Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Сабирзянов Денис Робертович

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

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель: кандидат фармацевтических наук, доцент Карпенко Ю.Н.

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
введение	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. 1	1
1.1 Бромокаин: современное состояние и перспективы внедрения в	
медицинскую и ветеринарную практику	1
1.2 Методы анализа амидных анестетиков в лекарственных средствах и	
биоаналитических исследованиях	2
1.2.1 Анализ амидных анестетиков в фармацевтических субстанциях и	
лекарственных препаратах	5
1.2.2 Анализ амидных анестетиков в биологических объектах	5
1.2.3 Методы анализа бромокаина	
1.3 Характеристика трансдермальных терапевтических систем (TTC) 3 1.4 Современные требования к стандартизации фармацевтических	
субстанций	-
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1 4 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ 4	_
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
2.1 Объекты исследования	
2.2 Реактивы	
2.3 Методы исследования 4	-
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ	_
ОСТАТОЧНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ В СУБСТАНЦИИ 4	7
БРОМОКАИНА	•
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3	7
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК АНАЛИЗА ПОКАЗАТЕЛЕЙ «РОДСТВЕННЫЕ ПРИМЕСИ» И «КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ» В	
СУБСТАНЦИИ БРОМОКАИНА МЕТОДОМ ВЭЖХ	8
4.1 Разработка и валидация методики количественного определения	
родственных примесей в субстанции бромокаина методом ВЭЖХ 5	8
4.2 Разработка и валидация методики количественного определения	
бромокаина в субстанции методом ВЭЖХ	1
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4	9
ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ РОДСТВЕННЫХ ПРИМЕСЕЙ В	
ТРАНСДЕРМАЛЬНОЙ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ (ТТС) БРОМОКАИНА 0,05 г и 0,10 г	1
	1
5.1 Разработка и валидация методики количественного определения	1
бромокаина в ТТС бромокаина 0,05 г и 0,10 г	1

5.2 Разработка и валидация методики определения родственных	
примесей в ТТС бромокаина 0,05 г и 0,10 г	89
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5	97
ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ БРОМОКАИНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ ДЛЯ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ	0.0
ИССЛЕДОВАНИЙ	98
6.1 Определение бромокаина в крови методом микроколоночной	
ХЖЕВ	98
6.2 Определение бромокаина в органах лабораторных животных	109
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 6	112
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	114
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.	116
ПРИЛОЖЕНИЕ	137

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АНО ИМБИиТ – Автономная некоммерческая организация «Институт медико-биологических исследований и технологий»

ВФС – Временная фармакопейная статья

ВЭЖХ – Высокоэффективная жидкостная хроматография

ГЖХ – Газо-жидкостная хроматография

ГСО – Государственный стандартный образец

ГФ РФ – Государственная фармакопея Российской федерации

ГХ-МС – Газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

ДРП – Дозатор равновесного пара

ИТХ УрО РАН – Институт технической химии Уральское отделение Российской академии наук

НД – Нормативный документ

НПКО – Нижний предел количественного определения

ООР – Остаточные органические растворители

ОФ – Обращенно-фазный

ОФС – Общая фармакопейная статья

ПГФА – Пермская Государственная фармацевтическая академия

ПИД – Пламенно-ионизационный детектор

ПФ – Подвижная фаза

ПХС – Пригодность хроматографической системы

РСО – рабочий стандартный образец

СПЭ – статическая парофазная экстракция

ТТ – Теоретические тарелки

ТТС – Трансдермальная терапевтическая система

УФ – Ультрафиолетовый

ФБР – Фосфатный буферный раствор

ВВЕДЕНИЕ

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.

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 использующиеся в медицинской практике, значительно уступают выраженности поверхностноанестезирующего ему антиаритмического действия. Кроме того, лидокаин обладает достаточно высокой токсичностью, что обуславливает развитие различных осложнений при его применении. Клинические исследования анилокаина доказали его эффективность различных областях высокую В 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. Москва) впервые разработана Шумакова» (г. 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 определяет необходимость препаратов бромокаина разработки высокочувствительных методик его определения в биологических объектах для проведения фармакокинетических исследований.

Цель настоящей 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 выбору «Методы обучении студентов на дисциплине ПО 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).

Объём 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.

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

<u>Публикации.</u> По теме диссертации опубликовано 8 научных работ, в том числе в изданиях Перечня ВАК -3.

<u>Связь темы диссертации с проблемным планом фармацевтических</u> 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, экологофармацевтического 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Бромокаин: современное состояние и перспективы внедрения в медицинскую и ветеринарную практику

В ПГФА осуществлен синтез и совместно с ИТХ УрО РАН доведен до медицинского применения местный анестетик из группы замещенных амидов - анилокаин (2-броманилид-3диэтиламинопропановой кислоты гидрохлорид) (рис.1.1.1), проявляющий высокую поверхностную, инфильтрационную и проводниковую анестезию [1].

$$\begin{array}{c|c} & C_2H_5 \\ & &$$

Рис. 1.1.1 – Структурная формула бромокаина

Ценным свойством анилокаина является наличие противовоспалительной и умеренной антимикробной активности, чем он выгодно отличается от применяемых в медицинской практике местных анестетиков. По сравнению с лидокаином анилокаин проявляет более поверхностноанестезирующую активность выраженную при меньшей токсичности [2,3,4]. Кроме того, анилокаин обладает преимуществом и в выраженности антиаритмического эффекта [5]. Анилокаин прошел широкую клиническую апробацию эффективность И показал высокую офтальмологии, эндоскопии, стоматологии, хирургии, неврологии и других областях медицинской практики [2,4,6,7]. На основе анилокаина разработаны и доведены до медицинского применения ряд лекарственных форм: 1%, 2% инъекционные растворы, 5% раствор анилокаина для наружного применения, мазь «Аникол» [8].

В Институте хирургии им. А.В. Вишневского РАМН разработаны инновационные гидрогели АППОЛО® на основе полиакрилатных гидрогелей с содержанием анилокаина и антисептика мирамистина. Гели

«АППОЛО» и гелевые повязки «АППОЛО» успешно прошли клинические испытания в госпиталях и ожоговых центрах и рекомендованы для лечения воспалительных процессов кожи, защиты кожных покровов и восстановления тканей после хирургических операций, ожогов и ран различного происхождения [9,10].

С перспективой внедрения в медицинскую и ветеринарную практику в ПГФА на основе анилокаина разработаны и другие лекарственные средства для наружного применения [11,12,13]: мазь «Анилкам» для лечения раневых процессов [14], гель «Анилогель» для обезболивания при проведении инструментальных вмешательств [15], суппозитории для экстемпорального изготовления и промышленного производства [16,17], пленки лекарственные для лечения воспалительных процессов в стоматологии [18,19], аэрозоль для обезболивания в ветеринарии.

1.2 Методы анализа амидных анестетиков в лекарственных средствах и биоаналитических исследованиях

Местноанестезирующими средствами (местными анестетиками) называются вещества, которые при взаимодействии с нервными волокнами и их окончаниями способны обратимо угнетать образование и проведение по Анестетики амидной группы являются более ним нервных импульсов. активными по сравнению с производными сложных эфиров, что связано с особенностями их химической структуры. Данные соединения превосходят эфирные анестетики времени наступления И ПО длительности фармакологического эффекта за счет быстрого проникновения в ткани и продолжительной циркуляции в крови (не разрушаются эстеразами плазмы крови). Амидные анестетики реже вызывают аллергические реакции, более устойчивы при стерилизации и хранении [20-25].

Представителями широко применяемых в медицинской практике амидных анестетиков являются тримекаин, лидокаин, бупивакаин, мепивакаин, ропивакаин и артикаин (таблица 1.2.1) [26]. Тримекаин,

лидокаин, бупивакаин, мепивакаин и ропивакаин относятся к производным диметилфенилацетамида. Артикаин (производное тиофена) отличается по химической структуре наличием боковой эфирной группы, что сказывается на его фармакологической активности. Около 90 % действующего вещества гидролизуется в кровяном русле эстеразами, что значительно снижает степень его биотрансформации в печени. Повышенная липофильность артикаина обусловливает его отличное проникновение внутрь нервного волокна и больший процент связывания активной молекулы в ионном канале [27-28].

Таблица 1.2.1 – Местные анестетики амидного типа

Структурная формула	Торговые наименования
ТРИМЕКАИН CH ₃ H ₃ C CH ₃ CH ₃ CH ₃ 2-(Диэтиламино)-N-(2,4,6- триметилфенил)ацетамид (в виде гидрохлорида)	Тримекаин Тримекаин гидрохлорид Тримекаина раствор для инъекций
ЛИДОКАИН CH_3 CH_3 CH_3 CH_3 $(2-Диэтиламино)-N-(2,6-диметилфенил)ацетамид$ $(и в виде гидрохлорида)$	Лидокаин Версатис (Versatis®) Лидокаина гидрохлорида раствор для инъекций Ксилокаин (Xylocaine®) Лидокаин буфус (Lidocaine bufus) Геликаин (Gelicain) Динексан Лидокаин-Виал (Lidocaine-Vial) Лидокаина гидрохлорид 1% Браун Луан (Luan) Лидокаин Велфарм

МЕПИВАКАИН Скандонест (Scandonest) Мепивакаин ДФ (Mepivacain DF) CH_3 Скандинибса® (Scandinibsa) Мепивастезин (Mepivastesin) Мепивакаин-Бинергия N-(2,6-Диметилфенил)-1-метилпиперидинкарбоксамид (в виде гидрохлорида) РОПИВАКАИН Наропин® Ропивакаин Каби Ропивакаин Ропивакаина гидрохлорид Ропивакаина гидрохлорида CH₃ моногидрат Ропивакаин Велфарм (S)-N-(2,6-Диметилфенил)-1-пропил-2-Ропивакаин-Бинергия пиперидинкарбоксамид БУПИВАКАИН БлоккоС® Маркаин CH_3 Маркаин® Спинал Маркаин® Спинал Хэви Буванестин® Бупивакаин Бупивакаин Гриндекс Бупивакаин Гриндекс Спинал Анекаин *1-Бутил-N-(2,6-диметилфенил)-2-*Бупивакаин-Бинергия пиперидинкарбоксамид Бупивакаина гидрохлорид (и в виде гидрохлорида) Максикаин Бупивакаин-Лекфарм Спинал Хэви БлоккоС® ХЭВИ Бупивакаин Спинал Хэви **АРТИКАИН** Ультракаин® Артикаин Ультракаин® Д Артикаина гидрохлорид Артикаин-Бинергия ΉN 4-Метил-3-[[1-оксо-2-(пропиламино)пропил]амино]-2тиофенкарбоновой кислоты метиловый эфир

(в виде гидрохлорида)

1.2.1 Анализ амидных анестетиков в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах

Химические методы

Поскольку амидные анестетики являются гидрохлоридами, субстанции данных соединений дают характерную реакцию на хлорид-ион с серебра нитратом с образованием белого творожистого осадка, не растворимого при прибавлении азотной кислоты и легко растворимого при прибавлении раствора аммиака [29-39].

При гидролизе (кислотном, щелочном) тримекаин и лидокаин образуют первичные амины 2,4,6-триметиланилин и 2,6-диметиланилин, соответственно, которые вступают в реакции диазотирования и азосочетания [40].

Тримекаин и лидокаин дают цветные реакции с солями металлов. Так при взаимодействии основания лидокаина с раствором хлорида кобальта образуется голубовато-зеленый осадок [29], тримекаин с раствором ацетата меди дает зеленое окрашивание [40].

Также в качественном анализе используются реакции окисления: при нагревании тримекаина с реактивом Марки образуется красное окрашивание, после добавления воды появляется голубая флюоресценция [40].

Европейская фармакопея рекомендует для установления подлинности лидокаина в субстанции использовать реакцию окисления азотной кислотой концентрированной. После выпаривания остаток охлаждают и растворяют в ацетоне. При добавлении спиртового раствора калия гидроксида развивается зеленая окраска [30].

Цветные реакции также используются при испытании на чистоту. Родственная примесь лидокаина 2,6-диметиланилин в субстанции определяется по реакции с п-диметиламинобензальдегидом [40].

Химические реакции лежат и в основе методов количественного определения в субстанциях анестетиков.

Для количественного определения субстанции лидокаина (основания) Российская и Европейская фармакопеи предлагают неводное ацидиметрическое титрование хлорной кислотой. Точку эквивалентности определяют потенциометрически [29,30]. В субстанциях гидрохлоридов лидокаина, мепивакаина, ропивакаина и бупивакаина количественное определение проводят алкалиметрическим титрованием, используя 0,1 М раствор натрия гидроксида (потенциометрическое установление точки эквивалентности) [30-33].

Фармакопея США для количественного определения в субстанциях гидрохлоридов мепивакаина, бупивакаина рекомендует использовать ацидиметрическое неводное титрование хлорной кислотой в среде ледяной уксусной кислоты (индикатор — кристаллический фиолетовый) [36,38], для гидрохлоридов артикаина и ропивакаина — потенциометрическое алкалиметрическое титрование [37,39].

Методы физического и физико-химического анализа

В качестве метода идентификации современными фармакопеями широко используется *определение температуры плавления* веществ. Так для субстанций лидокаина и лидокаина гидрохлорида температуру плавления определяют без предварительного высушивания. Гидрохлориды бупивакаина и мепивакаина переводят в основания путем экстракции эфиром из щелочных растворов, после удаления органического растворителя измеряют температуры плавления экстрагированных оснований [31,32].

ИК-спектрометрия является фармакопейным методом анализа лекарственных средств, основанным на поглощении ИК излучения молекулами вещества, в результате чего молекулы переходят на более колебательный Поскольку высокий уровень. молекула имеет индивидуальный колебательный ИК-спектрометрии спектр, метод идентификации используется большинства фармацевтических ДЛЯ субстанций [41,42]. ИК-спектрометрия применяется для доказательства подлинности субстанций лидокаина, мепивакаина, бупивакаина, ропивакаина и артикаина. ИК спектры, снятые в диске с калия бромидом, должны соответствовать спектрам стандартных образцов [29-39].

Спектрофотомерия в ультрафиолетовой и видимой областях спектра

Спектрофотометрические методы находят широкое применение в анализе лекарственных средств, благодаря доступности, относительной простоте использования, экспрессности. Данные дешевизне, методы достаточно универсальны, поскольку большинство лекарственных средств в своей содержат хромофорные группы, обуславливающие структуре поглощение электромагнитного излучения в УФ и видимой областях спектра [43,44].

Наиболее простым В реализации является метод прямой спектрофотомерии собственному светопоглощению ПО веществ предварительно выбранных аналитических длинах волн. Он используется в фармацевтическом анализе для доказательства подлинности, чистоты и количественного определения. Метод спектрофотомерии применим для определения двух и более активных компонентов в составе сложных препаратов без их предварительного разделения. В случае перекрывающихся спектров поглощения индивидуальных соединений используют метод Фирордта [66,67], включенный в Государственные Фармакопеи многих стран.

Методики определения лекарственных средств по светопоглощению в видимой области обычно основаны на образовании окрашенных комплексов со специально добавленным реагентом. Реже используется окисление лекарственного вещества или его превращение в новую форму под воздействием облучения [44,45].

Метод УФ спектрофотомерии рекомендуется Европейской Фармакопеей для установления подлинности субстанции артикаина

гидрохлорида [34], Фармакопеей США – для субстанции бупивакаина гидрохлорида [38]. Максимумы поглощения веществ в растворе хлористоводородной кислоты соответствуют 272 нм (артикаин) и 271 нм (бупивакаин).

Простой, селективный, высокочувствительный экстракционноспектрофотометрический метод предложен для количественного определения лидокаина гидрохлорида в растворах (1, 2, 10 %). Метод основан на образовании растворимого окрашенного ион-парного комплекса лидокаина гидрохлорида и эриохрома черного Т при рН 1.8, который извлекается в хлороформ. Оптическую плотность хлороформного раствора комплекса измеряют при длине волны 508 нм [46].

УФ спектрофотометрический метод предложен для определения бупивакаина гидрохлорида в лекарственных препаратах (растворах). Измерения оптической плотности испытуемых растворов проводят при 262 нм [47].

Для качественного и количественного определения анестетиков (лидокаина, тримекаина, артикаина) в инновационных мазях на основе (гель «Тизоль») глицерогидрогеля титана разработан простой экономичный спектрофотометрический метод для двухкомпонентных прописей, основанный на измерении оптической плотности спиртовых вытяжек при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения веществ [48,49]. Для трехкомпонентных действующих композиций, содержащих определённый анестетик и диклофенак натрия, использован прием Фирордта по причине перекрывания спектров поглощения веществ. В качестве раствора сравнения в обоих случаях используют этанольную вытяжку из основы – геля «Тизоль» [49-51].

Также метод Фирордта был разработан для спектрофотометрического определения тримекаина гидрохлорида и фурацилина в комплексной мазипасте для стоматологического применения на основе шрота каланхоэ [52].

Электрохимические методы

Для количественного определения новокаина, лидокаина в водных растворах и лекарственных формах (растворы для инъекций) разработаны потенциометрические сенсоры (ПД – сенсоры, аналитическим сигналом которых является потенциал Доннана) на основе перфторированных сульфокатионитовых полимерных (ПСП) мембран в К⁺-форме. Авторами показаны преимущества использования разработанных сенсоров в анализе в сравнении со стандартными титриметрическими методиками за счет экспрессности, большей воспроизводимости аналитического сигнала и меньшей ошибки определения [53].

Для определения лидокаина гидрохлорида и его канцерогенного метаболита 2,6-диметиланилина в лекарственных формах и молоке были разработаны высокочувствительные и селективные мембранные сенсоры на основе поливинилхлорида [54].

Простой вольтамперометрический метод предложен для одновременного определения артикаина гидрохлорида и эпинефрина в фармацевтических препаратах, предусматривающий использование угольного электрода в буфере Бриттона-Робинсона (рН 7) с добавлением 40 мкл раствора 0,01 моль/л натрия додецилсульфата [55].

Метод капиллярного электрофореза на капилляре из плавленого кварца разработан для анализа геля, содержащего в своем составе декспантенол, лидокаин и мепирамин. Наилучшие результаты получены при использовании в качестве фонового электролита 20 мМ фосфатного буфера (рН 3,0) и приложенном напряжении +30 kV. Спектрофотометрическое детектирование компонентов геля осуществлялось при 200 нм [56].

Тонкослойная хроматография

Тонкослойная хроматография на силикагелевых пластинках как один из способов доказательства подлинности рекомендована Европейской фармакопеей для субстанций гидрохлоридов мепивакаина, бупивакаина,

ропивакаина и артикаина (таблица 1.2.1.1). Идентификацию проводят путем сравнения с растворами стандартных образцов [36,38,39].

Таблица 1.2.1.1 – Идентификация анестетиков методом ТСХ

Вещество	Подвижная фаза	Способ детекции
Мепивакаина	концентрированный раствор аммиака –	УФ облучение
гидрохлорид	метанол – эфир (1: 5: 10)	при 254 нм
Бупивакаина	концентрированный раствор аммиака –	Хромогенный
гидрохлорид	метанол (0,1: 100)	детектор:
		раствор калия
		йодвисмутата
Артикаина	триэтиламин – этилацетат – гептан	УФ облучение
гидрохлорид	(10: 35: 65)	при 254 нм

Для определения лидокаина гидрохлорида в комбинированных лекарственных препаратах предложены денситометрического методы количественного определения метода тонкослойной на основе хроматографии в системах: этилацетат – хлороформ – метанол – аммиак (5:3,3:1,5:0.2) (для разделения лидокаина и диклофенака натрия) и хлороформ – ацетон – аммиак (8:2:0,1) – для лидокаина и гидрокортизона ацетата. Сканирование зон абсорбции анализируемых веществ производится спектрофотометрически [57,58].

изучения стабильности субстанции Для мепивакаина разработан ТСХ-денситометрический лекарственных формах позволяющий определять мепивакаин в присутствии его токсической примеси 2,6-диметиланилина. Разделение производилось на силикагелевых пластинах в системе метанол – вода – уксусная кислота (9:1:0,1).Сканирование пятен – спектрофотометрическое при длине волны 230 нм [59].

Описан метод стереоселективного разделения и определения R (+) - и S (-) — изомеров ропивакаина. Подвижной фазой, обеспечивающей успешное разрешение изомеров, выбрана смесь ацетонитрил — вода (17:3), содержащая 1 мМ диметил-β-циклодекстрина. Пятна обнаруживали с помощью паров йода или УФ облучения при 254 нм с последующим

денситометрическим измерением при 262 нм. Предложенный метод оказался селективным и точным для идентификации и количественного определения энантиомерной чистоты ропивакаина в субстанциях и лекарственных препаратах [60].

Газовая хроматография предложена для определения лидокаина гидрохлорида в растворах для инъекций и креме. Разделение осуществляли на хроматографической колонке HP-5 (5% - фенил – метилполисилоксан), в качестве газа-носителя использовался азот со скоростью потока 1,6 мл/мин. Детектирование лидокаина проводили с помощью пламенно-ионизационного детектора. Температуры инжектора и детектора составляли 260 °C. Температура колонки программировалась следующим образом: начальная температура — 80 °C, выдержка в течение 1,5 мин при 210 °C, скорость подъема температуры 10 °C/мин до финальной температуры 230 °C [61].

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Метод ВЭЖХ благодаря своей универсальности, высокой разделяющей способности (за счет использования мелкодисперсных сорбентов) и чувствительности занимает одно из лидирующих мест в фармацевтическом анализе. Мягкость условий ВЭЖХ (разделение при температурах, близких к комнатной) позволяет анализировать термолабильные вещества. Метод применяется для определения подлинности, примесей, количественного определения действующего вещества в субстанциях и лекарственных препаратах, для оценки однородности дозирования и в тесте «Растворение». Метод широко используется также в анализе комбинированных препаратов [41, 62–64]. Метод ВЭЖХ включен в фармакопею РФ и зарубежные фармакопеи [65-67].

В частных фармакопейных статьях на местные анестетики метод ВЭЖХ используется для установления подлинности, определения родственных примесей и количественного определения. Условия хроматографического анализа ряда местных анестетиков представлены в таблице 1.2.1.2.

