мл (% от содержания бромокаина)	Открываемость, (R), %			Метрологические характеристики (P=0,95; n=6)			
				R _{ср.}	SD	RSD	ΔR
1 (0,05%)	93,09 98,15	89,94 99,20	97,27 88,48	94,36	4,52	4,79	4,74
2 (0,1%)	93,27 89,08	97,51 100,19	102,30 93,05	95,90	4,97	5,18	5,21
5 (0,25%)	95,37 99,40	97,04 103,04	94,32 94,12	97,22	3,47	3,57	3,64
10 (0,5%)	101,52 98,38	97,87 100,22	105,11 97,45	100,09	2,90	2,90	3,04

Границы открываемости N-(2-бромфенил)акриламида и 2-броманилина не выходят за пределы 85–115 %, рекомендованные при количественном определении примесей с нормой содержания от 0,1 до 1 %, что свидетельствует о правильности методики.

Оценку прецизионности (вариант повторяемости) разработанной методики проводили на модельных растворах. Для этого готовили по 6 испытуемых растворов на основе пластырей «плацебо» с добавлением определяемых примесей в концентрации 0,1 % от концентрации бромокаина. Результаты исследования представлены в таблице 18.

Таблица 18 – Оценка повторяемости методики определения родственных примесей в ТТС бромокаина

Примесь	Найденное содержание примесей (%)			Метрологические характеристики (P = 0,95; n=6)		
				X _{ср}	SD	RSD
N-(2-бромфенил) акриламид	0,1011 0,1003	0,0989 0,0977	0,0982 0,0993	0,0993	0,0013	1,31
2-броманилин	0,0960 0,1090	0,0923 0,0975	0,0898 0,0879	0,0954	0,0076	7,97

Относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышает 10,0%, что свидетельствует об удовлетворительной сходимости результатов при определении примесей.

Шестая глава посвящена разработке методик определения бромокаина в биологических объектах (плазме крови, органах лабораторных животных) методом микроколоночной ВЭЖХ для исследования фармакокинетики.

В работе использован микроколоночный жидкостный хроматограф "Милихром А-02" (ЗАО ИХ "ЭкоНова", Новосибирск, Россия) с колонкой размером 2 × 75 мм (сорбент ProntoSIL 120-5 C18 AQ) и спектрофотометрическим детектором.

Разработаны следующие условия ВЭЖХ, позволяющие селективно определять бромокаин в извлечениях из биообъектов : элюент А – 0,1 % раствор трифторуксусной кислоты, элюент В – ацетонитрил; режим элюирования градиентный: возрастание доли ацетонитрила с 10 % до 70 % за 20 минут; скорость потока элюента – 100 мкл/мин; детектирование – многоволновое (210 (опорная длина волны), 220, 230, 240, 250, 260, 280, 300 нм); температура термостата – 40 °С. Время удерживания бромокаина составляет 9,94±0,05 мин.

Предложен эффективный способ пробоподготовки крови к последующему хроматографическому анализу на основе экстракции бромокаина хлороформом после предварительного осаждения белков плазмы ацетонитрилом. Данный способ предполагает работу с малыми количествами пробы (объем плазмы – 0,5 мл), что позволяет использовать его в фармакокинетических исследованиях на лабораторных животных.

В ходе анализа модельных смесей плазмы с различным содержанием вещества установлено, что бромокаин эффективно (более 72%) и воспроизводимо (RSD не превышает 10%) извлекается из плазмы крови на всех уровнях концентраций (таб. 19).

Таблица 19 – Метрологические характеристики методики определения бромокаина в плазме крови методом ВЭЖХ

Концентрация бромокаина в модельной смеси, нг/мл	Степень извлечения (%)						Метрологические характеристики (n=6; P=0,95)		
							$\bar{x}$	SD	RSD
52	72,62	69,94	80,23	67,53	74,08	68,60	72,17	4,6	6,37
104	77,55	83,19	73,45	70,81	79,20	68,90	75,52	5,4	7,15
520	89,13	84,40	90,06	82,24	79,43	87,19	85,41	4,1	4,80
1040	90,78	87,70	83,66	81,15	84,48	78,09	84,31	4,5	5,34
5200	83,17	86,49	78,18	81,53	89,32	82,96	83,61	3,9	4,66

Валидационную оценку разработанной биоаналитической методики проводили по следующим параметрам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность, предел количественного определения, стабильность. Специфичность разработанных условий была оценена путем сравнения хроматограмм экстрактов холостого образца плазмы и модельной смеси плазмы с известным содержанием аналита. Анализ хроматограмм «холостого» опыта показал отсутствие пиков эндогенных веществ плазмы, близких по времени удерживания с пиком бромокаина. Коэффициент разделения пика бромокаина и соседних пиков составил не менее 5.