Таблица 1.2.1.2 – Условия хроматографического определения ряда местных анестетиков методом ВЭЖХ

Вещество	Контролируемый показатель	Условия ВЭЖХ	
Лидокаина гидрохлорид	Родственные примеси	Сорбент: октадецилсиликагель (5 мкм). ПФ: ацетонитрил – фосфатный буферный раствор (рН 8,0) 30:70.	
		Температура колонки: 30 °C. Детектирование: спектрофотометрическое (230 нм) [29,30]	
	Подлинность Количественное определение	Сорбент: L1 (С18). ПФ: ацетонитрил – раствор уксусной кислоты (рН 3,4) 1:4. Температура колонки: 30 °C. Детектирование:	
Мепивакаина гидрохлорид	Родственные примеси	спектрофотометрическое (254 нм) [35] Сорбент: октадецилсиликагель (5 мкм). ПФ: ацетонитрил — 2,25 г/л раствор фосфорной кислоты (рН 7,6) 35:65. Детектирование: спектрофотометрическое (220 нм) [31]	
Ропивакаина гидрохлорид	Родственные примеси	Сорбент: октадецилсиликагель (4 мкм). ПФ: ацетонитрил – фосфатный буферный раствор (рН 8,0) 50:50. Детектирование: спектрофотометрическое(240 нм) [33]	
	Органические примеси	Сорбент: L1 (С18). ПФ: ацетонитрил – фосфатный буферный раствор (рН 8,0) 1:1. Детектирование: спектрофотометрическое (240 нм) [37]	
Бупивакаина гидрохлорид	Родственные примеси	Сорбент: октадецилсиликагель (5 мкм). ПФ: ацетонитрил – фосфатный буферный раствор (рН 8,0) 50:50. Детектирование: спектрофотометрическое (240 нм) [32]	
Артикаина гидрохлорид	Родственные примеси	Сорбент: октадецилсиликагель (5 мкм). ПФ: ацетонитрил – раствор гептансульфоната 2,02 г/л и калия дигидрофосфата 4,08 г/л (рН 2,0) 25:75. Температура колонки: 45 °C. Детектирование: спектрофотометрическое (276 нм) [34,39]	

Методика на основе обращенно-фазной ВЭЖХ с использованием подвижной фазы состава ацетонитрил — вода с добавлением уксусной кислоты до рН 3,4 разработана для анализа парентерального раствора лидокаина [68]. Для проведения теста «Растворение» в анализе геля с лидокаином предложены условия его определения в водных растворах на колонке LichroCART® RP-18 (элюент: ацетонитрил — фосфатный буферный раствор (рН 6) в соотношении 35:65) [69].

В работах [70-77] описаны условия ВЭЖХ анализа лидокаина в комбинированных лекарственных формах (таблица 1.2.1.3).

Таблица 1.2.1.3 – Условия хроматографического определения лидокаина в комплексных препаратах

Состав	Условия ВЭЖХ
комплексного	
препарата	
1	2
Лидокаина	Колонка: Princetone SPHRE 100 C18 (250mm X 4.6mm,
гидрохлорид,	5μ).
преднизолона	ПФ: ацетонитрил – 0,01 М раствор дигидрофосфата
ацетат,	калия с триэтиламином (рН 7) 54:46.
диметисульфоксид	Скорость потока ПФ: 1 мл/мин.
(гель)	Детектирование: спектрофотометрическое (261 нм) [70]
Лидокаина	Колонка: Enable HPLC ODS C18 G (250× 4.6 mm, 5 µm).
гидрохлорид,	ПФ: ацетонитрил – 20 мМ раствор аммония ацетата (рН
нифедипин	4,8) 35:65.
(лекарственные	Скорость потока ПФ: 1 мл/мин.
формы для	Детектирование: спектрофотометрическое (231 нм) [71]
наружного	
применения)	
Лидокаина	Колонка: Zorbax SB-C8 (250× 4.6 mm, 5 μm).
гидрохлорид,	ПФ: ацетонитрил – 0,05 М раствор фосфорной кислоты.
миконазола нитрат	Элюирование: градиентное.
(гель)	Скорость потока ПФ: 1 мл/мин.
	Детектирование: спектрофотометрическое (215 нм) [72]

Продолжение таблицы 1.2.1.3

1	2	
Лидокаина	Колонка: PrincetonSPHER 100 C18 (250mm X 4.6mm,	
гидрохлорид,	5μ).	
диэтиламина	ПФ: ацетонитрил – 0,01 М раствор дигидрофосфата	
диклофенак	калия – бутилсульфонат натрия 45:55:0,1% с	
(гель)	добавлением триэтиламина до рН 6,8.	
	Скорость потока ПФ: 1 мл/мин.	
	Детектирование: спектрофотометрическое (261 нм)	
	[73]	
Лидокаина	Колонка: Symmetry C18 (150×3,9 мм, 5µ).	
гидрохлорид,	ПФ: ацетонитрил – раствор дигидрофосфата калия с	
декаметоксин	триэтиламином (рН 7,2).	
(пленки	Скорость потока ПФ: 1,2 мл/мин.	
стоматологические)	Детектирование: спектрофотометрическое (226 нм)	
	[74]	
Лидокаина	Колонка: Inertsil ODS-3 V (250×4,6 мм, 5µ).	
гидрохлорид,	ПФ: 0,01 М раствор аммония ацетата – метанол.	
мепирамина	Элюирование: градиентное.	
малеат,	Скорость потока ПФ: 1,3 мл/мин.	
декспантенол	Детектирование: спектрофотометрическое (230 нм)	
(гель)	[75]	
Лидокаина	Колонка: Zorbax SB-C8 (250×4,6 мм, 5µ).	
гидрохлорид,	ПФ: 0,05 М раствор кислоты фосфорной -	
цетилпиридиния	ацетонитрил.	
хлорид	Элюирование: градиентное.	
(гель)	Скорость потока ПФ: 1,2 мл/мин.	
	Детектирование: спектрофотометрическое	
	(214, 258 нм) [76]	
Лидокаина	Колонка: Spherisorb ODS (250×4,6 мм, 5µ).	
гидрохлорид,	ПФ: вода – ацетонитрил 30:70, содержащий 5,5 %	
толперизон	триэтиламина.	
(гель)	Скорость потока ПФ: 0,7 мл/мин.	
	Детектирование: спектрофотометрическое (254 нм) [77]	

Для определения лидокаина и продуктов его деградации авторами предложен вариант градиентного элюирования на колонке «Agilent eclipse

plus C18» (100 x 4.6) подвижной фазой состава ацетонитрил — фосфатный буферный раствор (рН 4,5) при скорости потока 1 мл/мин. Детектирование аналитов проводили при 230 нм. Специфичность данных условий исследована в различных стрессовых условиях, включая гидролиз и окисление лидокаина, а также воздействие температуры и света [78].

Простой и точный метод на основе ВЭЖХ использован авторами для анализа бупивакаина в таблетках. Разделение проводили на обращеннофазной колонке Waters RP-C18 (150 x 4.6 mm, 3.5 µ) в подвижной фазе ацетонитрил – фосфатный буферный раствор (рН 6,5). Детекция бупивакаина осуществлялась при 220 нм [79]. В работе [80] авторы исследовали влияние факторов, состав элюента, pH, температура, таких как хроматографическое разделение компонентов препарата Маркаин® (бупивакаина гидрохлорида и адреналина). Установлено, что оптимальное разделение достигается при использовании подвижной фазы метанол – вода (65:35) с доведением рН до 3,5 при температуре от 20 до 30 °C. Метод обращенно-фазной хроматографии с использованием элюента с низким значением рН среды (вода – ацетонитрил – фосфорная кислота 70:30:0,1) был применен и для анализа трансдермального геля с бупивакаином [81].

Метод ВЭЖХ с амперометрическим детектированием разработан для определения примесей (2,6-диметиланилина и о-толуидина) в лекарственных формах местных анестетиков. Анализ выполнен в изократическом режиме на колонке Luna C-18 (100 mm × 4,6 mm, 5 µm). В качестве элюента использована смесь на основе трис-буфера (рН 7,9) и ацетонитрила. Хроматограммы регистрировали с помощью амперометрического детектора при потенциале +1,0 В стеклоуглеродного электрода в сравнении с электродом сравнения Ag / AgCl [82].

1.2.2 Анализ амидных анестетиков в биологических объектах

Для обозначения методов определения лекарственных веществ в биологических объектах используют термин «биоанализ». К

биоаналитическим исследованиям относят фармакокинетические исследования доклиническом И клиническом этапах изучения на лекарственных средств, исследования биоэквивалентности лекарственных препаратов, лекарственный терапевтический мониторинг, химикотоксикологические исследования и допинг-контроль. Основными этапами биоаналитического исследования являются подготовка пробы И непосредственно анализ с помощью современных физико-химических методов. Аналитический метод измерения концентрации лекарственного вещества должен обладать высокой чувствительностью, специфичностью, возможностью работы с малыми объемами биоматериала. В биоанализе используются хроматографические, спектрофотометрические, иммунные (радиоиммунные, иммуноэнзимные) и др. методы. Однако наиболее широко на практике применяется метод ВЭЖХ с различными видами детекции. Преимуществами ВЭЖХ отсутствие являются ограничений ПО термостабильности аналитов, возможность работы полярными нелетучими соединениями [83-85]. Сочетание жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (LC-MS) становится преобладающим методом анализа биологических образцов [86-87].

Важным этапом В биоанализе является пробоподготовка, преследующая две основные цели: удаление мешающих анализу эндогенных соединений биопробы (белков, липидов и т.д.) и концентрирование аналита. Используются три основных способа пробоподготовки: осаждение белков крови, жидкость жидкостная экстракция и твердофазная экстракция. Простое осаждение белков наиболее простой, дешевый и экспрессный вариант пробоподготовки плазмы крови к анализу. Однако недостаточная очистка образцов от солей, фосфолипидов и других соединений часто делает невозможным масс-спектрометрическое детектирование. Жидкость-жидкостная экстракция твердофазная И экстракция дают более высокую степень очистки экстракта и позволяют Недостатками способов сконцентрировать аналит. данных являются

трудоемкость, длительность и высокая стоимость картриджей для ТФЭ [86-88].

В современных литературных источниках описаны высокочувствительные способы определения амидных местных анестетиков в биологических объектах на основе хроматографических методов.

Газовая хроматография с пламенно-ионизационным детектором использована для обнаружения десяти местных анестетиков в биожидкостях (крови и спинномозговой жидкости) после их выделения методом ТФЭ с помощью картриджей Sep-Pak C18 [89]. В работе [90] представлена высокоселективная методика определения ропивакаина в экстрактах из тканей мочи И с использованием газожидкостной плазмы крови, хроматографии с азотно-фосфорным детектором. Для количественного определения лидокаина в образцах посмертной крови предложен метод газовой хроматографии масс-спектрометрии. Изолирование лидокаина из крови осуществлялось с помощью ТФЭ на патронах AccuBond EVIDEX [91].

Однако в большинстве опубликованных работ, касающихся анализа местных анестетиков в биологических объектах, описан метод ВЭЖХ с УФ и масс-спектрометрической детекцией. В таблице 1.2.2.1 представлены условия пробоподготовки и хроматографического определения ряда местных анестетиков в биологических жидкостях методом ВЭЖХ.

В настоящее время в литературе появляются данные об использовании в биоаналитических исследованиях высокоэффективного и перспективного метода — капиллярного электрофореза. Капиллярный зонный электрофорез основан на различии в электрокинетических подвижностях заряженных частиц как в водных, так и неводных электролитах. Капиллярный электрофорез широко применяется в анализе лекарственных средств, в том числе и в биологических средах с целью идентификации и количественного определения [104].

Авторами [105-107] разработаны условия электрофоретического количественного определения артикаина и мепивакаина в моче на

отечественном приборе для капиллярного электрофореза «Капель — 105». В качестве рабочего электролита использовался буферный раствор Бриттона — Робинсона с рН 2,3. Детектирование артикаина и мепивакаина проводили спектрофотометрически. Пробоподготовка мочи осуществлялась прямой жидкостной экстракцией хлороформом при рН 9 с последующей реэкстракцией в рабочий электролит. Предложенные методики выделения и определения исследуемых местных анестетиков высокочувствительны, селективны и могут быть рекомендованы для проведения судебнохимического (химико-токсикологического) и клинического лабораторного анализа.

В работе [108] описаны условия капиллярного электрофоретического анализа бупивакаина и его трех основных метаболитов (десбутилбупивакаина, 3'-гидроксибупивакаина и 4'-гидроксибупивакаина) в моче крыс после введения терапевтических доз. Для экстракции бупивакаина использовали метод ТФЭ.

Метод капиллярного электрофореза успешно использован авторами [109] для определения лидокаина и бупивакаина в ткани печени. Показано, что максимальная степень извлечения соединений достигается при использовании в качестве извлекателя раствора щавелевой кислоты (рН 2,0). Предложенные методики высокочувствительны, селективны и могут быть рекомендованы для применения в практике химико-токсикологического анализа.

Таблица 1.2.2.1 – Условия количественного определения амидных анестетиков в биологических жидкостях хроматографическими методами

Лекарственное средство	Биожидкость	Пробоподготовка	Характеристика колонки	Состав ПФ, режим элюирования	Способ детектирования
1	2	3	4	5	6
Лидокаин [92]	сыворотка крови	ЖЖЭ из щелочной среды; экстрагент: хлороформ	Whatman ODS-3 (5 MKM)	ацетонитрил – фосфатный буфер – фосфорная кислота – вода	УФ: 210 нм
Лидокаин [93]	сыворотка крови	ЖЖЭ из щелочной среды; экстрагент: эфир диэтиловый	Alltima C18	ацетонитрил – фосфатный буфер	УФ: 210 нм (лидокаин) 277 нм (прокаинамид, IS)
Мепивакаин Ропивакаин Бупивакаин [94]	сыворотка крови	ΕΦΤ	C (18)	ацетонитрил – метанол фосфатный буфер (рН5,6) (100: 100: 300)	УФ: 210 нм
Бупивакаин Этидокаин [95]	плазма крови	СФТ	LiChrospher C(18)	ацетонитрил – фосфатный буферный раствор рН 6,0	УФ: 210 нм
Бупивакаин Ропивакаин [96]	плазма крови	ЄЖЖ	C (18)	Ацетонитрил – фосфатный буферный раствор рН 5,0 (21:79)	УФ: 210 нм
Прокаин Лидокаин Бупивакаин Тетракаин Ропивакаин [97]	плазма крови	ЖЖЭ из щелочной среды; экстрагент: эфир диэтиловый	Kromosil ODS C18	фосфатный буфер (рН 4,9) – ацетонитрил (63: 37)	УФ: 210 нм, 290 нм
Лидокаин Тримекаин Артикаин Анилокаин [98]	кровь моча	ЖЖЭ из щелочной среды; экстрагент: хлороформ	Силасорб С18	ацетонитрил — фосфатный буфер (рН 3)—триэтиламин — октилсульфонат натрия (30: 69: 1: 25 мг).	УФ: 208 нм, 272 нм

Продолжение таблицы 1.2.2.1

1	2	3	4	5	6
Лидокаин	сыворотка	Осаждение белков с	BetaBasic-18	0,1 % раствор муравьиной	Macc-
метаболит MEGX	крови	последующей ТФЭ на		кислоты – ацетонитрил;	спектрометрическое:
[99]		катионообменном картридже		градиентное элюирование	MRM
Мепивакаин [100]	плазма крови	ЖЖЭ из щелочной среды;	ODS-3	0,5 % раствор муравьиной	Macc-
		экстрагент: эфир		кислоты – ацетонитрил	спектрометрическое:
		метилтретбутиловый		(60:40)	MRM
Бупивакаин и	плазма крови	ЖЖЭ из щелочной среды;	C (8)	тетрагидрофуран –	Macc-
метаболиты:	моча	экстрагент: эфир диэтиловый		фосфатный буфер (рН 2,4)	спектрометрическое:
десбутил- и				(8:92)	MRM
4-гидрокси-					
бупивакаин [101]					
Лидокаин	плазма крови	ТФЭ (микроэкстракция на	C (18)	ацетонитрил – фосфатный	Macc-
Прилокаин	слюна	сорбенте на основе оксида		буферный раствор рН 3,0	спектрометрическое:
Ропивакаин [102]		графена)		(30:70)	MRM
Лидокаин	плазма крови	ЄΦТ	ODS-3 C18	фосфатный буфер (рН 4,9)	Macc-
Мепивакаин	моча			– ацетонитрил (60:40)	спектрометрическое:
Ропивакаин					MRM
Бупивакаин [103]					

1.2.3 Методы анализа бромокаина

Согласно нормативной документации качественный анализ субстанции анилокаина осуществляют с использованием химических и физико-химических методов [110,111]. Химический анализ проводят по функциональным группам: третичному атому азота, ковалентно-связанному брому. При проведении реакции на третичный атом азота используется микрокристаллоскопическая реакция с пикриновой кислотой. Ковалентно-связанный бром доказывают путем восстановительной минерализации. Эффектом реакции является окрашивание хлороформного слоя в яркооранжевый цвет за счет выделения молекулярного брома.

Для установления подлинности субстанции анилокаина используется метод ИК спектрометрии. Полученный спектр должен соответствовать спектру, представленному в НД.

Для определения посторонних примесей в субстанции используется метод ТСХ. В качестве подвижной фазы применяют систему н-бутанол — этилацетат — хлороформ — аммиака раствор концентрированный (20:20:10:0,5). Детектирование проводят с помощью паров йода. Суммарное содержание родственных примесей, оцененное по совокупности величины и интенсивности окраски их пятен на хроматограмме испытуемого раствора (2 % раствор анилокаина в хлороформе), в сравнении с пятнами на хроматограммах свидетеля (0,01 % раствора анилокаина) не должно превышать 0,5 %.

Количественное определение анилокаина в субстанции, 1-2 % растворах для инъекций, мази «Аникол» проводят лаурилсульфатным методом (вариант прямого титрования) [110, 112].

Для изучения процесса высвобождения анилокаина из его лекарственных форм при биофармацевтических исследованиях использован кондуктометрический метод [17-19,113].

Для анализа анилокаина в разработанных лекарственных формах

(спрее, геле и пленках) предложен метод обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием. В анализе использована подвижная фаза на основе фосфатного буфера (рН 3) и ацетонитрила [114-116].

Для целей химико-токсикологического анализа анилокаина разработаны методики изолирования из крови и мочи на основе прямой экстракции органическими растворителями из щелочной среды. Предложены эффективные методики выделения вещества из ткани печени с применением в качестве экстрагента ацетонитрила. Для количественного определения анилокаина извлечениях ИЗ биообъектов использован метод микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборном «Милихром A-02». отечественном комплексе Хроматографический анализ осуществляли на обращенно-фазном сорбенте Силасорб С18 в изократическом режиме с использованием элюента ацетонитрил – фосфатный буфер (рН 3) – триэтиламин – октилсульфонат натрия (30:69:1:25 мг) [117].

1.3 Характеристика трансдермальных терапевтических систем (ТТС)

Трансдермальная терапевтическая система (ТТС) – дозированная мягкая лекарственная форма для наружного применения в форме пластырей или плёнок с контролируемым высвобождением. ТТС способны непрерывно подавать в организм лекарственные средства со скоростью, создающей в кровотоке постоянный уровень концентрации, близкий к минимальному терапевтическому уровню [118-120]. Трансдермальные терапевтические системы представляют собой альтернативный способ назначения тех лекарств, которые не могут быть введены иначе, или их традиционный пероральный путь назначения является менее эффективным [118, 121-123]. При трансдермальном введении молекулы действующего вещества диффундируют из лекарственной формы на поверхность кожи, затем проходят сквозь роговой слой и достигают эпидермиса и дермы, где васкулярной сетью переносятся к органам [120, 124-125].

К достоинствам ТТС относятся:

- поддержание постоянной концентрации лекарственного вещества в крови на определённом уровне в течение определённого времени;
- возможность снижения терапевтически активной дозы;
- уменьшение или исключение нежелательных побочных эффектов лекарственных веществ и их передозировки, а также отсутствие необходимости частого применения препарата;
- возможность защиты лекарственных веществ от разрушения в желудочно-кишечном тракте;
- отсутствие раздражающего действия на желудочно-кишечный тракт;
- безопасность лекарственного средства, так как вся доза лекарственного вещества находится вне организма и лишь контактирует с ним, и при необходимости может быть удалена;
- удобство для больных из-за уменьшения частоты приёма лекарств и возможности самостоятельного нанесения ТТС, при этом уменьшаются трудозатраты медицинского персонала;
- безболезненность введения препарата в организм и удобство назначения пациентам детского и пожилого возраста;
- повышение точности дозирования и комфортности по сравнению с другими трансдермальными лекарственными формами (мази, гели, примочки) [118-119, 123, 126-129].

Наряду с достоинствами трансдермального введения веществ присутствуют и ограничения:

- действие введенного вещества трансдермальным путем начинается позже, чем при использовании инъекционных лекарственных форм;
- субстанции, используемые в ТТС, должны обладать определенными физико-химическими свойствами;

• риск возникновения аллергических реакций [119-120, 126-130].

Все трансдермальные терапевтические системы могут быть отнесены к двум основным видам — мембранные (резервуарные) и матричные системы [118, 131, 132]. Основными элементами конструкции ТТС являются внешний покровный слой, матрица или резервуар с лекарственным средством, адгезивный слой и защитная антиадгезионная плёнка [132-133].

Мембранные (резервуарные – «равиоли»/ravioli systems) системы были предложены в 1980-х годах. Данные системы имеют резервуар, в котором лекарственное средство находится в гомогенном виде или в виде пастообразной суспензии, либо растворено в способном к диффузии растворителе (алкилспирты и т.п.). Высвобождение лекарственного средства через полимерную мембрану осуществляется с равномерной скоростью. Основной недостаток ТТС резервуарного типа – риск неконтролируемого выделения препарата при повреждении резервуара [119].

Матричные системы, спроектированные в 1990-х годах, более прогрессивны с технологической точки зрения. Они содержат лекарственное средство, распределенное в полимерной пленке. Для крепления матричной системы на коже используют адгезив, либо сама матрица может состоять из адгезивного полимера, фиксирующегося на коже. Физико-химической основой функционирования матричной системы служит низкоскоростная диффузия лекарства через вязкополимерную среду вследствие молекулы лекарственного средства (диффузанта) и полимера (диффузионной среды матрицы) меняются местами [119, 122, 125]

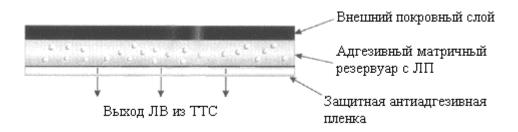


Рис. 1.3.1 – Схематическое изображение строения матричной ТТС [119]

В ТТС лекарственное средство часто вводится в составе микроэмульсий. Микроэмульсии являются термодинамически устойчивыми коллоидными дисперсными системами, стабилизированными активным веществом и во многих случаях вспомогательными веществами [134-137]. Насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты являются масляной фазой и часто используются как активаторы транскутанного переноса. Микроэмульсии способны обеспечивать продолжительное высвобождение лекарственных средств и предотвращают раздражение кожи даже токсичными для кожи препаратами, просты в производстве, стабильны в течение длительного промежутка времени, имеют высокую ёмкость растворения для гидрофильных и липофильных веществ [134].

За последнее десятилетие рынок лекарственных препаратов активно пополняется ТТС. В 2000 году в Государственном Реестре лекарственных средств было зарегистрировано 3 ТТС (Нисоперкутен, Нитроперкутен, Циперкутен), в 2018 году – 13 TTC (табл. 1.3.1) [138]. Номенклатура ЛС в виде ТТС представлена препаратами разных фармакологических групп: ангиопротекторами, антикоагулянтами, корректорами микроциркуляции, НПВС анальгетиками, анестетиками, И гормональными ОПИОДНЫМИ препаратами. На сегодняшний день в РФ зарегистрирована только одна ТТС с местным анестетиком. Это препарат Версатис ® (действующее вещество – лидокаин), применяемый при постгерпетической нейропатии Основная доля ТТС, представленных на Российском рынке, импортируется.