Линейность разработанной методики была оценена путем анализа 8 образцов модельных смесей плазмы с содержанием бромокаина от 42 до 2100 нг/мл. Коэффициент корреляции составил 0,9963. Предел количественного определения бромокаина в плазме – 40 нг/мл.

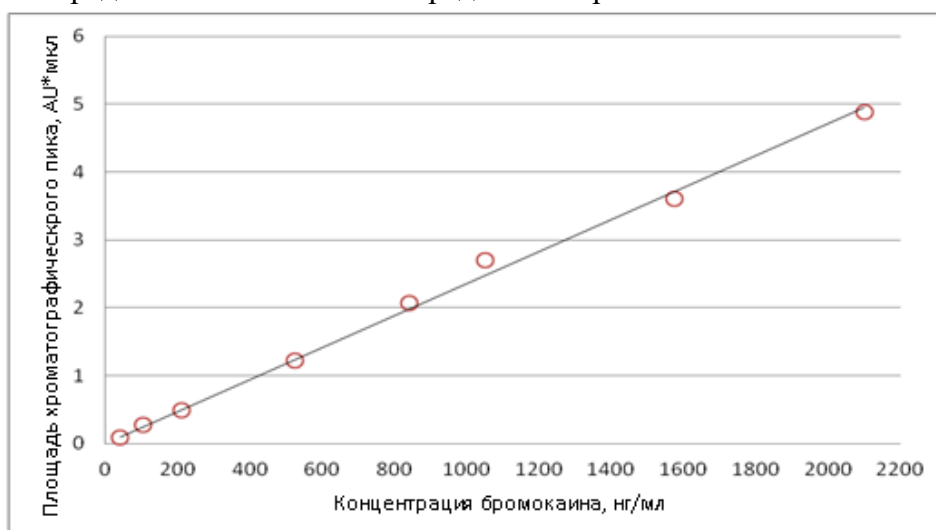


Рисунок 8 – Калибровочный график количественного определения бромокаина в плазме крови методом ВЭЖХ

Для доказательства прецизионности и правильности разработанной методики анализировали по 6 модельных образцов плазмы на 5 уровнях концентраций бромокаина. Прецизионность и правильность методики оценивались по величинам относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ϵ , %), соответственно. Полученные результаты контроля не превышают 15 %, допускаемых для биоаналитических методик, что свидетельствует о воспроизводимости результатов анализа и отсутствии значимых систематических ошибок (таб. 20).

Таблица 20 – Результаты оценки прецизионности и правильности методики количественного определения бромокаина в плазме крови методом ВЭЖХ

Концентрация бромокаина в модельной смеси, нг/мл	Найденная концентрация (нг/мл), $\bar{X}$, (n = 6)	SD	RSD, %	ϵ , %
39	40,3	3,5	8,7	3,3
117	119,5	8,4	7,1	2,1
468	460,4	20,1	4,4	-1,6
936	906,8	16,3	1,8	-3,2
1404	1387,3	59,2	4,3	-1,2

Стабильность бромокаина оценивалась путем анализа образцов контроля качества (при низких (39 нг/мл) и высоких концентрациях (1404 нг/мл)), подвергшихся воздействию различных температурных условий в течение разных временных интервалов. Результаты сравнивали с результатами анализа свежеприготовленных образцов. Исследованы следующие виды стабильности бромокаина:

- краткосрочная стабильность в биологическом образце при комнатной температуре (12 часов);
- стабильность в плазме крови после трех циклов заморозки – разморозки;
- стабильность образца после пробоподготовки при комнатной температуре (5 часов);
- стабильность при хранении биологического образца в замороженном виде при температуре -40 °C (срок хранения – 6 месяцев).

Установлено, что бромокаин стабилен в плазме крови при длительном хранении при температуре -40 °C. Изолированный бромокаин устойчив после проведения пробоподготовки в течение 5 часов. Однако, в малых концентрациях соединение неустойчиво при повторных циклах заморозки – разморозки и при хранении образцов плазмы при комнатной температуре. Нормализованный модуль разницы концентраций превысил рекомендованные для этого вида исследований 15 %.

Для изолирования бромокаина из органов лабораторных животных использовали методику, разработанную для целей химико-токсикологического анализа, основанную на настаивании измельченного объекта подкисленным ацетонитрилом (pH 2), с последующей экстракцией аналита петролейным эфиром при pH 10-11. На модельных смесях проведена оценка эффективности изолирования бромокаина из указанных объектов (таб. 21). Для приготовления модельных смесей ткани и органы животных гомогенизировали, добавляли 1 мг бромокаина и оставляли на 6 часов при комнатной температуре.

Таблица 21 – Эффективность извлечения бромокаина из биологических объектов (модельных смесей)

Исследуемые органы	Степень извлечения, % $\bar{X}$, (n = 6)	SD	RSD, %
Кожа	72,38	3,01	4,16
Почки	83,43	3,09	3,70
Печень	79,40	3,21	4,04

Установлено, что при использовании данной методики извлекается более 70 % бромокаина, внесенного в модельную смесь.

Методика была апробирована на лабораторных животных (крысах и кроликах) после фиксации трансдермальной терапевтической системы (ТТС) с бромокаином. Параллельно исследовали органы контрольной группы животных (без нанесения ТТС), а также стандартный раствор бромокаина. Пример хроматограммы извлечения из плазмы кролика через 16 часов после нанесения ТТС 0,10 представлен на рис. 9.

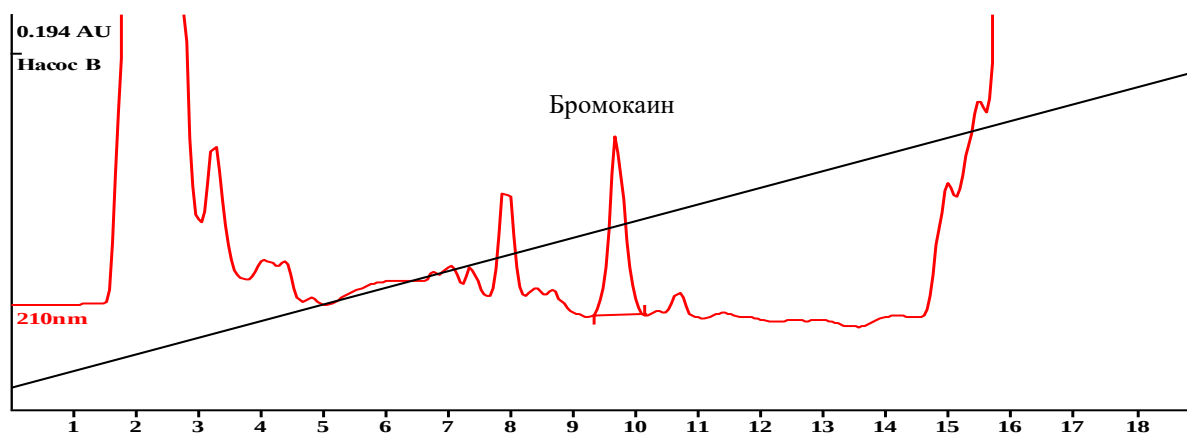


Рисунок 10 – Хроматограмма извлечения из плазмы крови кролика

Установлено, что время удерживания бромокаина на хроматограммах извлечений соответствует времени удерживания вещества на хроматограмме стандартного раствора. Анализ извлечений органов животных контрольной группы показал отсутствие посторонних пиков на времени удерживания бромокаина. Таким образом, доказана специфичность разработанных хроматографических условий для анализа бромокаина в извлечениях из органов и тканей лабораторных животных и их пригодность для использования в фармакокинетических исследованиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработана и валидирована методика количественного определения остаточного органического растворителя ацетона в субстанции бромокаина методом ГЖХ на капиллярной колонке HP-FFAP с использованием внутреннего стандарта. Для извлечения аналитов из водных растворов для дальнейшего анализа методом ГЖХ/ПИД предложен современный вариант статической парофазной экстракции.
2. Выбраны условия определения идентифицированных (2-броманилина и N-(2-бромфенил)акриламида) и неидентифицированных «родственных» примесей методом обращенно-фазной ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием в субстанции бромокаина. Проведена валидация методики количественного определения идентифицированных «родственных примесей» по показателям специфичность, линейность, правильность и прецизионность.
3. По результатам исследования серийных образцов субстанций установлены нормы содержания примесей: 2-броманилина – не более 0,01%; N-(2-бромфенил)акриламида – не более 0,10 %; единичной неидентифицированной примеси с относительным временем удерживания 1,9 по бромокаину – не более 0,10 %; любой другой примеси – не более 0,10 %; общее содержание примесей – не более 0,50%.
4. Разработана и валидирована методика количественного определения бромокаина в субстанции методом ВЭЖХ с использованием рабочего стандартного образца.