Таблица 1.3.1 – Трансдермальные терапевтические системы, зарегистрированные в Государственном Реестре РФ

Торговое название	Производитель	MHH
1	2	3
Транстек®	Грюненталь ГмбХ, Германия	Бупренорфин
Вольтарен®	Новартис Консьюмер Хелс СА, Швейцария	Диклофенак
Версатис®	Грюненталь ГмбХ, Германия	Лидокаин

Продолжение таблицы 1.3.1

1	2	3
Никоретте®	ООО "Джонсон & Джонсон",	Никотин
	Россия	
Никотинелл®	Новартис Консьюмер Хелс	Никотин
	СА, Швейцария	
Никвитин®	ГлаксоСмитКляйн	Никотин
	Консьюмер Хелскер,	
	Великобритания	
Евра®	ООО "Джонсон & Джонсон",	Норэлгестромин
	Россия	Этинилэстрадиол
Экселон®	Новартис Фарма АГ,	Ривастигмин
	Швейцария	
Ньюпро®	Шварц Фарма Лимитед,	Ротиготин
	Ирландия	
Фентадол®	Сандоз д.д., Словения	Фентанил
Дюрогезик®	ООО "Джонсон & Джонсон",	Фентанил
	Россия	
Фендивия®	Никомед Дания АпС, Дания	Фентанил
Климара®	Байер Фарма АГ, Германия	Эстрадиол

Исходя из механизма действия бромокаина, большой интерес представляет его трансдермальная форма, которая обеспечит постоянную скорость диффузии активного вещества во внешние слои кожи, поддерживая необходимую терапевтическую концентрацию. В «Федеральном научном центре трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» (г. Москва) разработана первая отечественная трансдермальная бромокаина биосовместимой терапевтическая система на основе микроэмульсионной композиции. В экспериментах іп vivo безопасность разработанной ТТС [140]. Основой для биологическая действующего вещества служит композиция, которая представляет собой обратную эмульсию типа вода в масле. В состав масляной фазы входит алипофильный токоферола ацетат, эмульгатор полиглицерил-6 полирицинолеат (декалин ПР-20) и активатор чрезкожного переноса – докузата натриевая соль. Данный состав позволил обеспечить постоянную скорость диффузии активного вещества в кожу в течение 24 часов [140-142].

Оптимальным видом пластыря для ТТС бромокаина стал матричный пластырь из сорбирующей накладки и эластичного микрогубчатого материала с адгезивом. Эта модель позволяет длительно удерживаться пластырю на поверхности кожи и достаточно быстро высвобождать действующее вещество из лекарственной матрицы [140].

1.4 Современные требования к стандартизации фармацевтических субстанций

Согласно ОФС.1.1.0006.15 ГФ XIV фармацевтическими субстанциями являются лекарственные средства в виде одного или нескольких обладающих фармакологической активностью действующих веществ вне зависимости от природы происхождения, предназначенные для производства, изготовления лекарственных препаратов и определяющие их эффективность [143].

Фармакопейные статьи (ФС) на фармацевтические субстанции являются важной составной частью фармакопей. ΦС являются государственными стандартами, разработанными на основе достоверных научных данных, a также точных аналитических измерений соответствующих валидационных процедур. В проект ФС включаются как обязательные для всех монографий показатели качества (подлинность, чистота и количественное определение), так и дополнительные, зависящие от природы каждой отдельно взятой субстанции [144].

Показатель «Подлинность» включает в себя несколько испытаний, необходимых для подтверждения соответствия субстанции заявленному наименованию. ГФ РФ рекомендует в качестве приоритетного для установления подлинности субстанций метод ИК-спектрометрии [143]. Также используются специфичные химические реакции, адсорбционная спектрофотометрия, ЯМР-спектроскопия и хроматографические методы (ВЭЖХ, ГЖХ, ТСХ). Метод ВЭЖХ используется для определения подлинности, если он предусмотрен для количественного определения или оценке примесей.

Дополнительно подлинность субстанции может подтверждаться отдельно выделяемыми показателями качества, такими как «Температура плавления», «Плотность», «Удельное вращение», «Показатель преломления», «Удельный показатель поглощения», «Вязкость» и т.д. [143-144].

Важным показателем качества субстанции является её чистота. К показателям содержания уровня неспецифических примесей относят следующие показатели: «Сульфатная зола», «Тяжелые металлы», «рН», «Кислотность или щелочность». Одной из наиболее распространенных примесей субстанциях является вода, наличие которой тэжом обуславливать разложение вещества. Кроме того, содержание воды в субстанции учитывается при количественном определении. Показатели «Прозрачность» и «Цветность» позволяют обнаруживать примеси, влияющие на внешний вид раствора субстанции [143-144].

Показатель «Родственные примеси» включает определение продуктов деструкции лекарственного средства и технологических примесей. При нормировании примесей в новых лекарственных субстанциях учитывают принципы, представленные в ГФ РФ и руководстве ICH Q3A (R2) «Примеси лекарственных субстанциях». Нормы устанавливаются новых зависимости от токсичности, фармакологической активности примеси, приема препарата И максимальной суточной длительности [143,145,146]. Для оценки содержания родственных примесей применяют высокоэффективные методы, такие как ВЭЖХ или ГЖХ. В настоящее время происходит плановый пересмотр нормативной документации для замены полуколичественного метода ТСХ на более специфичный и точный метод ВЭЖХ [146]. При определении родственных примесей рекомендуется использование стандартных образцов [146].

Стандартизации по показателю «Остаточные органические растворители» подлежат все фармацевтические субстанции независимо от способа применения, если при их получении или очистке используются органические растворители. При нормировании ООР учитывают их

токсичность, длительность приема препарата и максимальную суточную дозу [148,149]. Методом контроля ООР, принадлежащим к 1 и 2 классу токсичности, является метод газовой хроматографии. Для растворителей 3 класса, в случае, если потеря в массе при высушивании не превышает 0,5 %, их количественная оценка не требуется [148,149].

В настоящее время анализе фармацевтических субстанций В преобладают способа количественного три основных определения: титриметрические методы, ВЭЖХ и УФ спектрофотометрия. Как правило, титриметрия и УФ спектрофотометрия актуальны для количественного определения, если содержание родственных примесей незначительно, либо они достаточно полно охарактеризованы. При значительном содержании примесей В субстанции неидентифицируемых ДЛЯ количественного определения предпочтение отдаётся методу ВЭЖХ (преимущественно со спектрофотометрическим детектированием), который позволяет отделить действующее вещество OT посторонних примесей [144].основное Количественное содержание рассчитывается на сухое вещество (при определении потери в массе при высушивании), на безводное вещество (если определяется вода), на безводное и свободное от остаточных органических растворителей (если определяется вода и остаточные органические растворители) [143].

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1

- 1. Бромокаин местный анестетик из группы замещенных амидов, показавший высокую эффективность в офтальмологии, эндоскопии, стоматологии, хирургии, неврологии и других областях медицинской практики в ходе широкой клинической апробации.
- 2. Создаваемые на основе бромокаина с перспективой внедрения в медицинскую и ветеринарную практику лекарственные средства для наружного применения, в том числе и инновационные (трансдермальные терапевтические системы), требуют разработки современных методов анализа для эффективной и достоверной оценки их качества.
- 3. Временная фармакопейная статья на субстанцию анилокаина не соответствует современным требованиям. В целях повышения контроля качества субстанции необходимым является пересмотр НД и включение в соответствующие разделы высокоэффективных методов анализа (ГЖХ, ВЭЖХ).
- 4. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием один из наиболее востребованных в практике фармацевтического анализа методов. ВЭЖХ используется в анализе местных анестетиков для установления их подлинности, при оценке родственных примесей и количественном определении.
- 5. Основными способами выделения местных анестетиков из биологических объектов при биоаналитических исследованиях являются осаждение белков плазмы крови, жидкость-жидкостная и твердофазная экстракция. Для обнаружения и количественного определения местных анестетиков извлечениях ИЗ биообъектов преимущественно метод ВЭЖХ со спектрофотометрическим и массиспользуется спектрометрическим детектированием.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

Бромокаин (субстанция)

Химическое название:

2-броманилид-3-диэтиламинопропановой кислоты гидрохлорид *Структурная формула*:

Br
$$NH \qquad N < C_2H_5 \\ C_2H_5 * HC$$

Молекулярная формула: $C_{13}H_{19}BrN_2O\cdot HCl$ М.м.

Молекулярная масса: 335,67 г/моль

Описание:

Белый кристаллический порошок со слабым характерным запахом аминов. Очень легко растворим в воде, легко растворим в спирте и хлороформе, мало растворим в ацетоне. Температура плавления 113-115 °C. Водный раствор имеет рН от 5,3 до 5,9.

Исследования проводили на серийных образцах субстанции бромокаина, синтезированных в ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России:

- серия 20.05.2012;
- серия 17.10.2011.

Архивные серии 15.04.2008 и 10.02.1988 использовали исключительно для анализа «родственных примесей».

Родственные примеси бромокаина:

2-броманилин, 98% (Sigma-Aldrich, CAS 615-36-1)

Структурная формула:

N-(2-бромфенил)акриламид

Структурная формула:

Синтез N-(2-бромфенил)акриламида осуществляли по авторской методике [111]:

В коническую колбу вместимостью 100 мл помещали 1,0 г бромокаина, прибавляли 50 мл воды очищенной и подщелачивали раствор до рН 8,0 раствором натрия гидроксида 0,1 М. Колбу помещали на кипящую водяную баню на 1 час. Затем раствор охлаждали до комнатной температуры. Образовавшийся хлопьевидный осадок отфильтровывали через беззольный фильтр (тип «синяя лента»). Осадок на фильтре многократно промывали водой, затем высушивали в сушильном шкафу при температуре около 60 °С до постоянной массы.

Структура примеси N-(2-бромфенил)акриламида подтверждена методом ГХ-МС.

Хроматографическая чистота соединения исследована методом ВЭЖХ–УФ при многоволновом детектировании. На хроматограмме отсутствуют посторонние пики кроме пика N-(2-бромфенил)акриламида, что свидетельствует о чистоте соединения.

Трансдермальная терапевтическая система (TTC) бромокаина 0,05 г и 0,10 г

Исследования проводили на экспериментальных образцах микроэмульсионных ТТС бромокаина, изготовленных в АНО «ИМБИИТ»:

- ТТС плацебо (с. 210612);
- TTC бромокаина с содержанием 5 % действующего вещества (с. 310512);
- ТТС бромокаина с содержанием 10 % действующего вещества (с. 140612). Описание:

TTC бромокаина представляет собой трехслойный пластырь. Нижний покровный слой — мультислойная пленка Foam tape 9773; средний слой - накладка из нетканого материала; защитный слой — пленка 3M Scotchpak 9730 Backing. Верхний защитный слой при использовании снимается.

Бромокаин вводится в лекарственную форму в виде микроэмульсионной композиции.

Состав микроэмульсии:

- натрия хлорид;
- α-токоферол в масле;
- докузат натриевая соль;
- полиглицерил-6 полирицинолеат (декалин ПР-20).

Биологические объекты

- плазма крови (бланковая);
- модельные образцы плазмы крови, используемые для разработки и валидации методики количественного определения бромокаина в плазме крови (концентрации калибровочных стандартов 42; 105; 210; 525; 840; 1050; 1575; 2100 нг/мл, концентрации образцов контроля качества 39; 117; 468; 936; 1404 нг/мл);
- печень, почки, кожа лабораторных животных, используемые для разработки биоаналитических методик;

 печень, почки, кожа лабораторных животных, отобранные через определенные промежутки времени после нанесения ТТС.

2.2. Реактивы

В работе использованы следующие реактивы, описанные в Государственной фармакопее РФ XIII издания, ОФС.1.3.0001.15 «Реактивы. Индикаторы».

Аммиака раствор концентрированный 25 %;

Аммония сульфат [77383-20-2];

Ацетонитрил для хроматографии;

Метанол для жидкостной хроматографии;

Натрия гидроксида раствор 0,1 М;

Петролейный эфир [8032-32-4];

Трифторуксусная кислота [76-05-1];

Трихлоруксусная кислота [76-03-9];

Хлористоводородной кислоты раствор 0,05 М;

Хлористоводородная кислота разведенная 10 %;

Хлороформ [67-66-3];

Приготовление фосфатных буферных растворов с рН 3,0; 5,0 и 8,0 описано в Государственной фармакопее РФ XIII издания, ОФС.1.3.0003.15 «Буферные растворы».

Для разработки методики определения ООР методом ГЖХ были использованы стандартные образцы ацетона (ГСО 8460-2003) и пропанола-1 (СТХ, 99,5 %, СОП 0023-03).

2.3. Методы исследования

Хроматографические методы

При проведении исследований методом ВЭЖХ использовано следующее оборудование:

– жидкостный хроматограф «LC-20 Prominence» (Shimadsu) с

диодноматричным детектором SPD-M20A. Разработка аналитических методик осуществлена на хроматографических колонках Zorbax SB-C18 (4,6 \times 250 мм, 5 мкм, Agilent) и Discovery® C18 (5 мкм, 250 \times 4,6 мм, Phenomenex);

микроколоночный жидкостный хроматограф «Милихром А-02» (ЗАО ИХ «ЭкоНова», Новосибирск, Россия) с ультрафиолетовым детектором.
 Хроматографическая колонка ProntoSIL 120-5 C18 AQ (2 × 75 мм, 5 мкм).

При проведении исследований методом ГЖХ использован газовый хроматограф «Хроматэк-Кристалл 5000.2» (ЗАО СКБ «Хроматэк», г. Йошкар-Ола) с пламенно-ионизационным детектором с капиллярной колонкой HP-FFAP (50 м, 0,32 мм, 0,52 мкм). Ввод пробы осуществляли с помощью дозатора равновесного пара (ДРП 214.4.464.022-03, ЗАО СКБ «Хроматэк», г. Йошкар-Ола).

Для обработки хроматографической информации использованы программы LabSolution (Shimadzu), МультиХром^{тм}, Хроматэк Аналитик 2.6.

Титриметрические методы

Методика титриметрического количественного определения субстанции анилокаина [110]:

около 0,05 г (точная навеска) субстанции помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 10 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,05 М, перемешивают в течение 10 мин, прибавляют 20 мл хлороформа, 3 капли смешанного индикатора и титруют при энергичном взбалтывании 0,015 М раствором натрия лаурилсульфата до розовофиолетового окрашивания хлороформного слоя. В конце титрования раствор прибавляют по каплям, наблюдая окраску органической фазы после разделения слоев.

Параллельно проводят контрольный опыт.

Титрованный раствор – 0,015 М раствора натрия лаурилсульфата,

индикатор – смесь 20 мл 0,1 % спиртового раствора диметилового желтого и

10 мл 0,1% спиртового раствора метиленового голубого.

1 мл 0,015 М раствора натрия лаурилсульфата соответствует 5,035 мг $C_{13}H_{19}BrN_2O\cdot HCl$ (анилокаина гидрохлорида).

Статистические методы

Статистическую обработку полученных в ходе исследований данных проводили в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов эксперимента» ГФ РФ с использованием программы Microsoft Excel 2010.

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ В СУБСТАНЦИИ БРОМОКАИНА

Технология субстанции синтеза бромокаина предусматривает использование на стадии очистки ацетона, который принадлежит к растворителям третьего класса токсичности и подлежит нормированию. В современных фармакопеях установленным методом для анализа ООР газо-жидкостная хроматография пламенно-ионизационным является детектированием (ГЖХ/ПИД).Исследование проводят на высокоэффективных капиллярных колонках, рекомендуемым режимом ввода пробы является парогазовый анализ из водных растворов либо из органических разбавителей. Нормативная документация на субстанцию бромокаина регламентирует определение ацетона методом газо-жидкостной хроматографии на насадочных колонках, которые по эффективности разделения значительно уступают капиллярным. Кроме того, прописанный в фармакопейной статье прямой ввод водного раствора бромокаина в испаритель хроматографа приводит к загрязнению колонки нелетучими соединениями, что сказывается на сроке её службы.

В связи с необходимостью приведения нормативной документации в соответствие с современными требованиями разработана методика определения содержания ацетона в субстанции бромокаина методом газожидкостной хроматографии и проведена её валидация.

При разработке и валидации методики для приготовления стандартных растворов использовали стандартный образец ацетона (ГСО 8460-2003) с концентрацией 1 мг/см³. Раствор внутреннего стандарта пропанола-1 готовили из стандартного образца (СТХ Пропанол-1, 99,5%, СОП 0023-03).

Выбор условий хроматографирования определялся физикохимическими свойствами анализируемых соединений. На этапе разработки методики исследовали стандартный водный раствор ацетона и пропанола-1 (внутренний стандарт) с концентрациями веществ 500 мкг/мл и 250 мкг/мл

соответственно. Для извлечения аналитов из водных растворов использовали вариант статической парофазной экстракции (СПЭ). Для этого, 5,0 мл стандартного раствора помещали в хроматографическую виалу объемом 15 мл с уплотнением, термостатировали, затем 1 мл парогазовой фазы вводили в испаритель хроматографа. Путём апробирования различных режимов термостатирования образца установлено, что оптимальными условиями являются нагрев при 60 °C в течение 10 минут. Дальнейшее увеличение времени термостатирования и температуры не привело к усилению сигнала анализируемых веществ, свидетельствует детектора OTЧТО об установившемся равновесии.

Газохроматографический анализ водных растворов субстанции в данных условиях подготовки пробы показал наличие в парогазовой фазе и бромокаина, летучих продуктов деградации количество которых существенно возрастало с увеличением температуры нагрева. Поэтому, следующим нашей работы подбор условий этапом стал хроматографирования, позволяющий эффективно разделить пики ацетона и пропанола-1 от пиков побочных продуктов распада бромокаина.

Для приготовления тестируемого раствора 2,5 г субстанции бромокаина (точная навеска) помещали в хроматографическую виалу объёмом 15 мл с уплотнением, добавляли 5 мл воды очищенной и 500 мкл раствора внутреннего стандарта (водного раствора пропанола-1 с концентрацией 2,50 мг/мл).

В результате эксперимента выбраны следующие условия определения ацетона в субстанции бромокаина методом ГЖХ/ПИД: хроматографическая колонка — HP-FFAP (50 м × 0,32 мм × 0,52 мкм); газ-носитель — азот; температура испарителя — 180 °C; температура детектора — 220 °C; температура колонки программируемая: начальная температура 75 °C, выдержка 5 минут, подъем со скоростью 10 °C/мин до 150 °C; скорость газаносителя — 7 мл/мин; расход водорода — 30 мл/мин; расход воздуха — 300

мл/мин; деление потока — 1:5. Параметры ДРП: температура термоблока (пробы) — 60 °C, температура крана ДРП — 95 °C, время отбора пробы — 5 с.

В данных условиях времена удерживания ацетона и пропанола-1 составили 4,4 и 6,4 мин. соответственно (рис. 3.1).

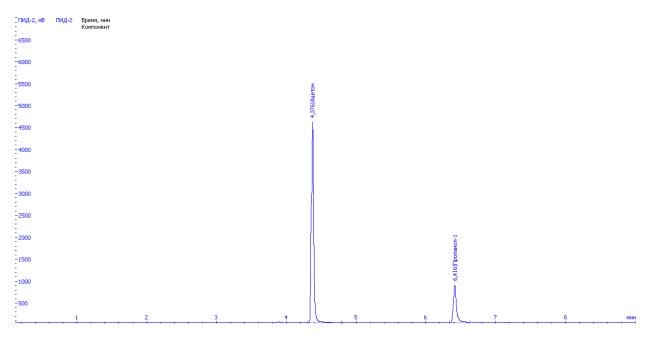


Рисунок 3.1 – Хроматограмма стандартного раствора ацетона и пропанола-1

Разработанные условия обеспечили чёткое разделение хроматографических пиков ацетона, пропанола-1 и продуктов деградации бромокаина (рис.3.2).

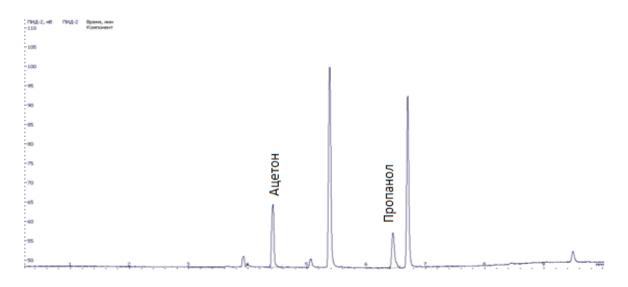


Рисунок 3.2 – **Хроматограмма испытуемого раствора субстанции бромокаина**

Таким образом, разработанные газохроматографические условия легли в основу методики определения ацетона в субстанции бромокаина. Приготовление испытуемого раствора субстанции, стандартного раствора ацетона и раствора внутреннего стандарта осуществляли следующим образом:

Испытуемый раствор. 2,5 г субстанции бромокаина (точная навеска) помещают в хроматографическую виалу объёмом 15 мл с уплотнением, прибавляют 5 мл воды очищенной и 500 мкл раствора внутреннего стандарта.

Стандартный раствор. 2,50 мл ГСО ацетона (ГСО 8460-2003; 1 мг/мл), что соответствует 0,0025 г ацетона, помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят до метки водой и перемешивают. 5 мл полученного раствора помещают в хроматографическую виалу объемом 15 мл с уплотнением, добавляют 500 мкл раствора внутреннего стандарта

Раствор внутреннего стандарта. 0,025 г пропанола-1 (СТХ Пропанол-1, 99,9%, СОП 0023-03) помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в 5 мл воды, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают.

Испытуемый и стандартный раствор термостатируют при 60 °C в течение 10 минут, 1 мл парогазовой фазы вводят в испаритель хроматографа.

Хроматографируют попеременно испытуемый и стандартный растворы, получая не менее трёх хроматограмм.

Содержание ацетона в ррт в субстанции (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{B \times a_0 \times 5}{B_0 \times a \times 10} \times 10^6 = \frac{B \times a_0}{B_0 \times a \times 2} \times 10^6$$

где:

B — среднее значение отношений площади пика ацетона к площади пика внутреннего стандарта на хроматограмме испытуемого раствора;

 B_0 — среднее значение отношений площади пика ацетона к площади пика внутреннего стандарта на хроматограмме стандартного раствора;

a — навеска испытуемой субстанции, в граммах; a_0 — навеска стандартного образца ацетона, в граммах.

Валидацию аналитической методики проводили в соответствии с ГФ РФ XIII издания и нормами руководства Международной конференции по гармонизации ICH Q2(R1) [151,152].

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

Для установления **линейности** методики количественного определения ацетона с использованием метода абсолютной калибровки были приготовлены и проанализированы калибровочные растворы ацетона в диапазоне концентраций от 5 до 600 мкг/мл (соответствует содержанию ацетона в субстанции от 10 до 1200 ppm). По результатам анализа построен калибровочный график и определён коэффициент корреляции (рис. 3.3, табл. 3.1).

Таблица 3.1 – Данные для построения градуировочного графика количественного определения ацетона в субстанции бромокаина (метод абсолютной калибровки)

Концентрация ацетона, ppm	Площадь пика ацетона*, мВ· мин
10	5,05
50	30,75
100	62,40
200	136,50
500	328,76
1000	633,89
1200	820,14

^{* -} среднее из трёх измерений

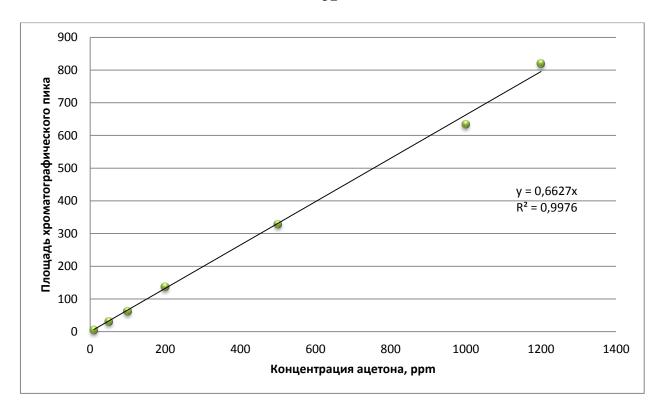


Рисунок 3.3 – Градуировочный график количественного определения ацетона (метод абсолютной калибровки)

Линейная зависимость наблюдалась во всем изучаемом диапазоне, коэффициент корреляции составил 0,9976.