5. Разработаны и валидированы хроматографические методики оценки качества трансдермальной терапевтической системы бромокаина по показателям «Количественное определение» и «Родственные примеси». Полученные в процессе валидации результаты соответствуют критериям приемлемости и подтверждают пригодность методик заявленному назначению.
6. Для целей изучения фармакокинетики разработаны условия определения бромокаина в плазме крови методом градиентной микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием. Предложен эффективный способ пробоподготовки плазмы крови к последующему хроматографическому анализу на основе экстракции бромокаина из биожидкости после предварительного осаждения белков ацетонитрилом. В ходе валидации биоаналитической методики оценены специфичность условий, линейность, правильность и воспроизводимость получаемых результатов, а также стабильность бромокаина в образцах плазмы крови. Установлено, что разработанные хроматографические условия являются специфичными и для анализа бромокаина в извлечениях из органов лабораторных животных.

Основные положения диссертационной работы опубликованы:

1. Сабирзянов, Д. Р. Общая характеристика трансдермальных терапевтических систем / Д. Р. Сабирзянов, Ламзури Марва // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии: научно-практический журнал. – 2012. – № 9. – С. 243-244.
2. Карпенко, Ю. Н. Разработка условий хроматографического определения местноанестезирующего средства анилокаина в крови для целей изучения фармакокинетики / Ю. Н. Карпенко, Д. Р. Сабирзянов, Т. Л. Малкова // Роль та місце медицини у забезпеченні здоров'я людини у сучасному суспільстві : збірник наукових робіт учасників міжнародної науково-практичної конференції. – Одеса, 2013. – С. 9-11.
3. **Сабирзянов, Д. Р.** Определение анилокаина в органах лабораторных животных в условиях модельного эксперимента / **Д. Р. Сабирзянов**, Ю. Н. Карпенко // Проблемы разработки новых лекарственных средств : материалы первой Всерос. науч.-практ. конф. молодых ученых. – Москва, 2013. – С. 108.
4. **Сабирзянов, Д. Р.** Оптимизация условий пробоподготовки плазмы крови к хроматографическому исследованию для изучения фармакокинетики анилокаина / **Д. Р. Сабирзянов**, Ю. Н. Карпенко // Современная фармация: образование, наука, бизнес : мат. науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 50-летию фарм. фак. – Тюмень, 2014. – С. 193-195.
5. **Сабирзянов, Д. Р.** Валидационная оценка хроматографической методики определения анилокаина в плазме крови [Электронный ресурс] / **Д. Р. Сабирзянов**, Ю. Н. Карпенко // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 2 (2 часть). - Режим доступа : <http://science-education.ru/ru/article/view?id=23077>.
6. **Sabirzyanov, D. R.** Selecting the conditions of anilocaïne's chromatographic determination in biological object extracts / **D. R. Sabirzyanov**, J. N. Karpenko // Topical issues of new drugs development. – 2016. – Vol. 1. – P. 216.
7. **Определение посторонних примесей в субстанции анилокаина методом ВЭЖХ / Д. Р. Сабирзянов, Ю. Н. Карпенко, Т. Л. Малкова, И. В. Алексеева // Фармация и фармакология. – 2017. – Т. 5, № 3. – С. 254-266.**
8. **Сабирзянов, Д. Р.** Анализ остаточных растворителей в субстанции анилокаина / **Д. Р. Сабирзянов, Е. Ю. Тумилович, Ю. Н. Карпенко** // Журнал научных статей «Здоровье и образование в XXI веке». – 2017. – Vol. 19, № 10. – С. 359-362.

Сабирзянов Денис Робертович (Россия)

Разработка хроматографических методик для стандартизации субстанции бромокаина, его трансдермальной лекарственной формы и проведения биоаналитических исследований

Разработаны и валидированы методики на основе высокоэффективных хроматографических методов (ВЭЖХ, ГЖХ) для стандартизации субстанции бромокаина и его трансдермальной терапевтической формы.

Для целей изучения фармакокинетики разработаны условия определения бромокаина в плазме крови методом градиентной микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием. В ходе валидации биоаналитической методики оценены специфичность условий, линейность, правильность и воспроизводимость получаемых результатов, а также стабильность бромокаина в образцах плазмы крови.

Sabirzyanov Denis Robertovich (Russia)

Development of chromatographic techniques for the standardization of the substance of bromocaine, its transdermal dosage form and conducting bioanalytical studies

Developed and validated techniques based on high-performance chromatographic methods (HPLC, GLC) for the standardization of the substance of bromocaine and its transdermal therapeutic form.

For the purpose of studying pharmacokinetics, the conditions for the determination of bromocaine in blood plasma by the method of gradient microcolumn high performance liquid chromatography with spectrophotometric detection have been developed. During the validation of the bioanalytical method, the specificity of the conditions, linearity, accuracy and reproducibility of the results obtained, as well as the stability of bromocaine in blood plasma samples were evaluated