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. Полученные данные представлены в таблице 3.2. Линейная зависимость наблюдалась во всем изучаемом диапазоне, коэффициент корелляции калибровочного графика (рис. 3.4) составил 0,9986.

Таблица 3.2 — Данные для построения градуировочного графика количественного определения ацетона в субстанции бромокаина (метод внутреннего стандарта)

Концентрация ацетона, ppm	Соотношение площадей пиков ацетона и пропанола-1*
10	0,06
20	0,12
100	0,45
200	0,93
500	2,29
1000	4,22
1200	5,10

^{* -} среднее из трёх измерений

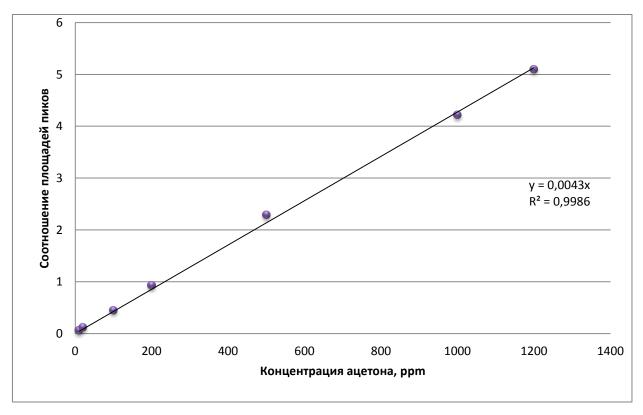


Рисунок 3.4 – Калибровочный график определения ацетона методом ГЖХ/ПИД (метод внутреннего стандарта)

При использовании обоих вариантов (абсолютной калибровки, внутреннего стандарта) при оценке линейности получены удовлетворительные показатели коэффициента корелляции (более 0,99). Но поскольку рекомендуемые хроматографические условия предусматривают парогазовый анализ из водных растворов субстанции, что может привести к

определенным потерям аналита, было принято решение ввести в нормативную документацию для определения показателя «Остаточные органические растворители» вариант расчета концентрации с использованием 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).

Всего проанализировано 12 образцов (по 3 на каждом концентрационном уровне). Результаты оценки правильности методики представлены в таблице 3.3.

Таблица 3.3 – Результаты оценки правильности методики анализа ООР в субстанции бромокаина методом ГЖХ/ПИД

Концентрация ацетона в растворе, ppm	Найденная концентрация, ppm	Открываемость (R), %	Метрологические характеристики (n=12, P=95 %)
100	112	112.00	(H-12, 1 -75 /0)
		112,00	4
100	102	102,00	
100	89	89,00	
500	484	96,80	$R_{cp} = 99,23$
500	516	103,20	SD = 5,54
500	508	101,60	RSD = 5,58
1000	962	96,20	$\Delta R_{cp} = 3,52$
1000	982	98,20	$t_{\text{рассч.}} = 0,48$
1000	958	95,80	$t_{{ m табл.}} = 2,\!20$
1200	1200	100,80	
1200	1188	99,00	
1200	1153	96,10	

Значения, принимаемые за истинные, лежат внутри доверительных интервалов полученных средних результатов анализа, что свидетельствует о правильности методики [152]. Незначимость систематической ошибки подтверждает и рассчитанный коэффициент Стьюдента, значение которого не превышает табличного.

Поскольку методика разрабатывалась с целью включения в проект нормативной документации, **прецизионность** оценивалась на 2 уровнях: как повторяемость (сходимость) и как внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность, в условиях, регламентированных ГФ РФ XIII [152]. В качестве объекта исследования использовали однородную модельную смесь на основе высокоочищенной субстанции бромокаина с добавлением ацетона на уровне 1000 ррт. Результаты оценки прецизионности представлены в таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Результаты оценки прецизионности методики анализа ООР в субстанции бромокаина методом ГЖХ/ПИД

Содержание ацетона,	Найденное содержание ацетона, ррт				
ppm	1 химик-аналитик	2 химик-аналитик			
1000	976	1005			
1000	1023	972			
1000	987	989			
1000	1010	1012			
1000	965	992			
1000	980 979				
Метрологические харан (n = 6, P = 95%)	стеристики				
Х 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.

Для оценки внутрилабораторной воспроизводимости вычисляли критерий Фишера, характеризующего неравенство дисперсий результатов анализа, выполненных разными аналитиками, и достоверность различия между дисперсиями этих определений. Поскольку величина расчетного

значения критерия Фишера меньше табличного значения, различия между результатами определений, проведенных двумя аналитиками, статистически незначимы.

На основании многократного анализа модельных растворов субстанции бромокаина с различным уровнем содержания ацетона были выбраны следующие критерии приемлемости для проверки пригодности хроматографической системы (ПХС):

- эффективность хроматографической колонки (N), рассчитанная для пиков ацетона и пропанола-1 не менее 7000 теоретических тарелок;
- фактор асимметрии (A) пиков ацетона и пропанола-1 (внутреннего стандарта) не более 2,0;
- относительное стандартное отклонение (RSD) для площадей пиков ацетона и пропанола-1 (при повторных инжекциях) не более 5 %;
- разрешение (Rs) между пиками ацетона, пропанола-1 и ближайшими пиками продуктов деградации бромокаина не менее 1,5.

Результаты оценки пригодности хроматографической системы представлены в таблице 3.5.

Таблица 3.5 — Значения параметров пригодности хроматографической системы при определении ацетона в субстанции бромокаина методом ГЖХ/ПИД

Параметры ПХС	Критерии приемлемости	Значения параметров ПХС (n=10)		
		Ацетон	Пропанол-1	
N, TT	не менее 7 000	13958±207	8724±72	
A	не более 2,0	$1,62\pm0,17$	$1,79\pm0,22$	
RSD, %	не более 5	$1,55\pm0,11$	$1,80\pm0,16$	
Rs	не менее 1,5	$3,25\pm0,27$	$1,96\pm0,20$	

С использованием разработанной методики [153] были проанализированы серийные образцы субстанции бромокаина. Содержание

ацетона в испытуемых образцах не превышало 0,5% (5000 ppm), рекомендуемых для растворителей третьего класса токсичности (таб. 3.6).

Таблица 3.6 – Результаты определения ацетона в серийных образцах субстанции бромокаина

Серия образца	Содержание ацетона, ррт
20.05.2012	107
17.10.2011	90
15.04.2008	38
10.02.1988	45

выводы по главе 3

- 1. Разработаны газохроматографические условия, позволяющие эффективно разделить хроматографические пики ацетона, пропанола-1 (внутреннего стандарта) от пиков летучих продуктов деградации бромокаина.
- 2. Для извлечения аналитов из водных растворов для дальнейшего анализа методом ГЖХ/ПИД предложен современный вариант статической парофазной экстракции, позволяющий избежать загрязнения хроматографической колонки нелетучими компонентами.
- 3. В результате валидации подтверждена специфичность, линейность, правильность и прецизионность разработанной методики, установлены критерии пригодности хроматографической системы.
- 4. С помощью предложенной методики произведен анализ серийных субстанций бромокаина. Содержание ацетона в проанализированных образцах не превышает 1000 ppm (0,1%).

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК АНАЛИЗА ПОКАЗАТЕЛЕЙ «РОДСТВЕННЫЕ ПРИМЕСИ» И «КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ» В СУБСТАНЦИИ БРОМОКАИНА МЕТОДОМ ВЭЖХ

4.1 Разработка и валидация методики количественного определения родственных примесей в субстанции бромокаина методом ВЭЖХ

ВФС субстанцию анилокаина регламентирует определение примесей родственных методом тонкослойной хроматографии [110].Поскольку TCX является полуколичественным более методом, предпочтительным в плане точности и специфичности для определения родственных примесей является метод ВЭЖХ.

На основании ранее проведенных исследований установлены направления распада молекулы бромокаина: гидролиз по амидной связи и реакция β-элиминирования. В нейтральной и слабощелочной среде преобладает процесс β-элиминирования, сопровождающийся выделением непредельного соединения и диэтиламина. Наряду с этим идет частичный гидролиз по амидной связи. В сильнокислой среде происходит полный гидролиз молекулы по амидной связи с выделением 2-броманилина [111].

Таким образом, 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) (рис. 4.1.1).

$$\begin{array}{c|c} NH - C - CH = CH_2 \\ \parallel & \\ O \\ I \end{array}$$

Рисунок 4.1.1 – Структурные формулы N-(2-бромфенил) акриламида (I) и 2-броманилина (II)

В качестве объектов исследования использовали фармацевтическую субстанцию бромокаина[12], 2-броманилин (Sigma-Aldrich, CAS 615-36-1),

N-(2-бромфенил)акриламид (синтез вещества осуществлен по методике [111], хроматографическая чистота не менее 99%).

С целью выбора оптимального растворителя для приготовления испытуемых растворов для хроматографического анализа при определении идентифицированных родственных примесей бромокаина в субстанции и его лекарственных формах нами оценена растворимость действующего вещества и его примесей в совместимых с условиями обращённо-фазной ВЭЖХ растворителях: воде, ацетонитриле и метаноле. Определение растворимости проводили согласно требованиям ГФ РФ XIII. Результаты исследования представлены в таблице 4.1.1.

Таблица 4.1.1 – Результаты определения растворимости бромокаина, 2-броманилина и N-(2-бромфенил)акриламида

Исследуемое соединение	Растворители					
	Вода Метанол		Ацетонитрил			
	очищенная					
Бромокаин	Очень легко	Легко	Умеренно			
	растворим	растворим	растворим			
2-броманилин	Практически	Растворим	Мало			
	не растворим	т астворим	растворим			
N-(2-бромфенил)акриламид	Практически	Легко	Умеренно			
	не растворим	растворим	растворим			

С учетом полученных данных испытуемые растворы субстанции бромокаина и стандартные растворы идентифицированных примесей готовили с использованием метанола в качестве растворителя.

Исследования по разработке методики количественного определения родственных примесей проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence (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 нами апробированы элюенты на основе водно-ацетонитрильных смесей. В качестве

модификаторов использовали фосфатные буферы с различными значениями рН (3,0; 5,0; 8,0). Исследование проводили на метанольном растворе с концентрацией компонентов (бромокаина, 2-броманилина и N-(2-бромфенил)акриламида) 200 мкг/мл.

фармакопея субстанции Европейская ДЛЯ анализа лидокаина гидрохлорида (структурного аналога бромокаина) методом ВЭЖХ на наличие органических примесей рекомендует в качестве элюента смесь ацетонитрила и фосфатного буфера с рН 8,0. При использовании этой подвижной фазы в анализе модельной смеси бромокаина специфических примесей исследуемые вещества элюировались в следующем порядке: N-(2-бромфенил)акриламид со временем удерживания 8,8 мин., 2-броманилин – 11,3 мин. и бромокаин – 12,1 мин. Однако данные условия не позволили эффективно разделить бромокаин и 2-броманилин (коэффициент разделения пиков составил менее 2). Изменение соотношения компонентов в элюенте качественно не изменило ситуацию. Замена в составе подвижной фазы фосфатного буфера с рН 8,0 на фосфатные буферы с рН 5,0 и рН 3,0 привело к уменьшению удерживания бромокаина (время удерживания – 4,1 и 3,2 мин соответственно) и эффективному разделению всех компонентов удерживания пиков N-(2-бромфенил)акриламида пробы. Времена 2-броманилина не изменились. Пример хроматограммы модельной смеси приведен на рис.4.1.2.

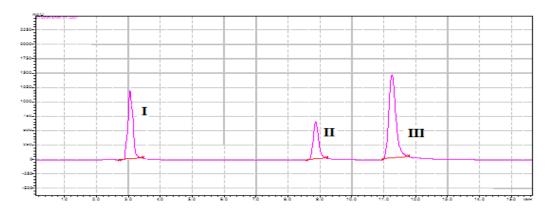


Рисунок 4.1.2 — Хроматограмма модельной смеси бромокаина (I), N-(2-бромфенил)акриламида (II) и 2-броманилина (III) (элюент: фосфатный буфер с рН 3,0 — ацетонитрил (60: 40), скорость потока: 1,0 мл/мин)

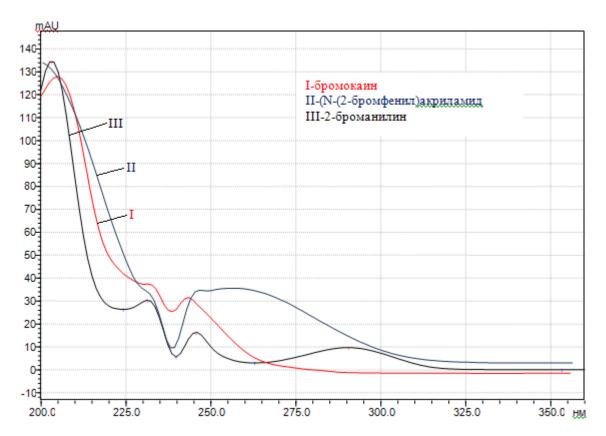


Рисунок 4.1.3 – УФ-спектры исследуемых веществ в элюенте

В качестве аналитической выбрана длина волны 210 нм, поскольку в данной области спектра изучаемые вещества характеризуются максимальным поглощением (рис. 4.1.3), что в итоге обеспечит наибольшую чувствительность методики при определении примесей.

Хроматографическое исследование концентрированных растворов субстанций бромокаина (4000 мкг/мл) показало, что при использовании подвижной фазы на основе ацетонитрила и фосфатного буфера с рН 3,0 на хроматограммах обнаруживалась дополнительная неидентифицированная примесь с относительным временем удерживания по бромокаину около 1,9 (абсолютное время удерживания 6,2 мин.) (рис. 4.1.4).

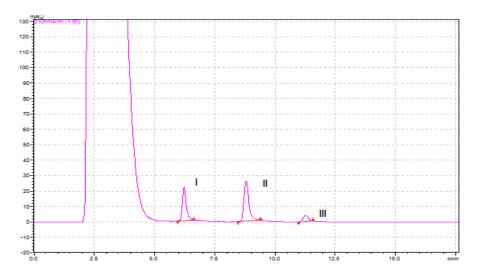


Рисунок 4.1.4 — Хроматограмма модельного раствора смеси бромокаина (4000 мкг/мл), N-(2-бромфенил) акриламида (II) и 2-броманилина (III), I — неидентифицированная примесь

При применении элюентов с буферными растворами рН 5,0 и рН 8,0 данная примесь не обнаруживалась. Можно предположить, что в данных условиях примесь элюируется совместно с бромокаином.

Таким образом, проведенные исследования показали, что оптимальное разделение бромокаина и его возможных примесей (как идентифицированных, так и неидентифицированных) наблюдается в изократическом режиме ВЭЖХ при использовании элюента фосфатный буфер рН 3,0 – ацетонитрил (60:40). Скорость потока подвижной фазы – 1,0 мл/мин, длина волны детектирования – 210 нм. Время регистрации хроматограммы – 20 минут.

Для определения возможных примесей 0,1 г субстанции бромокаина помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили до метки метанолом (испытуемый раствор). 20 мкл раствора вводили в инжектор Идентификацию хроматографа. И количественное определение идентифицированных примесей осуществляли c использованием растворов N-(2-бромфенил)акриламида стандартных метанольных 2-броманилина. При оценке содержания неидентифицированных примесей использовали разведения испытуемой субстанции. Для этого готовили раствор сравнения путём разведения испытуемого раствора метанолом до концентрации 4,0 мкг/мл (0,1 %) от концентрации бромокаина гидрохлорида в испытуемом растворе).

Стандартные растворы идентифицированных примесей готовили следующим образом:

0,01000 г (точная навеска) 2-броманилина помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в метаноле и доводили тем же растворителем объем раствора до метки (раствор A).

0,01000 г (точная навеска) N-(2-бромфенил)акриламида помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в метаноле и доводили тем же растворителем объем раствора до метки (раствор Б).

0,1 мл раствора A и 0,5 мл раствора Б помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили метанолом объем раствора до метки (раствор B).

Содержание N-(2-бромфенил) акриламида в субстанции в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \times a_0 \times 0.5 \times 25 \times 100}{S_0 \times 25 \times 50 \times a} = \frac{S \times a_0}{S_0 \times a}$$
, где

S — площадь пика N-(2-бромфенил) акриламида на хроматограмме испытуемого раствора;

 S_0 – площадь пика N-(2-бромфенил)акриламида на хроматограмме раствора стандартного образца;

 a_0 – навеска N-(2-бромфенил)акриламида, в граммах;

a — навеска субстанции, в граммах.

Содержание 2-броманилина в субстанции в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \times a_0 \times 0,1 \times 25 \times 100}{S_0 \times 50 \times 50 \times a} = \frac{S \times a_0}{S_0 \times a \times 10},$$
 где

S — площадь пика 2-броманилина на хроматограмме испытуемого раствора; S_0 — площадь пика 2-броманилина на хроматограмме раствора стандартного образца;

 a_0 — навеска 2-броманилина, в граммах; a — навеска субстанции, в граммах.

Валидацию аналитической методики определения родственных примесей проводили в соответствии с требованиями ГФ XIII по следующим показателям: специфичность, линейность, правильность, повторяемость, предел обнаружения и предел количественного определения.

При подтверждении *специфичности* методики анализировали раствор модельной смеси субстанции бромокаина (4000 мкг/мл) и возможных примесей: N-(2-бромфенил)акриламида (4 мкг/мл) и 2-броманилина (0,4 мкг/мл) в метаноле.

Выбранные хроматографические условия характеризуются высокой эффективностью (не менее 8000 TT), достаточной разрешающей способностью и воспроизводимостью. Рассчитанные критерии пригодности хроматографической системы удовлетворяют принятым критериям приемлемости (табл. 4.1.2).

Таблица 4.1.2 – Оценка пригодности хроматографической системы

Образец	Время удерживания мин.	Разрешение (Rs)	Коэффици- ент асимметрии пика	Воспроизво- димость инжекций (RSD)
1	2	3	4	5
Бромокаин	$3,20 \pm 0,02$	-	-	-
Неидентифицированная примесь	$6,22 \pm 0,02$	6,15	1,35	1,05
N-(2-бромфенил)акриламид	$8,80 \pm 0,02$	7,84	1,40	0,87
2-броманилин	$11,30 \pm 0,03$	6,40	1,24	0,52
		Критерии приемлемости		
		Более 2	0,75 - 2,5	Менее 2

На хроматограмме растворителя отсутствовали хроматографические пики со временами удерживания, близкими к временам удерживания бромокаина и примесей.

Линейность определяли на 7 уровнях концентрации: от 0,02 % до 0,4 % – для N-(2-бромфенил)акриламида, от 0,0014 % до 0,044 % – 2-броманилина (табл. 4.1.3 – 4.1.4). Каждый из приготовленных растворов

хроматографировали 3 раза. Калибровочные графики представлены на рис. 4.1.5 — 4.1.6. Коэффициент корреляции в обоих случаях составил не менее 0,999, что свидетельствует о линейности методики в выбранном диапазоне концентраций.

Таблица 4.1.3 – 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)

Коэффициент корреляции г: 0,9998

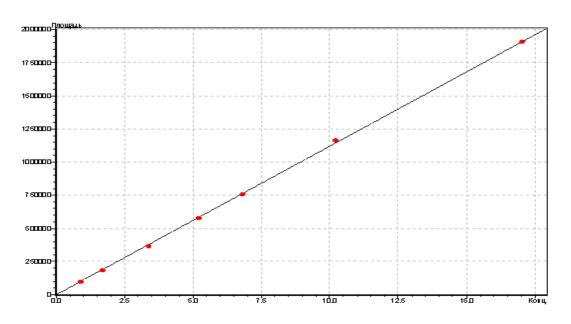


Рисунок 4.1.5 – Зависимость площади хроматографического пика от концентрации N-(2-бромфенил)акриламида

a = 112011,7

b = 0.0

 Таблица 4.1.4 – 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 г: 0,9999

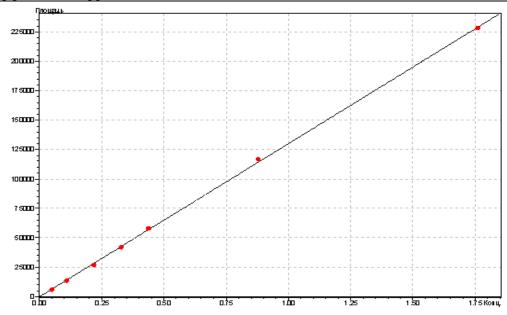


Рисунок 4.1.6 –Зависимость площади хроматографического пика от концентрации 2-броманилина

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. Каждый из растворов хроматографировали в соответствии с разработанной методикой 3 раза. Результаты проведенного эксперимента представлены в таблицах 4.1.5 — 4.1.6.

Таблица 4.1.5 – Оценка повторяемости (сходимости) определения N-(2-бромфенил)акриламида

Содержание N- (2-бромфенил)акриламида Найденное содержание N- (2-бромфенил)акриламида, Метрологическа характеристик (n=6; P=0,95)		гики				
в растворе, мкг/мл	мкг/мл	n	$\overline{\mathbf{x}}$	SD	RSD	$\Delta^{\overline{X}}$
1,96 (0,049%)	2,11; 1,87; 2,07; 1,79; 1,91; 2,20	6	1,99	0,128	6,44	0,17
3,92 (0,098%)	3,83; 3,74; 3,99; 4,21; 3,69; 4,16	6	3,94	0,194	4,93	0,23
5,88 (0,147%)	6,08; 6,19; 5,91; 6,11; 5,82; 5,74	6	5,98	0,142	2,37	0,18

Таблица 4.1.6 — Оценка повторяемости (сходимости) определения 2-броманилина

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

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

Включение аналитической методики в проект нормативной документации (фармакопейной статьи) требует оценки **прецизионности** не только на уровне повторяемости (сходимости), но и на уровне внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности [152].

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 не превышают табличных, что

свидетельствует о незначимости различий между результатами измерений (таб.4.1.7 - 4.1.8).

Таблица 4.1.7 – Оценка внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности методики количественного определения N-(2-бромфенил)акриламида

Содержание	Результаты 1	Результаты 2		
N-(2-бромфенил)акриламида	химика-аналитика химика-аналит			
в растворе, мкг/мл				
	4,22	4,15		
	4,11	4,02		
4 (0,1%)	4,17	3,89		
	3,91	4,23		
	4,25	3,91		
	3,79	4,11		
	Метрологические характер	истики (n= 6, P=95%)		
$X_{cp.}$	4,08	4,05		
D	0,034	0,018		
SD	0,185	0,136		
RSD	4,53	3,36		
Критерий Фишера (табл. 5,05)	1,89			

Таблица 4.1.8 — Оценка внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности методики количественного определения 2-броманилина

Содержание	Результаты 1	Результаты 2		
2-броманилина в растворе,	химика-аналитика	химика-аналитика		
мкг/мл				
	0,46	0,36		
	0,43	0,46		
0,4 (0,01%)	0,49	0,45		
	0,37	0,35		
	0,39	0,39		
	0,46	0,44		
	Метрологические характер	истики (n= 6, P=95%)		
X _{cp.}	0,45	0,41		
D	0,0022	0,0023		
SD	0,047	0,048		
RSD	10,44 11,71			
Критерий Фишера (табл. 5,05)	1,05			

Правильность методики оценивали c тестирования ПОМОЩЬЮ открываемости идентифицируемых примесей. Исследования проводили на 4.1.9-4.1.10). концентрациях примесей (табл. Границы трех уровнях (2-бромфенил)акриламида 2-броманилина с открываемости И

доверительного интервала не выходят за нормируемые пределы (80-120 % -для примесей с содержанием до 0,05 %; 85-115 % -с содержанием от 0,051до 0,50 %), что свидетельствует о **правильности методики.**

Таблица 4.1.9 – Оценка правильности определения N-(2-бромфенил)акриламида

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

Таблица 4.1.10 – Оценка правильности определения 2-броманилина

Содержание	Открываемость (R), %	Метрологические характеристики (n=6; P=0,95)				
2-броманилина, %	o inpulse in the interpretation of the inter	n	R	SD	RSD	$\Delta \bar{R}$
0,005	107,2; 98,23; 104,26; 96,30; 92,05; 108,19	6	101,04	5,65	5,59	6,81
0,01	99,59; 106,82; 114,34; 95,02; 108,37; 97,17	6	103,55	6,91	6,67	7,84
0,015	105,36; 96,01; 101,25; 115,35; 94,96; 106,03	6	103,16	7,42	7,19	7,90

Предел обнаружения вычисляли через соотношение сигнал/шум по формуле:

$$LOD = K_q \times \frac{(\kappa o h \mu e h m p a \mu u s)}{(c u r h a \pi / u v s)},$$

где: LOD – предел обнаружения

 K_q – константа обнаружения (К=3)

Таблица 4.1.11 — Результаты вычисления предела обнаружения N-(2-бромфенил)акриламида

№ п/п	Концентрация N-(2-бромфенил)акриламида, мкг/мл					
J/0 H/H	0,250	0,501	1,006			
		Сигнал/шум				
1	6,93	15,21	28,76			
2	8,26	14,06	29,18			
3	8,49	14,95	29,12			
Сигнал/шум, $\mathbf{X}_{\mathbf{CP}}$	7,89	14,74	29,02			
LOD, мкг/мл	0,095	0,102	0,104			

 Таблица 4.1.12 — Результаты вычисления предела обнаружения

 2-броманилина

№ п/п	Концентрация 2-броманилина, мкг/мл				
JN≌ 11/11	0,060	0,080	0,100		
	Сигнал/шум				
1	12,29	15,86	21,30		
2	11,84	16,04	21,64		
3	11,91	16,05	21,36		
Сигнал/шум, $\mathbf{X}_{\mathbf{CP}}$	12,03	15,98	21,43		
LOD, мкг/мл	0,015	0,015	0,014		

Предел обнаружения для 2-броманилина по тестируемой методике составил 0.015 мкг/мл (0.000375%) от содержания бромокаина), для N-(2-бромфенил)акриламида -0.1 мкг/мл (0.0025%).

Предел количественного определения вычисляли через соотношение сигнал/шум по формуле:

$$LOQ = K_q \times \frac{(\kappa o \mu e h m p a \mu s)}{(c u \epsilon h a \pi / u y m)},$$

где: LOQ – предел количественного обнаружения

 K_q – константа обнаружения (K=10)

Исходя из данных таблиц 4.1.11 - 4.1.12, предел количественного определения составил для 2-броманилина -0.05 мкг/мл (0.00125 %) от содержания бромокаина), для N-(2-бромфенил)акриламида -0.33 мкг/мл (0.00825 %).

Разработанная методика определения примесей в субстанции бромокаина [154] методом ВЭЖХ была апробирована при анализе

нескольких образцов субстанции бромокаина (с. 20.05.2012; 17.10.2011; 15.04.2008; 10.02.1988).

Таблица 4.1.13 – Результаты анализа серийных образцов субстанции бромокаина

Conva	Содержание идентифицированных примесей, %		Содержание неидентифицированной примеси с	Содержание	Общее содержание	
Серия	N-(2- бромфенил)	2-броманилин	относительным временем удерживания	любой другой примеси, %	примесей, %	
	акриламид	_ · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	1,9, %			
20.05.2012	0,0056	0,0010	Не более 0,1	Не более 0,1	Не более 0,5	
17.10.2011	0,0026	0,0013	Не более 0,1	Не более 0,1	Не более 0,5	
15.04.2008	0,0009	0,0003	Не более 0,1	Не более 0,1	Не более 0,5	
10.02.1988	0,0015	0,0047	Не более 0,1	Не более 0,1	Не более 0,5	

Ha полученных данных предложено основании нормировать содержание в субстанции бромокаина: 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 %.

4.2 Разработка и валидация методики количественного определения бромокаина в субстанции методом ВЭЖХ

ГФ XIII рекомендует применять химические методы анализа для определения содержания действующего вещества в субстанции в сочетании с современными физико-химическими методами анализа, используемыми для идентификации субстанции и контроля примесей [152].

Нами предложены условия ВЭЖХ, позволяющие проводить оценку качества субстанции бромокаина по показателям «Подлинность» и «Количественное определение».

При разработке аналитической методики для установления подлинности и количественного определения бромокаина в субстанции методом ВЭЖХ нами использованы хроматографические условия, предложенные для анализа «родственных» примесей:

– хроматографическая колонка: Zorbax SB-C18 ($4,6 \times 250$ мм, 5 мкм);

- подвижная фаза: $\Phi SP (pH 3,0) -$ ацетонитрил;

– режим элюирования: изократический;

– скорость потока элюента:1,0 мл/мин;

- температура термостата колонки: 40 °C;

– длина волны детектирования: 210 нм.

В качестве объекта исследования использовали водный раствор бромокаина с концентрацией 100 мкг/мл.

С целью достижения приемлемого коэффициента емкости бромокаина содержание ацетонитрила в элюенте варьировалось (таблица 4.2.1).

Таблица 4.2.1 – Хроматографические характеристики пика бромокаина при различных соотношениях компонентов в составе подвижной фазы

Соотношение компонентов ПФ	Время удерживания,	Коэффициент емкости	Фактор асимметрии Объём вводимой пробы			
Φ БР (рН 3,0) – ацетонитрил	МИН	C 11110 C 111	20 мкл	10 мкл		
60:40	3,20	1,66	1,54	1,32		
70:30	4,02	2,09	1,43	1,25		
75:25	5,04	3,07	1,38	1,27		
80:20	5,86	3,18	1,31	1,11		

Оптимальных характеристик удерживания удалось достичь при использовании подвижной фазы состава: фосфатный буферный раствор (рН 3,0) — ацетонитрил в соотношении 80:20 (рис. 4.2.1). Снижение объёма вводимой пробы до 10 мкл привело к улучшению симметрии хроматографического пика бромокаина.

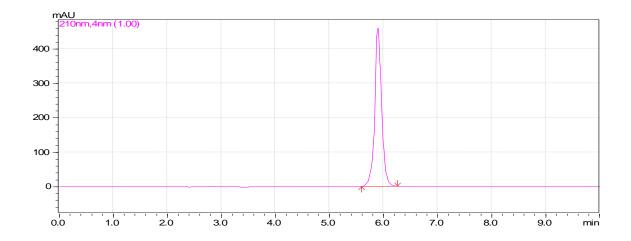


Рисунок 4.2.1 – Хроматограмма раствора субстанции бромокаина (ПФ: фосфатный буферный раствор (рН 3,0) – ацетонитрил (80:20))

Данные хроматографические условия были положены в основу методики количественного определения бромокаина в субстанции.

В связи с отсутствием фармакопейных стандартных образцов в качестве стандарта использовалась субстанция бромокаина, дополнительно очищенная путем перекристаллизации. Содержание основного компонента согласно фармакопейным требованиям рассчитывали, используя принцип материального баланса, исходя из полученных данных о содержании примесей (органических, остаточных органических растворителей, воды). Результаты контроля качества дополнительно очищенной субстанции приведены в таблице 4.2.2.

 Таблица 4.2.2 – Показатели контроля качества стандартного образца

 бромокаина

Показатели	Результаты испытания
Описание	Белый кристаллический порошок со слабым характерным
	запахом аминов.
Растворимость	Очень легко растворим в воде, легко растворим в 95%
	этиловом спирте и хлороформе, мало растворим в
	ацетоне.
Подлинность	Положительна
Температура плавления, °С	113-114
Прозрачность раствора	Прозрачный
Цветность	Бесцветный
рН раствора	5,5

Продолжение таблицы 4.2.2

Показатели	Результаты испытания				
Родственные примеси, %	2-броманилин 0,0009				
	N-(2-бромфенил)акриламид 0,0003				
Остаточные органические	0,0015% (150 ppm)				
растворители					
Вода	0,03 %				
(метод К.Фишера)					
Количественное	99,97				
содержание, %					
(материальный баланс)					

Приготовление испытуемого раствора субстанции и рабочего стандартного раствора бромокаина проводили следующим образом:

Около 0,1 г (точная навеска) субстанции бромокаина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем водой до метки, перемешивают. 5,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объём подвижной фазой до метки и перемешивают (испытуемый раствор).

Около 0,050 г (точная навеска) стандартного образца бромокаина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объём водой до метки, перемешивают. 5,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объём подвижной фазой до метки и перемешивают (раствор РСО).

Хроматографируют раствор рабочего стандартного образца и испытуемый раствор, получая не менее трёх хроматограмм для каждого.

Содержание бромокаина в субстанции в процентах (X) в пересчёте на безводное и не содержащее органических растворителей вещество вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \times a_0 \times 5 \times 100 \times 50 \times P \times 100 \times 100}{S_0 \times 50 \times 50 \times a \times 5 \times 100 \times (100 - W)} = \frac{S \times a_0 \times P \times 200}{S_0 \times a \times (100 - W)} \,, \quad \text{где}$$

S — площадь пика бромокаина на хроматограмме испытуемого раствора; S_0 — площадь пика бромокаина на хроматограмме раствора РСО;

 a_0 – навеска РСО бромокаина, в граммах;

a — навеска субстанции, в граммах;

P– содержание бромокаина в PCO, в процентах;

W— суммарное содержание воды и органических растворителей, в процентах.

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 РСО совпадают, на хроматограмме растворителя (10% метанола в ПФ) отсутствуют пики, мешающие определению основного аналита (рис. 4.2.2).

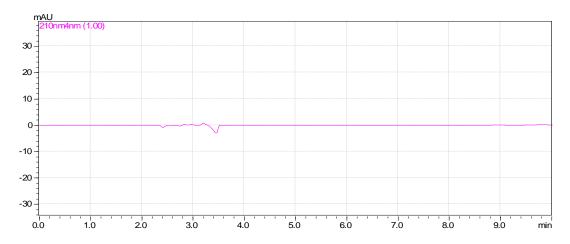


Рисунок 4.2.2 – Хроматограмма раствора плацебо (растворителя)

Линейность методики количественного определения бромокаина в субстанции оценивали по результатам анализа калибровочных растворов (таблица 4.2.3), приготовленных из стандартного образца в диапазоне концентраций от 80 до 120% от номинальной концентрации испытуемого раствора (100 мкг/мл). Градуировочный график представлен на рис. 4.2.3.

Таблица 4.2.3 – 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
$0,08020~(\approx 80\%)$	80,2	2999110
$0,08985 \ (\approx 90\%)$	89,85	3333785
$0,10010~(\approx 100\%)$	100,10	3707940
0,11030 (≈110%)	110,30	4092129
$0,12015~(\approx 120\%)$	120,15	4460772

Уравнение регрессии (Y = aX + b)

a = 37134,01

b = 0.0

Коэффициент корреляции г: 0,9999

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

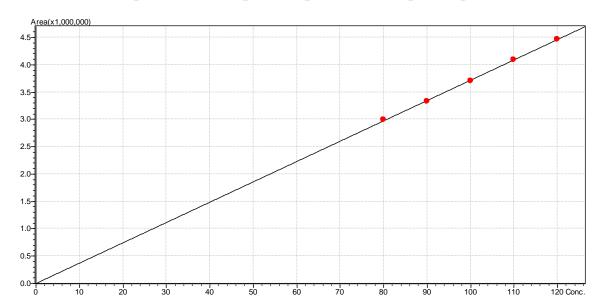


Рисунок 4.2.3 — Зависимость площади хроматографического пика от концентрации бромокаина

Правильность аналитической методики оценивали путем анализа растворов с известным содержанием стандарта бромокаина на трех уровнях концентраций (80 %, 100 %, 120 % от номинальной). Готовили и хроматографировали испытуемые растворы в соответствии с разработанной методикой. Результаты исследования представлены в таблице 4.2.4. Доверительные интервалы полученных средних результатов анализа включают значения, принимаемые за истинные.

Таблица 4.2.4 – Оценка правильности методики количественного определения бромокаина методом ВЭЖХ

	80 %			100 %		120 %			
№	Введено,	Найдено, г	R	Введено,	Найдено, г	R	Введено,	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
	$R \pm \Delta R$ $99,83 \pm 0,49$				$R \pm \Delta R$ $99,89 \pm 0,36$				

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_{cp}) , стандартное отклонение (SD), относительное стандартное отклонение (RSD) и дисперсии этих данных (таблица 4.2.5).

Таблица 4.2.5 – Определение прецизионности методики количественного определения бромокаина в субстанции методом ВЭЖХ

$N_{\underline{0}}$	1 аналитик	2 аналитик			
Π/Π	Найденное содержание бромокаина, %	Найденное содержание бромокаина, %			
1	99,71	100,23			
2	99,58	99,71			
3	100,17	98,98			
4	99,19	99,58			
5	100,06	99,32			
6	99,42	99,16			
	Метрологические характери	стики (n= 6, P=95%)			
X_{cp}	99,69	99,50			
SD	0,38	0,45			
RSD	0,38	0,45			
S^2	0,1444	0,2025			
Г рассч.	1,	,43			
$F_{\text{табл.}}$	5,05 (P=95 %, f ₁ и f ₂ = 5)				

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 Фишера (таблица 4.2.5). Величина расчетного значения критерия Фишера оказалась меньше табличного значения, что говорит о статистически незначимом различии между результатами определений двумя аналитиками.

Параллельно на субстанции (с 20.05.2012) нами проводилась сравнительная оценка разработанной методики количественного определения бромокаина в субстанции методом ВЭЖХ с методикой, включенной в ВФС (титриметрической) по показателю воспроизводимость.

Методика количественного определения бромокаина в субстанции методом экстракционного титрования приведена в Главе 2 диссертации (с. 45-46).

Полученные результаты представлены в таблице 4.2.6.

Таблица 4.2.6 – Результаты количественного определения бромокаина в субстанции (20.05.2012) методом экстракционного титрования

Навеска, г	Объем титрованного	Количественное
	раствора, мл	содержание, %
0,04985	9,80	98,98
0,05090	10,15	100,40
0,05155	10,25	100,11
0,04895	9,65	99,26
0,05210	10,30	99,54
0,05065	9,95	98,91
	X _{cp}	99,53
	RSD	0,61

Установлено, что разработанная методика количественного определения бромокаина в субстанции методом ВЭЖХ по воспроизводимости (сходимости) получаемых результатов сопоставима с титриметрической методикой.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4

- 1. Выбраны условия определения бромокаина и «родственных» примесей (2-броманилина и N-(2-бромфенил)акриламида) методом ВЭЖХ на обращённо-фазной колонке Zorbax SB-C18 (4,6 × 250 мм, 5 мкм). Изократическое элюирование подвижной фазой состава: фосфатный буферный раствор (рН 3,0) ацетонитрил (60:40) при скорости потока 1,0 мл/мин позволяет эффективно разделять исследуемые соединения. При использовании данных условий в анализе образцов субстанции бромокаина обнаруживается неидентифицированная примесь с относительным временем удерживания по бромокаину 1,9.
- 2. С учетом УФ спектров исследуемых идентифицированных примесей в подвижной фазе выбрана оптимальная длина детектирования спектрофотометрического детектора (210 нм), обеспечивающая наибольшую чувствительность методики.
- 3. Проведена валидация методики количественного определения идентифицированных «родственных примесей» по показателям специфичность, линейность, правильность и прецизионность. Предел количественного определения для 2-броманилина составил 0,05 мкг/мл (0,00125 % от содержания бромокаина), для N-(2-бромфенил)акриламида 0,33 мкг/мл (0,00825 %).
- 4. С помощью разработанных условий произведено исследование серийных субстанций бромокаина по показателю «Родственные примеси». По результатам предложено нормировать содержание в субстанции бромокаина: 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 %.

5. Разработана методика количественного определения бромокаина субстанции ВЭЖХ на обращённо-фазной методом колонке использованием подвижной фазы состава фосфатный буферный раствор (рН 3,0) – ацетонитрил (80:20). В результате валидации установлена ее специфичность, линейность, прецизионность, правильность. Установлено, что по воспроизводимости получаемых результатов разработанная методика не уступает методике экстракционного титрования, включенной в ВФС, и может использоваться в качестве альтернативной.

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ РОДСТВЕННЫХ ПРИМЕСЕЙ В ТРАНСДЕРМАЛЬНОЙ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ (ТТС) БРОМОКАИНА 0,05 г и 0,10 г

В период с 2012 по 2013 г. в ПГФА в рамках НИОКР были проведены доклинические исследования ТТС бромокаина. Одной из задач данного исследования была разработка методик оценки качества лекарственного препарата по показателям «Количественное определение» и «Родственные примеси» с целью включения их в проект нормативной документации.

5.1 Разработка и валидация методики количественного определения бромокаина в TTC 0,05 г и 0,10 г

В качестве исходных были апробированы условия ВЭЖХ, предложенные для количественного определения бромокаина в субстанции 4.2). (п. Разработку методики проводили c использованием хроматографической колонки Discovery® C18 (5 MKM, 250×4.6 MM, Phenomenex).

Учитывая хорошую растворимость бромокаина в воде, нами предложен следующий вариант пробоподготовки ТТС к хроматографическому анализу:

в коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 100 мл помещают 50 мл воды. ТТС освобождают от защитного слоя. Накладку из нетканого материала, разрезанную на части размером примерно 1см × 1см, помещают в колбу. Ножницы, которыми разрезали накладку, обтирают кусочком фильтровальной бумаги, которую также помещают в коническую колбу. Колбу закрывают пробкой, помещают на водяную баню (температура не выше 40 °C) и при периодическом перемешивании выдерживают в течение 1 часа. Водное извлечение переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, фильтруя через бумажный фильтр. Извлечение повторяют еще 2 раза (объём воды — 20 мл, время настаивания — 20 минут). Полученные

растворы переносят в ту же мерную колбу. Объем раствора в колбе доводят до метки водой и перемешивают (раствор А).

10,0 мл полученного раствора (при анализе ТТС бромокаина 0,05 г) или 5,0 мл раствора (ТТС бромокаина 0,10 г) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем подвижной фазой до метки и перемешивают (раствор Б – испытуемый раствор). Испытуемый раствор фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Последовательно хроматографируют раствор стандартного образца бромокаина и испытуемый раствор, получая по 3 хроматограммы для каждого раствора.

Расчет количественного содержания бромокаина в ТТС проводили методом внешнего стандарта с использованием стандартного раствора бромокаина с концентрацией 100 мкг/мл.

Приготовление раствора стандартного образца (РСО) бромокаина:

Около 0,025 г (точная навеска) субстанции бромокаина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем водой до метки, перемешивают. 10,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем подвижной фазой до метки и перемешивают (раствор РСО).

Содержание бромокаина в ТТС в г (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \times a_0 \times 10 \times 100 \times 50}{S_0 \times 50 \times 50 \times V} = \frac{S_1 \times a_0 \times 20}{S_0 \times V}$$
, где

 S_1 – площадь пика бромокаина на хроматограмме испытуемого раствора;

 S_0 – площадь пика бромокаина на хроматограмме раствора РСО;

 a_0 – навеска РСО бромокаина, в граммах;

V — объем раствора A, взятый для приготовления испытуемого раствора, мл (5 — при анализе TTC бромокаина 0,10 г; 10 — при анализе TTC бромокаина 0,05 г).

Специфичность методики подтверждали путем хроматографического анализа испытуемого раствора, раствора стандартного образца бромокаина и

раствора плацебо (рис. 5.1.1 - 5.1.3). Для приготовления раствора «плацебо» использовали пластыри без содержания действующего вещества.

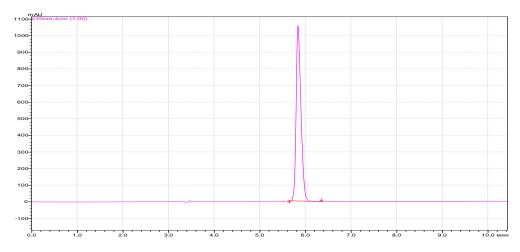


Рисунок 5.1.1 – Хроматограмма раствора РСО бромокаина

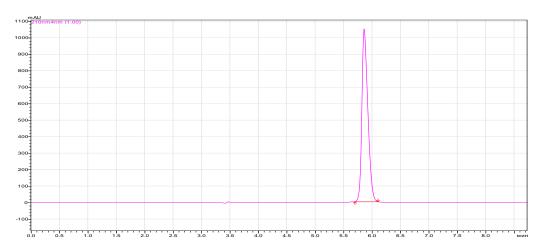


Рисунок 5.1.2 – Хроматограмма раствора испытуемого раствора

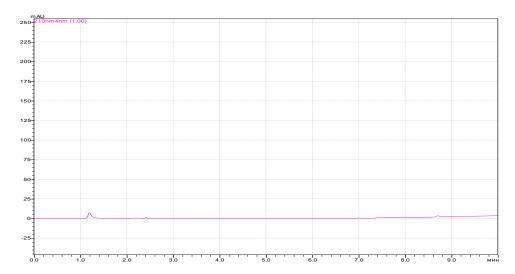


Рисунок 5.1.3 – Хроматограмма раствора плацебо

Время удерживания бромокаина на хроматограммах раствора РСО и испытуемого раствора составило $5,80 \pm 0,02$ мин. Коэффициент асимметрии пика бромокаина, характеризующий надежность определения границ пика, равен 1,07 (рекомендуемое значение — от 0,8 до 1,5). Относительное стандартное отклонение (RSD) площадей пиков бромокаина (воспроизводимость инжекций) для трёх последовательных инжекций 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 бромокаина до получения концентраций в диапазоне от 50 до 150 мкг/мл (50 % – 150 % от номинального содержания). Каждый раствор анализировали в разработанных условиях не менее 3 раз. Значения площадей хроматографических пиков представлены в таблице 5.1.1.

Таблица 5.1.1 - Зависимость площади пика бромокаина от концентрации в модельном растворе

Концентрация бромокаина в	Площадь хроматографического пика
модельном растворе, мкг/мл	(среднее из трёх измерений), mAU×min
49,6	1242698
79,36	1999841
89,28	2249905
99,2	2490678
109,12	2759933
119,04	2985009
148,8	3770429

Градуировочный график представлен на рисунке 5.1.4. В результате обработки экспериментальных данных получено уравнение линейной регрессии для бромокаина: $S = 25215 \times C$ с коэффициентом корреляции R = 0,9998. Диапазон применения методики составил 50 % – 150 % от номинального содержания бромокаина в ТТС. Рассчитанный коэффициент

корреляции (более 0,99) позволяет использовать разработанную методику в указанном диапазоне концентраций исследуемого вещества.

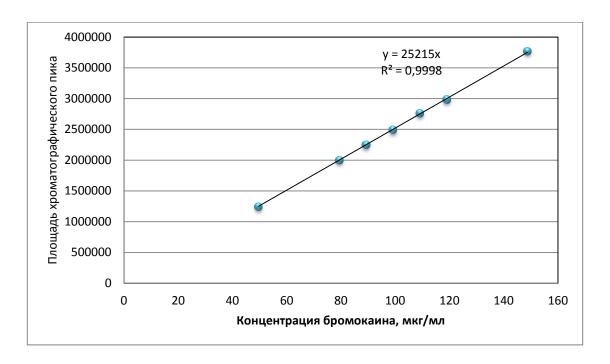


Рисунок 5.1.4 — График зависимости площади хроматографического пика от концентрации бромокаина в растворе

Прецизионность методики оценивали по двум параметрам «Повторяемость» и «Внутрилабораторная прецизионность».

Повторяемость определяли по результатам анализа, полученных одним аналитиком на одном оборудовании (хроматографе) в течение одного рабочего дня. Объектом исследования были однородные образцы пластырей с содержанием бромокаина 0,05 г и 0,10 г. Готовили по шесть испытуемых растворов для каждой дозировки ТТС.

По результатам анализа находили содержание определяемого вещества (X), средний результат (X_{cp}) , стандартное отклонение (SD), относительное стандартное отклонение (RSD) отдельного результата (таб. 5.1.2 - 5.1.3).

Таблица 5.1.2 – Оценка повторяемости методики количественного определения ТТС бромокаина 0,05 г

Найденное	Метрологические характеристики (P=0,95; n=6)				
содержание	n	X_{cp}	SD	RSD	
бромокаина, г	11	Мер	SD		
0,0479					
0,0489					
0,0492	6	0,0490	0,0009	1,84	
0,0481	6				
0,0495					
0,0502					

Таблица 5.1.3 – Оценка повторяемости методики количественного определения ТТС бромокаина 0,10 г

Найденное	Метрологические характеристики (P=0,95; n=6)				
содержание	n	X_{cp}	SD	RSD	
бромокаина, г	11	Λ_{cp}	SD		
0,0966					
0,0992					
0,0997	6	0.0079	0.0015	1.52	
0,0969	6	0,0978	0,0015	1,53	
0,0986					
0,0959					

Полученные значения RSD результатов анализа не превышают 2 %, что является приемлемым при анализе лекарственных форм методом ВЭЖХ [66,67].

Внутрилабораторную воспроизводимость исследовали путем анализа ТТС двумя аналитиками в разное время в одной лаборатории. По результатам анализа каждого из аналитиков рассчитывали стандартное отклонение, относительное стандартное отклонение и дисперсии этих данных. Результаты представлены в таблицах 5.1.4 – 5.1.5.

Для сравнения воспроизводимости вычисляли критерий Фишера (F).

Таблица 5.1.4 – Определение внутрилабораторной воспроизводимости методики количественного определения бромокаина в ТТС 0,05 г

No	1 аналитик	2 аналитик			
п/п	Найденное содержание бромокаина, г	Найденное содержание бромокаина, г			
1	0,0479	0,0488			
2	0,0489	0,0504			
3	0,0492	0,0481			
4	0,0481	0,0496			
5	0,0495	0,0478			
6	0,0502	0,0486			
	Метрологические характерис	тики (n= 6, P=95%)			
X_{cp}	0,0490	0,0489			
SD	0,0009	0,00097			
RSD	1,84	1,98			
S^2	0,0000081	0,0000097			
Г рассч.	1,	08			
$F_{\text{табл.}}$	5,05 (P=95 %, f ₁ и f ₂ = 5)				

Таблица 5.1.5 — Определение внутрилабораторной воспроизводимости методики количественного определения бромокаина в TTC 0,10 г

$N_{\underline{0}}$	1 аналитик	2 аналитик		
п/п	Найденное содержание бромокаина, г	Найденное содержание бромокаина, г		
1	0,0966	0,0997		
2	0,0992	0,0965		
3	0,0997	0,0987		
4	0,0969	0,0972		
5	0,0986	0,0988		
6	0,0959	0,0977		
	Метрологические характерис	тики (n= 6, P=95%)		
X_{cp}	0,0978	0,0981		
SD	0,0015	0,0012		
RSD	1,53	1,22		
S^2	0,00000225	0,0000144		
Г рассч.	1,	56		
$\mathbf{F}_{ ext{табл.}}$	5,05 (P=95 9	%, f ₁ и f ₂ = 5)		

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.

Готовили по 6 растворов каждой концентрации для каждого вида пластырей. Для этого в коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 100 мл помещали 50 мл воды дистиллированной. Плацебо ТТС освобождали от защитного слоя. Накладку из нетканого материала, разрезанную на части размером примерно 1см × 1см, помещали в колбу. Ножницы, которыми разрезали накладку, обтирали кусочком фильтровальной бумаги, которую также помещали в коническую колбу. Затем в колбу добавляли соответствующие количества бромокаина. Колбу закрывали пробкой, помещали на водяную баню (температура не выше 40°С) и при периодическом перемешивании выдерживали в течение 1 часа. Полученное водное извлечение переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, фильтруя через бумажный фильтр. Извлечение повторяли еще 2 раза (объем воды очищенной – 10 мл, время настаивания – 20 минут). Полученные растворы переносили в ту же мерную колбу. Объем раствора в колбе доводили до метки водой очищенной и перемешивали (раствор А).

10,0 мл полученного раствора (при анализе ТТС бромокаина 0,05 г) или 5,0 мл раствора (ТТС бромокаина 0,10 г) помещали в мерную колбу объемом 50 мл и доводили объем подвижной фазой до метки и перемешивали (раствор Б – испытуемый раствор).

Растворы анализировали согласно условиям разработанной методики. Правильность выражали в виде открываемости (R) известного количества введенного бромокаина. Результаты исследования представлены в таблицах 5.1.6-5.1.7.

Таблица 5.1.6 – Определение правильности методики количественного определения бромокаина в ТТС 0,05 г

	80 %			100 %		120 %			
$N_{\underline{0}}$	Введено,	Найдено,	R	Введено,	Найдено,	R	Введено,	Найдено,	D
	Γ	Γ	K	Γ	Γ	K	Γ	Γ	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
	$R \pm \Delta R$		$R \pm \Delta R$		$R \pm \Delta R$				
	$99,84 \pm 0,76$			99	$9,16 \pm 0,90$		9	$9,95 \pm 1,49$	

Таблица 5.1.7 – Определение правильности методики количественного определения бромокаина в TTC 0,10 г

		80 %			100 %			120 %	
$N_{\underline{0}}$	Введено,	Найдено,	R	Введено,	Найдено,	R	Введено,	Найдено,	R
	Γ	Γ	K	Γ	Γ	K	Γ	Γ	K
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
		$R \pm \Delta R$			$R \pm \Delta R$			$R \pm \Delta R$	
	99	$9,09 \pm 1,05$		10	$0,16 \pm 1,20$		1	$00,33 \pm 1,26$	

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

5.2. Разработка и валидация методики определения родственных примесей в ТТС бромокаина 0,05 г и 0,10 г

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.

При выборе варианта пробоподготовки ТТС к последующему хроматографическому исследованию были учтены результаты исследований, касающихся растворимости действующего вещества и идентифицированных

примесей (п. 4.1). Поэтому в качестве растворителя для приготовления испытуемого раствора был использован метанол.

Нами предложена следующая <u>методика пробоподготовки</u> исследуемого лекарственного препарата (TTC 0,10):

В коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 100 мл помещают 25 мл метанола. ТТС освобождают от защитного слоя. Накладку из нетканого материала, разрезанную на части размером примерно 1см × 1см, помещают в колбу. Ножницы, которыми разрезали накладку, обтирают кусочком фильтровальной бумаги, которую также помещают в коническую колбу. Колбу закрывают пробкой и при периодическом перемешивании выдерживают в течение 1 часа. Полученное извлечение переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, фильтруя через бумажный фильтр. Извлечение повторяют еще 2 раза порциями метанола по 10 мл (время настаивания – 20 минут). Полученные извлечения переносят в ту же мерную колбу. Объём раствора в колбе доводят до метки метанолом, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Полученный раствор используется в качестве испытуемого для определения родственных примесей.

Для TTC 0,05 приготовление испытуемого раствора предполагает извлечение из 2 пластырей.

Хроматографический анализ осуществляли на разделительной колонке Discovery® C18 (5 мкм, $250\times4,6$ мм, Phenomenex) в условиях, разработанных для субстанции бромокаина (определение родственных примесей) (глава 4.1). Объем вводимой пробы -20 мкл.

Количественное определение родственных примесей в TTC предусмотрено с использованием стандартных растворов 2-броманилина и N-(2-бромфенил)акриламида (метод внешнего стандарта).

Содержание N-(2-бромфенил) акриламида в TTC в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \times a_0 \times 0.5 \times 50 \times 100}{S_0 \times 25 \times 50 \times a} = \frac{S \times a_0 \times 2}{S_0 \times a}$$
, где

S — площадь пика N-(2-бромфенил) акриламида на хроматограмме испытуемого раствора;

 S_0 – площадь пика N-(2-бромфенил) акриламида на хроматограмме раствора стандартного образца;

 a_0 – навеска N-(2-бромфенил)акриламида, в граммах;

a – номинальное содержание бромокаина в ТТС, в граммах.

Содержание 2-броманилина в ТТС в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \times a_0 \times 0.1 \times 50 \times 100}{S_0 \times 50 \times 50 \times a} = \frac{S \times a_0}{S_0 \times a \times 5}$$
, где

S – площадь пика 2-броманилина на хроматограмме испытуемого раствора;

 S_0 — площадь пика 2-броманилина на хроматограмме раствора стандартного образца;

 a_0 — навеска 2-броманилина, в граммах;

a – номинальное содержание бромокаина в ТТС, в граммах.

Приготовление стандартных растворов описано в п. 4.1 диссертации.

Пригодность разработанной методики заявленному назначению оценивали путем валидации.

При определении **специфичности** получали хроматограммы стандартного раствора смеси бромокаина и примесей (2-броманилина и N-(2-бромфенил)акриламида), раствора плацебо и растворителя образца (рис. 5.2.1 - 5.2.2).

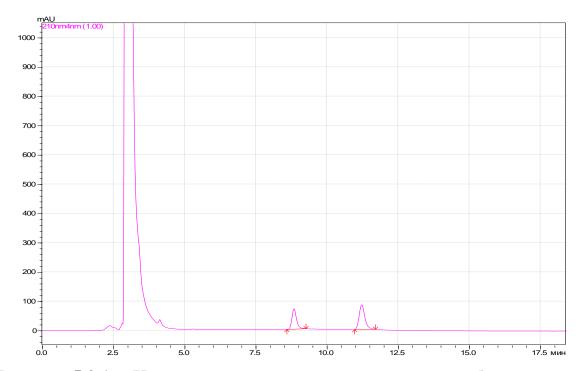


Рисунок 5.2.1 — Хроматограмма стандартного раствора бромокаина и примесей: 2-броманилина и N-(2-бромфенил)акриламида (концентрация примесей — 0,5 % от содержания бромокаина)

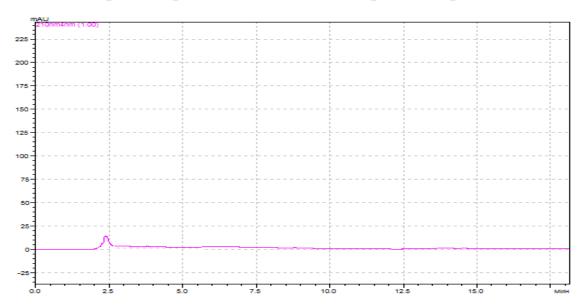


Рисунок 5.2.2 – Хроматограмма раствора плацебо

Времена удерживания бромокаина, N-(2-бромфенил)акриламида и 2-броманилина в разработанных условиях 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 5.2.1.

Таблица 5.2.1 – Параметры пригодности хроматографической системы

	Время	Разрешение	Фактор	Воспроизводимость
Образец	удерживания	(Rs)	асимметрии	инжекций
	мин.	(13)	пика	(RSD)
Бромокаин	$3,23 \pm 0,02$	-	-	-
N-(2-бромфенил)	$8,83 \pm 0,02$		1,21	0,91
акриламид	0,03 ± 0,02	6,9	1,21	0,91
2-броманилин	$11,21 \pm 0,03$		1,29	1,52
		Критерии при	иемлемости	
		Более 2	0,75 - 2,5	Менее 2

Для доказательства **линейности** методики использовали 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). Каждый раствор анализировали в разработанных условиях не менее 3 раз. Средние значения площадей хроматографических пиков представлены в таблице 5.2.2.

Таблица 5.2.2 – Данные для построения градуировочных графиков 2-броманилина и N-(2-бромфенил)акриламида

Концентрация		Площадь	Площадь
веществ в	% ot	хроматографического пика	хроматографического
модельном	содержания	N-(2-бромфенил)акриламида	пика 2-броманилина
растворе,	бромокаина	(среднее значение из 3	(среднее значение из 3
мкг/мл		измерений), mAU·min	измерений), mAU·min
1	0,05	43655	134408
2	0,1	86319	261766
5	0,25	211063	672144
7	0,35	299769	925257
10	0,5	399935	1292304

Градуировочные графики представлены на рисунках 5.2.3 – 5.2.4.

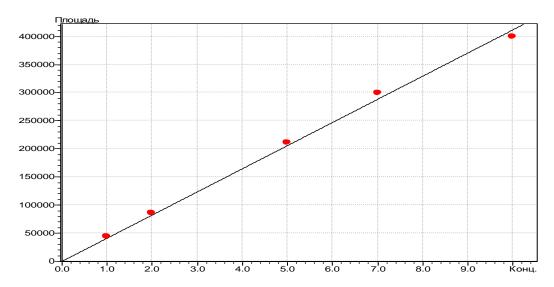


Рисунок 5.2.3 – Градуировочный график количественного определения N-(2-бромфенил)акриламида в ТТС методом ВЭЖХ

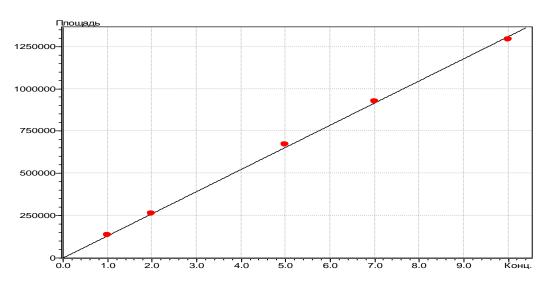


Рисунок 5.2.4 — Градуировочный график количественного определения 2-броманилина в ТТС методом ВЭЖХ

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. Полученные данные свидетельствуют о линейности методики в исследованном диапазоне концентраций.

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.

Результаты представлены в таблицах 5.2.3 – 5.2.4.

Таблица 5.2.3 — Оценка правильности методики определения N-(2-бромфенил)акриламида

Содержание в			N	Л етрологиче			4
модельном				(P=	=0,95; n=6)	
растворе, мкг/мл		аемость,					
(% ot	(R)	, %	n	R _{cp.}	SD	RSD	ΔR
содержания			11	Пср.	SD	RSD	ΔΙ
бромокаина)							
	87,19	105,28					
1 (0, 05%)	94,52	90,67	6	93,63	7,21	7,70	7,56
	97,90	86,20					
	105,31	94,25					
2 (0,1%)	96,20	89,93	6	97,35	5,25	5,39	5,51
	100,09	98,31					
	96,11	96,18					
5 (0,25%)	94,98	103,89	6	98,46	3,70	3,76	3,88
	102,32	97,30					
	100,16	101,66					
10 (0,5%)	98,34	97,67	6	99,51	1,43	1,44	1,50
	100,10	99,13					

 Таблица 5.2.4 – Оценка правильности методики определения

 2-броманилина

Содержание в модельном			N	Летрологиче (Р=	еские харал =0,95; n=6)	-	И
растворе, мкг/мл (% от содержания бромокаина)	Открыва (R)	аемость, , %	n	R _{cp.}	SD	RSD	ΔR
1 (0, 05%)	93,09 98,15 89,94	99,2 97,27 88,48	6	94,36	4,52	4,79	4,74
2 (0,1%)	93,27 89,08 97,51	100,19 102,3 93,05	6	95,90	4,97	5,18	5,21
5 (0,25%)	95,37 99,4 97,04	103,04 94,32 94,12	6	97,22	3,47	3,57	3,64
10 (0,5%)	101,52 98,38 97,87	100,22 105,11 97,45	6	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 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 таблицах 5.2.5 – 5.2.6.

 Таблица 5.2.5 – Оценка повторяемости методики определения родственных примесей в ТТС бромокаина

Примесь	Найденное	N	Метрологические (P = 0,9		КИ
Примесь	содержание примесей (%)	n	X_{cp}	SD	RSD
	0,1011		- 1		
	0,0989				
N-(2-бромфенил)	0,0982	6	0,0993	0,0013	1,31
акриламид	0,1003	U	0,0993	0,0013	1,51
	0,0977				
	0,0993				
	0,0960				
	0,0923				
2 500000000000	0,0898	6	0,0954	0,0076	7,97
2-броманилин	0,1090	U	0,0734	0,0070	1,91
	0,0975				
	0,0879				

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

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5

- 1. С учетом растворимости бромокаина и его идентифицированных примесей выбраны условия пробоподготовки трансдермальных терапевтических систем к хроматографическому исследованию при оценке показателей «Количественное определение» и «Родственные примеси».
- 2. Установлено, что хроматографические условия, разработанные для анализа субстанции бромокаина, являются специфичными и для анализа его ТТС.
- 3. Разработанные методики количественного определения и определения родственных примесей в ТТС валидированы согласно требованиям ГФ XIII . Полученные результаты соответствуют критериям приемлемости и подтверждают пригодность методик заявленному назначению.

ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ БРОМОКАИНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ ДЛЯ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

При реализации государственного контракта № 11401.1008700.13.091 от 13 сентября 2011 г. Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» на базе ПГФА проводились исследования фармакокинетики и специфической активности трансдермальной терапевтической системы местноанестезирующего лекарственного средства группы амидных анестетиков – гидрохлорида ортоброманилида β-диэтиламинопропионовой кислоты (торговое название - бромокаин, патентованное название – анилокаин).

Для осуществления фармакокинетических исследований необходимы высокочувствительные методики определения бромокаина в крови и тканях лабораторных животных.

6.1 Определение бромокаина в крови методом микроколоночной ВЭЖХ

Ранее на кафедре токсикологической химии ПГФА проводились исследования разработке ПО методик определения анилокаина биологических объектах для целей химико-токсикологического анализа при экспертизе острых и летальных отравлений. Изолирование анилокаина из плазмы осуществлялось путем двукратной экстракции хлороформом при рН 10-11 после предварительного осаждения белков крови кристаллическим аммония сульфатом и обработки осадка хлористоводородной кислотой. Предложенная методика позволяет извлекать из модельных смесей около 60-69% аналита в зависимости от концентрации. Предел обнаружения анилокаина в крови – 1 мкг/мл [117]. Согласно данной методике для анализа необходимо 10 мл биожидкости. Однако, при проведении доклинических фармакокинетических исследований (на животных) многократно отобрать такой объём крови у животного невозможно. Кроме того, методика

недостаточно чувствительна для исследования фармакокинетики. Поэтому необходимым нашей работы этапом стала оптимизация условий изолирования бромокаина ИЗ плазмы крови c целью повышения чувствительности методики и уменьшения необходимого для анализа объёма биопробы.

Кроме того, разработанные ранее условия определения анилокаина методом ВЭЖХ предусматривали использование ион-парного реагента (октилсульфоната натрия) в составе подвижной фазы для повышения удерживания аналита. Поскольку ион-парные реагенты негативно влияют на свойства обращенно-фазного сорбента, нами были оптимизированы и условия ВЭЖХ, позволившие избежать применения данного соединения.

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

По результатам экспериментальных исследований предложены следующие условия анализа бромокаина:

- элюент A 0,1 % раствор трифторуксусной кислоты, элюент B ацетонитрил;
- режим элюирования градиентный: возрастание доли ацетонитрила с 10 % до 70 % за 20 минут, регенерация колонки 10 % раствором ацетонитрила 800 мкл;
- скорость потока элюента 100 мкл/мин;
- детектирование многоволновое (210 (опорная длина волны), 220, 230, 240, 250, 260, 280, 300 нм);
- температура термостата − 40 °C;
- объем вводимой пробы -20 мкл.

Время удерживания бромокаина в данных условиях составило $9,94\pm0,05$ мин [155, 156].

Для проведения эксперимента по оптимизации условий пробоподготовки готовили модельные смеси плазмы крови с концентрацией бромокаина 500 нг/мл.

Нами апробирован метод микроэкстракции на объёме плазмы 500 мкл. Извлечение бромокаина проводили путем прямой экстракции органическим растворителем из щелочной среды, а также экстракцией после осаждения белков плазмы. В качестве осадителей использовали следующие реагенты: насыщенный раствор аммония сульфата, 50 % раствор трихлоруксусной кислоты, ацетонитрил.

Для этого 500 мкл плазмы (модельной смеси с концентрацией бромокаина 500 нг/мл) помещали в пробирку типа Эппендорф, затем добавляли осаждающий агент (500 мкл насыщенного раствора аммония сульфата, 100 мкл раствора трихлоруксусной кислоты или 500 мкл ацетонитрила). Растворы тщательно перемешивали на вортексе в течение 5 минут. Пробирки центрифугировали при 5000 об/мин. в течение 10 минут. Надосадочную жидкость отделяли и переносили в другую пробирку. Затем растворы подщелачивали до рН 10 с помощью 25 % раствора аммония гидроксида и добавляли 500 мкл хлороформа. Пробирки встряхивали на вортексе 10 минут (1500 об), затем центрифугировали с целью разделения органического и водного слоев (10 мин при 7000 об/мин). Органический слой осторожно отделяли и переносили в выпарительную пробирку. Экстракцию производили дважды. Сухой остаток после испарения хлороформа в токе теплого воздуха растворяли в 500 мкл 0,05 М раствора хлористоводородной кислоты, фильтровали через шприцевой фильтр и исследовали методом ВЭЖХ.

Значения степени экстракции бромокаина из модельных смесей представлены в таблице 6.1.1.

Таблица 6.1.1 – Результаты определения степени экстракции бромокаина из плазмы крови

Степень извлечения бромокаина из плазмы (%) (среднее значение 6 параллельных определений)						
	Экстракция после осаждения белков					
Прямая		Осаждающие аген	НТЫ			
экстракция	Насыщенный	Раствор кислоты				
хлороформом	раствор аммония	трихлоруксусной	Ацетонитрил			
	сульфата (50%)					
57,40 %	48,08 %	40,23 %	82,78 %			

Полученные результаты свидетельствуют о более высокой степени экстракции бромокаина после предварительного осаждения белков плазмы ацетонитрилом. В таблице 6.1.2 представлены данные о степени извлечения бромокаина из модельных смесей плазмы с различным содержанием вещества: 52 нг/мл, 104 нг/мл, 520 нг/мл, 1040 нг/мл, 5200 нг/мл. Установлено, что бромокаин эффективно (более 72%) и воспроизводимо (RSD не превышает 10%) извлекается из плазмы крови на всех уровнях концентраций.

 Таблица 6.1.2 – 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)			
	· ,	$\overline{\mathbf{X}}$	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	

Разработанные условия пробоподготовки были положены в основу методики хроматографического определения бромокаина в плазме крови [157, 158].

Валидационную оценку биоаналитической методики проводили по следующим параметрам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность, предел количественного определения, стабильность [159-161].

Специфичность разработанных условий была оценена путем сравнения хроматограмм экстрактов холостого образца плазмы и модельной смеси плазмы с известным содержанием аналита. Примеры хроматограмм приведены на рис. 6.1.1 – 6.1.2.

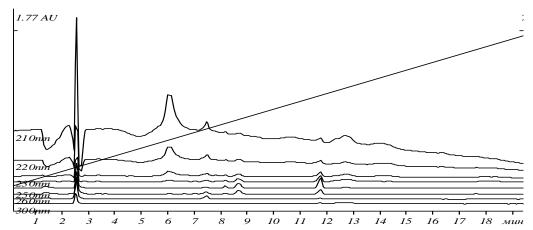


Рисунок 6.1.1 – **Хроматограмма извлечения из бланковой плазмы** (холостой опыт)

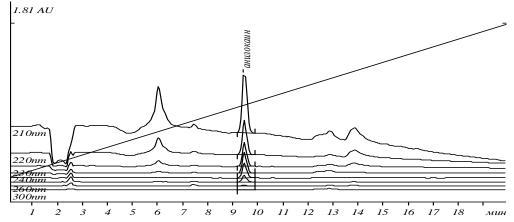


Рисунок 6.1.2 – Хроматограмма извлечения из модельной смеси плазмы с содержанием бромокаина (500 нг/мл)

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.

Для установления линейности разработанной методики были проанализированы 8 образцов модельных смесей плазмы с содержанием бромокаина от 42 до 2100 нг/мл. Результаты представлены на рис. 6.1.3 и в таблице 6.1.3.

Таблица 6.1.3 – Данные для построения калибровочного графика количественного определения бромокаина методом ВЭЖХ

Концентрация бромокаина в модельной смеси, нг/мл	Площадь хроматографического пика бромокаина, mAU· min
42	0,090
105	0,270
210	0,492
525	1,220
840	2,070
1050	2,700
1575	3,600
2100	4,880

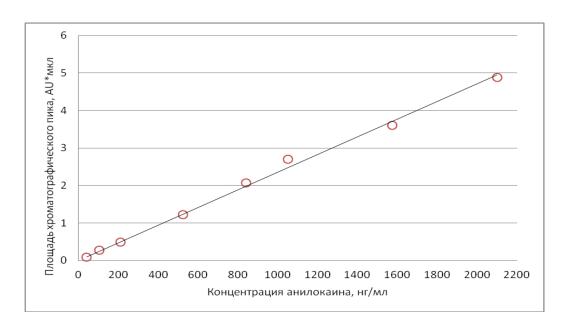


Рисунок 6.1.3 – Калибровочный график количественного определения бромокаина методом ВЭЖХ

Градуировочная зависимость описывается уравнением $S=0,0024\times C$ (S- площадь хроматографического пика, C- концентрация бромокаина в плазме, нг/мл), коэффициент корелляции \mathbf{R}^2 составил 0,9963. Предел количественного определения бромокаина в плазме по предложенной методике – 40 нг/мл.

С использованием калибровочного графика произведен обратный перерасчет концентраций бромокаина в калибровочных стандартах. Отклонения концентраций от фактических значений не превышают 15 % (таблица 6.1.4), что соответствуют современным требованиям, предъявляемым к биоаналитическим методикам [159-161].

Таблица 6.1.4 – Обратный перерасчет концентраций бромокаина в калибровочных стандартах

С факт., нг/мл	42	105	210	525	840	1050	1575	2100
С рассч., нг/мл	37,5	112,5	205,0	508,3	862,5	1125,0	1500,3	2033,3
ε,%	-10,7	7,1	-2,4	-3,2	2,7	7,1	-4,8	-3,2

Для оценки параметров «Прецизионность» и «Правильность» готовили по 6 модельных образцов плазмы на 5 уровнях концентраций бромокаина: 39; 117; 468; 936, 1404 нг/мл (контрольные образцы качества). Подготовку образцов для анализа осуществляли в соответствии с описанной методикой. Прецизионность и правильность методики оценивались по отклонения величинам относительного стандартного (RSD, относительной погрешности (є, %), соответственно. Метрологические характеристики методики представлены в таблице 6.1.5. Полученные 15 %, результаты контроля не превышают допускаемых биоаналитических методик, что свидетельствует о воспроизводимости результатов анализа и отсутствии значимых систематических ошибок [159-161].

Таблица 6.1.5 – 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), \overline{X} , (n = 6)	SD	RSD,%	ε,%
39	40,3	3,5	8,7	3,3
	(44,6; 37,9; 40,1; 34,7; 42,8; 41,8)			
117	119,5	8,4	7,1	2,1
	(122,4; 126,0; 107,1; 128,3; 110,9; 122,5)			
468	460,4	20,1	4,4	-1,6
	(485,5; 451,9; 434,2; 479,9; 444,8; 466,1)			
936	906,8	16,3	1,8	-3,2
	(911,2; 896,4; 940,2; 903,3; 915,0; 874,9)			
1404	1387,3	59,2	4,3	-1,2
	(1351,6; 1298,1; 1340,1; 1464,2; 1398,9;			
	1470,6)			

Поскольку данные, касающиеся сохранности бромокаина в плазме крови, отсутствуют, были оценена **стабильность** аналита путем анализа образцов контроля качества (при низких и высоких концентрациях с шестью определениями для каждой), подвергшихся воздействию различных температурных условий в течение разных временных интервалов.

Исследованы следующие виды стабильности:

- краткосрочная стабильность бромокаина в биологическом образце при комнатной температуре (12 часов);
- стабильность бромокаина 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 $^{\circ}$ C (срок хранения 6 месяцев);

Стабильность изучали на контрольных образцах качества с концентрацией бромокаина 39 и 1404 нг/мл. Результаты сравнивали с результатами анализа свежеприготовленных образцов контроля качества.

На их основе рассчитывали нормализованный модуль разницы по формуле:

$$\Delta,\% = \frac{C_2 - C_1}{C_1} \times 100\%$$
 , где

 C_2 – средняя концентрация бромокаина в образце после хранения,

 C_1 – средняя концентрация бромокаина в свежеприготовленном образце.

Полученные данные по стабильности представлены в таблицах 6.1.6 – 6.1.9.

Таблица 6.1.6 – Данные по стабильности бромокаина в плазме крови (краткосрочная стабильность бромокаина в биологическом образце)

Условия хранения	Номинальные концентрации,			
	39 нг/мл	1404 нг/мл		
	Рассчитанные ког	нцентрации (нг/мл)		
Хранение образцов при	31	1321		
комнатной температуре и	37	1359		
дневном свете без	29	1308		
пробоподготовки в	35	1364		
течение 12 часов	30	1318		
	35	1320		
Среднее значение	32,83	1331,67		
Стандартное отклонение	3,25	23,62		
Коэффициент вариации, %	9,90	1,77		
Нормализованный модуль	15,82	5,16		
разницы значений				
концентраций до и после				
хранения, %				

Таблица 6.1.7 – Данные по стабильности бромокаина в плазме крови (3 цикла заморозки/разморозки)

Условия хранения	Номинальные концентрации,		
	39 нг/мл	1404 нг/мл	
	Рассчитанные концентрации (нг/мл)		
3 цикла заморозки/разморозки	32	1351	
	35	1391	
	32	1382	
	37	1341	
	31	1399	
	34	1320	
Среднее значение	33,5	1364,00	
Стандартное отклонение	2,26	31,34	
Коэффициент вариации, %	6,74	2,30	
Нормализованный модуль	14,10	2,85	
разницы значений концентраций			
до и после хранения, %			

Таблица 6.1.8 – Данные по стабильности бромокаина в плазме крови после пробоподготовки (при комнатной температуре 5 часов)

Условия хранения	Номинальные концентрации,	
	39 нг/мл	1404 нг/мл
	Рассчитанные концентрации (нг/мл)	
После пробоподготовки при	36	1376
комнатной температуре	34	1421
(5 часов)	36	1435
	39	1398
	41	1420
	35	1428
Среднее значение	36,83	1413,00
Стандартное отклонение	2,64	21,98
Коэффициент вариации, %	7,17	1,56
Нормализованный модуль	5,56	0,64
разницы значений концентраций		
до и после хранения, %		

Таблица 6.1.9 – Данные по стабильности бромокаина в плазме крови (хранение при температуре - 40 °C, 6 месяцев)

Условия хранения	Номинальные концентрации,	
	39 нг/мл	1404 нг/мл
	Рассчитанные концентрации (нг/мл)	
Хранение при температуре	37	1345
- 40°С (6 месяцев)	33	1410
	38	1353
	42	1368
	36	1402
	43	1349
Среднее значение	38,17	1371,17
Стандартное отклонение	3,76	28,20
Коэффициент вариации, %	9,86	1,96
Нормализованный модуль	2,13	2,06
разницы значений концентраций		
до и после хранения, %		

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 % [159-161].

Полученные данные по стабильности соединения в плазме должны учитываться при планировании фармакокинетических исследований лекарственных форм с бромокаином.

Разработанная нами методика использована при исследовании фармакокинетики микроэмульсионной ТТС бромокаина на лабораторных животных (кроликах). На рисунке 6.1.4 представлены хроматограммы извлечений из крови кролика через 5 минут после внутривенного введения 2 % раствора бромокаина (измеренная концентрация бромокаина — 70 мкг/мл) и через 16 часов после нанесения ТТС 0,10 (концентрация бромокаина — 180 нг/мл).

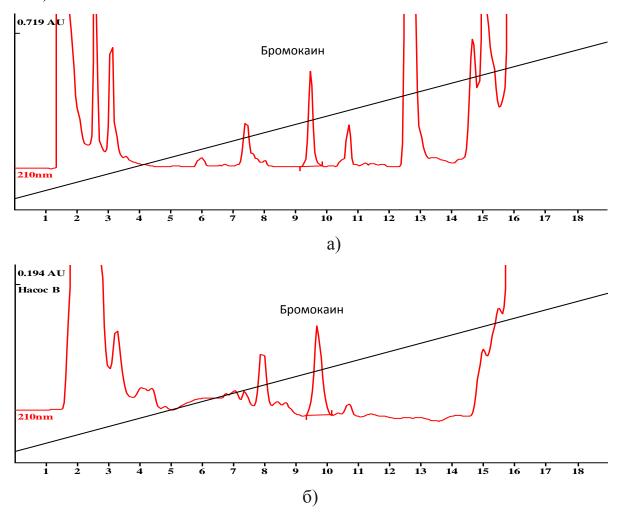


Рисунок 6.1.4 – Хроматограммы извлечений из крови кролика

- а) через 5 минут после внутривенного введения
- б) через 16 часов после нанесения ТТС 0,10

6.2 Определение бромокаина в органах лабораторных животных

Предложенные условия ВЭЖХ были апробированы нами и на извлечениях из модельных смесей органов лабораторных животных.

Исследовались фрагменты кожи с подкожными тканями, а также органы, обеспечивающие элиминацию лекарственных веществ (печень и почки). Для приготовления модельных смесей ткани и органы животных гомогенизировали, добавляли 1 мг бромокаина и оставляли на 6 часов при комнатной температуре.

Для изолирования бромокаина из биологических объектов использовали методику, разработанную для целей химикотоксикологического анализа [117]. Нами проведена оценка эффективности изолирования бромокаина из указанных объектов.

30 модельную смесь заливали ΜЛ ацетонитрила, подкисленного 10 % раствором хлористоводородной кислоты до рН 2 по универсальному индикатору. Настаивание производили при перемешивании на шейкере в течение 30 минут. Надосадочную жидкость сливали, биологический материал еще экстрагировали дважды подкисленным 15 ацетонитрилом порциями ПО МЛ. Ацетонитрильные извлечения объединяли и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут. Центрифугат переносили в делительную воронку, рН раствора доводили до 10-11 по универсальному индикатору с помощью раствора аммиака концентрированного. Проводили двукратную экстракцию петролейным эфиром порциями по 10 мл, время каждой экстракции – 5 минут. Эфирные экстракты фильтровали через бумажный фильтр с безводным натрия сульфатом. Полученный экстракт испаряли в токе теплого воздуха до сухого остатка, который растворяли в 2 мл 0,01 М раствора хлористоводородной кислоты. Извлечение центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 5 Супернатант отбирали ВЭЖХ. минут. И исследовали методом Количественное определение бромокаина проводили методом внешнего

стандарта (стандартный раствор бромокаина с концентрацией 100 мкг/мл).

Результаты исследования по эффективности извлечения бромокаина из модельных смесей представлены в таблице 6.2.1.

Таблица 6.2.1 – Эффективность извлечения бромокаина из биологических объектов (модельных смесей)

№	Степень извлечения, %		
опыта	Кожа	Почки	Печень
1	72,77	84,92	76,13
2	68,75	87,10	80,53
3	75,20	81,22	82,62
4	70,15	79,82	78,92
5	76,49	86,38	75,30
6	70,93	81,12	82,90
X cp.	72,38	83,43	79,40
SD	3,01	3,09	3,21
RSD	4,16	3,70	4,04

Установлено, что при использовании данной методики извлекается более 70 % бромокаина, внесенного в модельную смесь [162].

Методика была апробирована на лабораторных животных (крысах) после фиксации трансдермальной терапевтической системы (ТТС) с бромокаином. Через 6, 12 и 24 ч после нанесения лекарственной формы животных умерщвляли цервикальной дислокацией позвоночника, после чего отбирали фрагменты кожи с подкожными тканями, извлекали печень и почки. После гомогенизации биологических объектов производили изолирование бромокаина и анализ извлечений методом ВЭЖХ в условиях, описанных в п. 6.1. Параллельно исследовали органы контрольной группы животных (без нанесения ТТС), а также стандартный раствор бромокаина с концентрацией 10 мкг/мл.

На рис. 6.2.1 представлены примеры хроматограмм извлечений из биологических объектов животных после нанесения TTC.

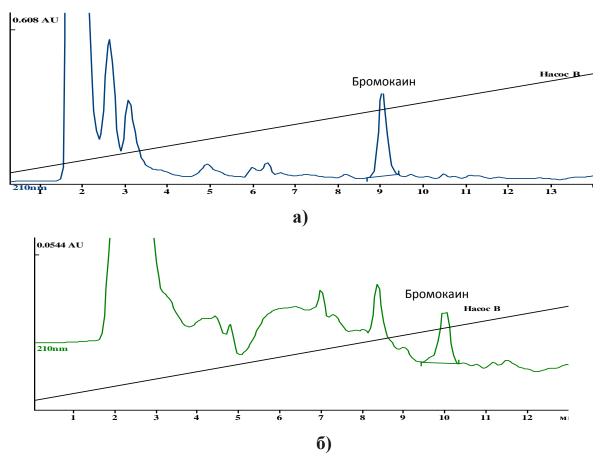


Рисунок 6.2.1 – Хроматограммы извлечений из биообразцов крысы а) кожи (через 24 часа после нанесения ТТС 0,05)

б) почек (через 24 часа после нанесения ТТС 0,10)

Время удерживания бромокаина на хроматограммах извлечений соответствует времени удерживания вещества хроматограмме на стандартного раствора. На хроматограммах извлечений органов животных контрольной группы отсутствовали времени ПИКИ на удерживания бромокаина.

Таким образом, в ходе проведенной апробации была доказана специфичность разработанных хроматографических условий для анализа бромокаина в извлечениях из органов и тканей лабораторных животных и их пригодность для использования в фармакокинетических исследованиях.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 6

- 1. Разработаны условия определения бромокаина в плазме крови методом микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием. Установлено, что градиентное элюирование подвижной фазой состава: 0,1% раствор трифторуксусной кислоты ацетонитрил обеспечивает высокую специфичность определения бромокаина и позволяет отказаться от использования ион-парных реагентов.
- 2. Предложен эффективный способ пробоподготовки плазмы крови к последующему хроматографическому анализу на основе экстракции бромокаина из биожидкости после предварительного осаждения белков ацетонитрилом. Данный способ предполагает работу с малыми количествами пробы (объем плазмы 0,5 мл), что позволяет использовать его в фармакокинетических исследованиях на лабораторных животных.
- 3. Валидационная оценка разработанной методики показала высокую чувствительность методики (НПКО 40 нг), линейность, правильность и воспроизводимость получаемых результатов.
- 4. Изучена стабильность бромокаина в образцах плазмы крови. Установлено, что бромокаин стабилен в плазме крови при длительном хранении при температуре 40 °C (6 месяцев), а также в течение 5 часов после пробоподготовки.
- 5. В условиях модельного эксперимента изучена эффективность извлечения бромокаина из органов и тканей лабораторных животных (кожа, почки, печень). Степень экстракции из биологических объектов составила более 70 %. Установлено, что разработанные хроматографические условия определения бромокаина в плазме крови специфичны и для извлечений из органов животных.
- 6. Разработанные методики использованы при исследовании фармакокинетики микроэмульсионной TTC бромокаина на лабораторных

животных (кроликах, крысах). Показана возможность их применения для количественного определения бромокаина на этапе доклинических и клинических фармакокинетических исследований препаратов бромокаина.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

- 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» ВЭЖХ примесей методом обращенно-фазной co детектированием в субстанции бромокаина. спектрофотометрическим 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 co спектрофотометрическим детектированием. Предложен эффективный способ пробоподготовки плазмы крови К последующему хроматографическому анализу на основе экстракции бромокаина 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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Пат. 1146989. Гидрохлорид орто-броманилида β-диэтиламино-пропионовой кислоты, проявляющий анестезирующую активность / Н. В. Хорошкова [и др.]; Пермский гос. фарм. ин-т; Ин-т механики сплошных сред Урал. науч. центра АН СССР. № 3628253/04; заявл. 01.08.1983; опубл. 10.04.1996. В сведениях перед текстом также: В. И. Панцуркин, В. С. Шкляев, Н. А. Горнова, Н. Т. Прянишникова.
- 2. Панцуркин, В. И. Анилокаин, поиск, свойства. Начальный опыт применения лекарственных форм в медицинской практике / В. И. Панцуркин, И. В. Алексеева. Пермь: Изд-во ГОУ ВПО ПГФА Роздрава, 2006. 174 с.
- 3. Лисицына, Н. П. Сравнение эффектов анилокаина и лидокаина на ионные каналы изолированных нейронов моллюска / Н. П. Лисицына [и др.] // Психофармакология и биологическая наркология. 2008. Т. 8, вып. 3-4. С. 2426-2433.
- Алексеева, И. В. Состояние и перспективы внедрения лекарственных форм анилокаина в медицинскую практику / И. В. Алексеева, В. И. Панцуркин // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 10. – С. 3472-3476.
- Сравнительная характеристика антиаритмического влияния анилокаина и лидокаина при нейрогенной фибрилляции предсердий / Т. А. Петропавловская, И. Л. Чередник [и др.] // Кубанский науч. мед. вестник. – 2009. – № 8(113). – С. 59-62.
- Исследования в области стандартизации субстанции анилокаина по показателю посторонние примеси [Электронный ресурс] / Ю. Н. Карпенко, С. В. Чащина, Е. Ю. Тумилович, И. В. Алексеева // Современные проблемы науки и образования. 2013. № 6.
 - URL: http://science-education.ru/ru/article/view?id=11076 (дата обраще-

- ния: 17.04.2019).
- 7. Исследование возможности практического использования 1 %, 2 % инъекционных растворов и 5 % раствора анилокаина для наружного применения в оториноларингологии / Ю. М. Овчинников [и др.] // Мед. наука и практика. 2004. № 6. С. 9-10.
- 8. Панцуркин, В. И. Результаты клинических исследований мази «Аникол» при лечении раневого процесса II фазы / В. И. Панцуркин, И. В. Алексеева // Рос. мед. Форум-2007: материалы II Конгресса. Москва, 2007. С. 55-57.
- Оказание первой помощи при ожогах / С. В. Смирнов, О. И. Нуждин, А. В. Воленко, С. В. Горюнов // Рус. мед. журн. 2001. № 20. С. 880.
- Применение гидрогелей «Апполо» в качестве средства первой помощи при ожогах: методические рекомендации / Правительство Москвы, Департамент Здравоохранения. Москва, 2008. 22 с.
- 11. Панцуркин, В. И. Анилокаин и его препараты в ветпрактике / В. И. Панцуркин, И. В. Алексеева // Инновационный потенциал аграрной науки основа развития АПК: материалы Всерос. науч.-практ. конф. Пермь, 2008. С. 174-177.
- 12. Алексеева, И. В. Разработка перспективных лекарственных форм для наружного применения на основе анилокаина / И. В. Алексеева, Т. Е. Рюмина, Ю. Н. Карпенко // Сборник всероссийской научнопрактической конференции «Актуальные проблемы фармацевтической деятельности». Казань, 2017. С. 6-11.
- 13. Алексеева, И. В. Состояние, перспективы разработки и стандартизации лекарственных форм анилокаина / И. В. Алексеева, Т. Е. Рюмина, Ю. Н. Карпенко // II Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием (12 14 мая), посвящ. 80-летию Перм. гос. фармац. акад. Пермь, 2017. –

- C. 40-43.
- Разработка и клиническая апробация мази анилкам / И. В. Алексеева,
 А. Н. Куликов, А. А. Сурков, В. И. Панцуркин // Вестник Военномедицинской академии. 2009. № 1 (25), часть II. С. 739-740.
- 15. Разработка обезболивающего геля «Анилогель» для применения при диагностических и лечебных манипуляциях в урологии / И. В. Алексева, В. И. Панцуркин, Т. Ф. Одегова, Т. Е. Рюмина // Хим.-фарм. журн. 2012. Т.46, № 12. С. 109-112.
- Разработка состава, технологии и стандартизация суппозиториев с анилокаином / И. В. Алексеева, Л. А. Чекрышкина, В. И. Панцуркин, Т. Е. Рюмина // Вестник РУДН. Серия Медицина. 2008. № 7. С. 20-24.
- 17. Алексеева, И. В. Биофармацевтические аспекты создания суппозиториев с анилокаином / И. В. Алексеева, Т. Е. Рюмина, В. И. Панцуркин [Электронный ресурс] // Современные проблемы науки и образования. 2013. № 6. –
 URL: http://www.scienceeducation.ru/ru/article/view?id=11241.
 Дата обращения: 04.03.2019.
- 18. Алексеева, И. В. Обоснование состава и технологии плёнок лекарственных с анилокаином / И. В. Алексеева, Т. Е. Рюмина // Фундаментальные исследования. 2014. № 12 (часть 1). С. 158-163.
- Алексеева, И. В. Биофармацевтические исследования биорастворимых лекарственных пленок с анилокаином / И. В. Алексеева, Т. Е. Рюмина, В. И. Панцуркин, Т. Ф. Одегова // Хим.-фарм. журн. 2007. Т. 41, № 9. С. 49-52.
- 20. Местное обезболивание и анестезиология в стоматологии: учебное пособие / С. Н. Кражан [и др.]. Ставрополь: Изд-во СтГМУ. 2014. 202 с.

- 21. Кржечковская, В. В. Лекарственные средства в анестезиологии. Местные анестетики / В. В. Кржечковская, Р. Ш. Вахтангишвили. Ростовна-Дону: Феликс, 2006. 192 с.
- 22. Кононенко, Ю. Г. Местное обезболивание в амбулаторной стоматологии / Ю. Г. Кононенко, Н. М. Рожко, Г. П. Рузин. Москва: Книга плюс, 2004. 352 с.
- Столяренко, П. Ю. Местная анестезия в стоматологии. Выбор препаратов. Осложнения. Профилактика: учебное пособие / П. Ю. Столяренко, И. М. Федяев, В. В. Кравченко. 3-е изд. Самара: Офорт, СамГМУ, 2010. 235 с.
- 24. Рациональная фармакоанестезиология: практическое руководство / А. А. Бунятян [и др.]. Москва: Литтерра, 2006. 800 с.
- 25. Фармакология и фармакокинетика современных местных анестетиков и адъювантов при регионарном обезболивании у детей / В. Л. Айзенберг [и др.] // Регионарная анестезия и лечение острой боли. – 2015. – Т. IX, № 3. – С. 37-44.
- 26. Артикаин: инструкция, применение и формула [Электронный ресурс] / Справочник лекарств РЛС: Регистр лекарственных средств России. Режим доступа: https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_665.htm. Дата обращения: 04.03.2019 г.
- 27. Сравнение физико-химических свойств анестетиков, содержащих артикаин, применяемых в стоматологии / А. И. Марахова [и др.] // Тонкие хим. технологии. 2015. T. 10, № 5. C. 48-53.
- 28. Yapp, K. E. Articaine: a review of the literature / K. E. Yapp, M. S. Hopcraft, P. Parashos // British Dental J. 2011. Vol. 210. P. 323-329.
- 29. ФС 2.1.0123.18. Лидокаина гидрохлорид [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея РФ. Т. 3. 14-е изд. Москва, 2018. С. 4214–4218. Режим доступа :

- http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_3/HTML/953/index.html
- 30. 01/2008:0227. Lidocaine hydrochloride // European pharmacopoeia. 8th edition. Vol. 2. France, 2013. P. 2621-2622.
- 31. 01/2008:1242, corrected 6.0. Mepivacaine hydrochloride // European pharmacopoeia. 8th edition. Vol. 2. France, 2013. P. 2712-2713.
- 32. 04/2013:0541. Bupivacaine hydrochloride. // European pharmacopoeia. 8th edition. Vol. 2. France, 2013. P. 1703-1705.
- 33. 01/2008:2335. Ropivacaine hydrochloride monohydrate // European pharmacopoeia. 8th edition. Vol. 2. France, 2013. P. 3183-3184.
- 34. 04/2012:1688. Articaine hydrochloride // European pharmacopoeia. 8th edition. Vol. 2. France, 2013. P. 1588-1590.
- 35. Lidocaine hydrochloride. United States. –The united states pharmacopeia 36. The national formulary 31. –Vol. 3. 2013. P. 4112–4113.
- 36. Mepivacaine hydrochloride. United States. –The united states pharmacopeia 36. The national formulary 31. Vol. 3. 2013. P. 4243.
- 37. Ropivacaine hydrochloride. United States. –The united states pharmacopeia 36 The national formulary 31. Vol. 3. 2013. P. 5082-5084.
- 38. Bupivacaine hydrochloride. United States. –The united states pharmacopeia 36. The national formulary 31. Vol. 2. 2013. P. 2702-2703.
- 39. Articaine hydrochloride. United States. –The united states pharmacopeia 36. The national formulary 31. Vol. 2. 2013. P. 2528-2529.
- 40. Беликов, В. Г. Фармацевтическая химия. В 2 ч.: учеб. пособие / В. Г. Беликов. Пятигорск, 2003. 720 с.
- 41. Руководство по инструментальным методам исследований при разработке и экспертизе качества лекарственных препаратов / под ред. С. Н. Быковского [и др.]. – Москва : Перо, 2014. – 656 с.
- 42. Халиуллин, Ф. А. Инфракрасная спектроскопия в фармацевтическом анализе: учеб. пособие / Ф. А. Халиуллин, А. Р. Валиева, В. А. Катаев.

- − Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2017. 160 с.
- 43. Бёккер, Ю. Спектроскопия / пер. с нем. Л. Н. Казанцевой. Москва: Техносфера, 2009. 427 с.
- 44. Власова, И. В. Спектрофотометрические методы в анализе лекарственных препаратов (обзор) / И. В. Власова, А. В. Шилова, Ю. С. Фокина // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2011. Т. 77, № 1. С. 21-26.
- 45. Беликов, В. Г. Анализ лекарственных веществ фотометрическими методами. Опыт работы отечественных специалистов / В. Г. Беликов // Рос. хим. журн. (журн. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева). 2002. Т. XLVI, № 4. С. 52-56.
- 46. Lazeeza Sattar Omer. Extraction-spectrophotometric determination of lidocaine hydrochloride in pharmaceuticals / Lazeeza Sattar Omer , Rasul Jameel Ali // International J. of Chemistry. 2017. Vol. 9, №. 4. P. 49-61.
- 47. Andreia, Corciova. Spectrophotometric method for determination of bupivacaine hydrochloride in pharmaceutical preparations / Andreia Corciova // European Chemical Bulletin. − 2012. − № 2(8). − P. 554-557.
- 48. Илиев, К. И. Исследование возможности применения спектрофотометрии для стандартизации лидокаина гидрохлорида в мази «Лидозоль» / К. И. Илиев, Т. А. Кобелева, А. И. Сичко // Сб. науч. тр. по итогам междунар. науч.-практ. конф. «Актуальные вопросы и перспективы развития медицины». Омск, 2016. С. 186-190.
- 49. Кобелева, Т. А. Анализ местных анестетиков и натрия диклофенака в мягких лекарственных формах на титансодержащей основе: монография / Т. А. Кобелева, А. И. Сичко, К. И. Илиев // Минздрав России, Тюменский ГМУ. Тамбов: Консалтинговая компания Юком, 2017. 88 с.

- 50. Захарова, А. А. Спектрофотометрический анализ натрия диклофенака и лидокаина гидрохлорида в новой мягкой лекарственной форме «Диклизоль» / А. А. Захарова, Т. А. Кобелева, А. И. Сичко // Казанская наука. 2010. № 3. С. 239-244.
- 51. Илиев, К. И. Применение абсорбционной фотометрии в анализе лекарственной формы «Артидиклозоль» / К. И. Илиев, Т. А. Кобелева, А. И. Сичко // Сб. науч. ст. по итогам междунар. науч.-практ. конф. «Модернизационный вектор развития науки в XXI веке: традиции, новации, преемственность». Санкт-Петербург, 2016. С. 186-192.
- 52. Маринина, Т. Ф. Изучение возможности комплексного использования растения каланхоэ перистое / Т. Ф. Маринина, Л. Н. Савченко, А. С. Саушкина // Изв. Самар. науч. центра Рос. акад. наук. − 2015. − Т. 17, № 5. − С. 143-148.
- 53. Определение новокаина, лидокаина в водных растворах и лекарственных формах с использованием потенциометрических ПД-сенсоров и титриметрических методик / К. А. Полуместная [и др.] // Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация. 2012. № 2. С. 76-81.
- 54. Novel Green Potentiometric Method for the Determination of Lidocaine Hydrochloride and its Metabolite 2,6-Dimethylaniline; Application to Pharmaceutical Dosage Form and Milk / A. S. Saad [et al.] // Electroanalysis. 2018. Vol. 30, Issue 8. P. 1689-1695.
- 55. Simultaneous Electrochemical Determination of Articaine HCl and Epinephrine /A. Attia, N. Rashed, M. Fouad, R. Wasfy // Insights in Analytical Electrochemistry. 2017. Vol. 3, № 1. P. 1.
- 56. Simultaneous determination of dexpanthenol, lidocaine hydrochloride, and mepyramine maleate in combined pharmaceutical gel by capillary electrophoresis / G. B. Akyil [et al.] // Turkish J. of Chemistry. − 2014. − № (2014) 38. − P. 756-764.

- 57. Different Spectrophotometric and TLC-Densitometric Methods for Determination of Diclofenac Na and Lidocaine HCl / N. W. Ali, N. S. Abdelwahab, M. M. Abdelkawy, A. M. Elgebaly // The Pharma Innovation J. − 2014. − № 3(6). − P. 57-64.
- 58. Dolowy M. Validation of a Thin-Layer Chromatography for the Determination of Hydrocortisone Acetate and Lidocaine in a Pharmaceutical Preparation / M. Dolowy, K. Kulpinska-Kucia, A. Pyka // The Scientific World J. 2014. Vol. 2014. 10 p.
- 59. Different Spectrophotometric and Chromatographic Methods for Determination of Mepivacaine and Its Toxic Impurity / N. S. Abdelwahab, N. F. Fared, M. Elagawany, E. H. Abdelmomen // J. of AOAC International. 2017. № 100(5). P. 1392-1399.
- 60. Taha, E. A. Development and Validation of TLC-Densitometric Method for Resolution and Determination of Enantiomeric Purity of Ropivacaine, Using Different Cyclodextrins as Chiral Selector / E. A. Taha // Current Pharmaceutical Analysis. 2007. Vol. 3, Issue 4. P. 273-277.
- 61. Investigation of Behavior of Forced Degradation of Lidocaine HCl by NMR Spectroscopy and GC-FID Methods: Validation of GC-FID Method for Determination of Related Substance in Pharmaceutical Formulations / Y. Kadioglu, A. Atila, M. S. Gultekin, N. A. Alp // Iranian J. of Pharmaceutical Research. − 2013. − № 12(4). − P. 659-669.
- 62. Сычев, К. С. Практическое руководство по жидкостной хроматографии / К. С. Сычев. Москва: Техносфера, 2010. 272 с.
- 63. Высокоэффективная жидкостная хроматография в контроле качества лекарственных средств / Г. И. Барам [и др.] // Фарматека. $2005. N_{\odot}$ 2. С. 12-15.
- 64. Использование высокоэффективной жидкостной хроматографии для анализа многокомпонентных лекарственных препаратов / Е. М. Басова,

- [и др.] // Журн. аналит. химии. -2008. Т. 63, № 6. С. 566-580.
- 65. ОФС.1.2.1.2.0005.15 Высокоэффективная жидкостная хроматография [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея РФ. Т. 3. 14-е изд. Москва, 2018. Режим доступа : http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_3/HTML/953/index.html
- 66. The United State Pharmacopoeia 36. National Formulary 31. 2013.
- 67. European Pharmocopeia. France, 2013. 8th Edition. –3655 p.
- 68. Estimation of Lidocaine-HCl in Pharmaceutical drugs by HPLC-UV System / H. N. K. Salman [et al.] // American J. of PharmTech Research. 2017.
- 69. Ricci Júnior E. HPLC assay of lidocaine in *in vitro* dissolution test of the Poloxamer 407 gels / E. Ricci Júnior, M. V. Lopes Badra Bentley, J. M. Marchetti // Brazilian J. of Pharmaceutical Sciences. − 2002. − Vol. 38, № 1. − P. 107-111.
- 70. Reverse phase HPLC method for the simultaneous estimation of lidocaine HCl, Prednisolone acetate and Dimethylsulfoxide in a pharmaceutical gel formulation / S. Sheikh [et al.] // Analytical Chemistry: An Indian J. − 2012. − № 11(11, 12). − P. 363-367.
- 71. Meshram D. B. Stability Indicating Analytical Method for the Simultaneous Estimation of Lidocaine and Nifedipine in the Combined Dosage Form / D.
 B. Meshram, K. Mehta, P. Mishra // Der Pharma Chemica. 2018. № 10(1). P. 60-66.
- 72. Belal, T. S. Gradient HPLC-DAD Stability Indicating Determination of Miconazole Nitrate and Lidocaine Hydrochloride in their Combined Oral Gel Dosage Form / T. S. Belal, R. S. Haggag // J. of Chromatographic Science. − 2012. − № 50. − P. 401-409.
- 73. RP-HPLC Simultaneous Estimation of Diclofenac Diethylamine and Lidocaine in Pharmaceutical Gel Formulation / S. Asghar [et al.] // International J. of Research in Pharmacy and Science. − 2012. − № 2. − P. 78-88.

- 74. Разработка методики выявления и определения активных фармацевтических ингредиентов в составе стоматологических пленок / Л. Давтян [и др.] // Recipe. 2016. Vol. 19, № 3. Р. 331-338.
- 75. Simultaneous Determination of Dexpanthenol, Lidocaine Hydrochloride, Mepyramine Maleate and their Related Substances by a RP-HPLC Method in Topical Dosage Forms / A. Doganay [et al.] // J. of chromatographic science. − 2018. − № 56(10). − P. 903-911.
- 76. Belal T. S. Gradient HPLC-diode array detector stability-indicating determination of lidocaine hydrochloride and cetylpyridinium chloride in two combined oral gel dosage forms / T. S. Belal, R. A. Shaalan, R. S. Haggag // J. of AOAC International. 2011. № 94(2). P. 503-512.
- 77. Liaewruangrath, S. Simultaneous determination of tolperisone and lidocaine by high performance liquid chromatography / S. Liaewruangrath, B. Liawruangrath, P. Pibool // J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2002. № 26(5-6). P. 865-872.
- 78. Prathyusha, PCHGS. Validated gradient stability-indicating uplc method for the determination of lidocaine and its degradation impurities in pharmaceutical dosage form / PCHGS Prathyusha, P. Shanmugasundaram, P. Y. Naidu // International J. of Advances in Pharmaceutical Analysis. 2013. –Vol. 3, Issue 1. P. 1-10.
- 79. RP-HPLC method for the estimation of bupivacaine HCl in pharmaceutical dosage forms / Ch. Manohar Babu [et al.] // International J/ of Chemical Sciences. 2011. № 9(1). P. 197-204.
- 80. Optimization of an RP-HPLC Method for Drug Control Analysis / M. Medenica [et al.] // J. of Liquid Chromatography & Related Technologies. 2003. Vol. 26, Issue 20.
- 81. Cho, C.-W. Development of Bioadhesive Transdermal Bupivacaine Gels for Enhanced Local Anesthetic Action / C.-W. Cho, D.-B. Kim, S.-C. Shin //

- Iranian J. of Pharmaceutical Research. -2012. -№ 11(2). -P. 423-431.
- 82. Determination of local anaesthetics and their impurities in pharmaceutical preparations using HPLC method with amperometric detection / Z. Fijałek [et al.] // J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2005. Vol. 37, Issue 5. P. 913-918.
- 83. Рейхарт, Д. В. Анализ лекарственных средств при фармакокинетических исследованиях (обзор) / Д. В. Рейхарт, В. В. Чистяков // Казанский мед. журн. 2010. Т. 91, № 4. С. 532-536.
- 84. Меньшикова, Л. А. Особенности фармакокинетических исследований инновационных лекарственных препаратов / Л. А. Меньшикова // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2014. № 1 (6). С. 104-108.
- 85. Гугля, Е. Б. Применение жидкостной хроматомасс-спектрометрии в доклинических исследованиях лекарственных средств / Е. Б. Гугля // Вестник РГМУ. 2014. № 1. С. 65-71.
- 86. Хроматомасс-спектрометрия в фармакокинетических исследованиях /
 И. И. Мирошниченко [и др.] // Качественная клин. практика. 2008. –
 № 3. С. 29-36.
- 87. ВЭЖХ и СВЭЖХ как методы для определения лекарственных веществ в крови (обзор) / Ю. В. Медведев [и др.] // Хим.-фарм. журн. 2013. Т. 47, № 4. С. 45-51.
- 88. Ярошенко, Д. В. Нивелирование влияния биологической матрицы при определении лекарственных препаратов в плазме крови методом хромато-масс-спектрометрии: автореф. дис. ... канд. хим. наук: 02.00.02 / Ярошенко Д. В. Санкт-Петербург, 2014. 24 с.
- 89. Determination of local anaesthetics in body fluids by gas chromatography with surface ionization detection / H. Hattori [et al.] // J. of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. 1991. Vol. 564, Issue 1. P.

- 278-282.
- 90. Determination of ropivacaine and [H-2(3)]ropivacaine in biological samples by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection or mass spectrometry / M. Engman [at al.] // J. of chromatography. B, Biomedical sciences and applications. −1998. − № 709(1). − P. 57-67.
- 91. Шилова, Е. А. Количественное определение лидокаина в крови методом газовой хроматографии масс-спектрометрии / Е. А. Шилова, С. С. Катаев // Актуальные вопросы судебно-химических, химикотоксикологических исследований и фармацевтического анализа: материалы Рос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. Пермь, 2009. С. 70-73.
- 92. Swezey, C. B. Liquid chromatographic determination of lidocaine in serum / C. B. Swezey, J. L. Ponzo // Clinical biochemistry. 1984. Vol. 17. P. 230-232.
- 93. A High-Performance Liquid Chromatography Assay Method for the Determination of Lidocaine in Human Serum / H. M. Al Nebaihi [et al.] // Pharmaceutics. 2017. Vol. 9(4). 8 p.
- 94. Simultaneous determination of three local anesthetic drugs from the pipecoloxylidide group in human serum by high-performance liquid chromatography / E. Tanaka [et al.] // J. of Chromatography B. 2006. Vol. 834, Issue 1-2. P. 213-216.
- 95. High-performance liquid chromatographic method for an automated determination of local anaesthetics in human plasma / J. Drewe [et al.] // J. of chromatography B: analytical technologies in the biomedical and life sciences. − 1997. − Vol. 691, № 1. − P. 105-110.
- 96. Gaudreault, F. High-Performance Liquid Chromatography Using UV Detection for the Simultaneous Quantification of Ropivacaine and Bupivacaine in Human Plasma / F. Gaudreault, P. Drolet, F. Varin // Therapeutic Drug

- Monitoring. 2009. Vol. 31(6). P. 753-757.
- 97. Simultaneous determination of procaine, lidocaine, ropivacaine, tetracaine and bupivacaine in human plasma by high-performance liquid chromatography / W. Qin [at al.] // J. of Chromatography B. 2010. Vol. 878, Issues 15-16. P. 1185-1189.
- 98. Столяров, Е. Е. Определение ряда местных анестетиков в биологических жидкостях при химико-токсикологических исследованиях / Е. Е. Столяров, Ю. Н. Карпенко, Т. Л. Малкова / Суд.-мед. экспертиза. 2009. № 3. С. 31-33.
- 99. Flexible Method for Analysis of Lidocaine and Its Metabolite in Biological Fluids / G. Saluti [et al.] // J. of chromatographic science. −2016. − № 54(7). − P. 1193-1200.
- 100. A novel LC-MS/MS method for mepivacaine determination and pharmaco-kinetic study in a single-dose two-period crossover in healthy subjects / R.-W. Duana [et al.] // Artificial cells, nanomedicine and biotechnology. 2017. Vol. 45, № 8. P. 1605-1611.
- 101. Lindberg, R. L. Simultaneous determination of bupivacaine and its two metabolites, desbutyl- and 4'-hydroxybupivacaine, in human serum and urine / R. L. Lindberg, J. H. Kanto, K. K. Pihlajamäki // J. of Chromatography A. − 1987. − № 383(2). − P. 357-64.
- 102. Reduced graphene oxide as an efficient sorbent in microextraction by packed sorbent: Determination of local anesthetics in human plasma and saliva samples utilizing liquid chromatography-tandem mass spectrometry / M. Ahmadi [et al.] // J. of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. 2018. Vol. 1095. P. 177-182.
- 103. Molecularly imprinted polymer in microextraction by packed sorbent for the simultaneous determination of local anesthetics: lidocaine, ropivacaine, mepivacaine and bupivacaine in plasma and urine samples / S. M.

- Daryanavard [et al.] // Biomedical Chromatography. 2013. Vol. 27(11). P. 1481-1488.
- 104. Хомов, Ю. А. Капиллярный электрофорез как высокоэффективный аналитический метод (обзор литературы) [Электронный ресурс] / Ю. А. Хомов, А. Н. Фомин // Современные проблемы науки и образования. 2012. № 5. URL: http://science-education.ru/ru/article/view?id=6775. Дата обращения: 15.03.2019.
- 105. Фомин, А. Н. Разработка и валидация методики определения артикаина в моче капиллярным электрофорезом («капель 105») [Электронный ресурс] / А. Н. Фомин, Ю. А. Хомов, Ю. А. Джурко // Современные проблемы науки и образования. 2012. № 5. URL: http://science-education.ru/ru/article/ view?id=6757. Дата обращения: 15.03.2019.
- 106. К объективной оценке уровня концентрации доксициклина и артикаина в клинических объектах методом электрофореза [Электронный ресурс] / А. Б. Ларичев [и др.] // Современные проблемы науки и образования. 2012. № 4. URL: http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=6545. Дата обращения: 15.03.2019.
- 107. Разработка методики определения мепивакаина в моче капиллярным электрофорезом / А. Н. Фомин [и др.] // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 2-2. URL: http://www.science-education.ru/ru/article/ view?id=21939. Дата обращения: 15.03.2019.
- 108. Determination of bupivacaine and metabolites in rat urine using capillary electrophoresis with mass spectrometric detection / R. M. Krisko [et al.] // Electrophoresis. 2003. Vol. 24, № 14. P. 2340-2347.
- 109. Количественное определение лидокаина и бупивакаина в ткани печени методом капиллярного электрофореза [Электронный ресурс] / А. В. Смирнова [и др.] // Успехи современного естествознания. 2017. №

- 12. C. 16-20. URL: http://www.natural-sciences.ru/ru/article/view?id=36599. Дата обращения: 06.03.2019.
- 110. ВФС 42-2946-97. Анилокаин: субстанция. Введ. 03 октября 1997 г.
- 111. Малкова, Т. Л. Разработка методов анализа и стандартизация нового местноанестезирующего средства анилокаина: дис. ... канд. фарм. наук / Малкова Т. Л.; Перм. гос. фармацевт. акад. Пермь, 1991. 191 с.
- 112. Алексеева, И. В. Комплексные исследования с целью создания лекарственных форм для лечения раневых и воспалительных процессов на основе местноанестезирующего средства: Автореф. дис. ... д-ра фарм. наук: 15.00.01 / Алексеева И. В. Пермь, 2009. 79 с.
- 113. Рюмина, Т. Е. Биофармацевтический анализ мази с анилокаином / Т. Е. Рюмина, И. В. Алексеева, Т. Ф. Одегова // Фармация. 2004. № 4. С. 29.
- 114. Сафаргалина, Т. А. Разработка методики количественного определения анилокаина в местноанестезирующем спрее / Т. А. Сафаргалина, И. В. Алексеева, Ю. Н. Карпенко // Вестник ПГФА. Пермь, 2017. № 19. С. 129-131.
- 115. Алексеева, И. В. Разработка методик определения вспомогательных веществ в геле «анилогель» / И. В. Алексеева, В. В. Новикова, Ю. Н. Карпенко // Вестник ПГФА «Создание конкурентоспособных лекарственных средств приоритетное направление развития фармацевтической науки» : материалы науч.-практ. конф. с междунар. участием : науч.-практ. журн. 2017. № 20. С. 184-188.
- 116. Викулова, Ю. М. Выбор условий количественного определения анилокаина и хлоргексидина биглюконата в пленках лекарственных / Ю. М. Викулова, И. В. Алексеева, Ю. Н. Карпенко // Вестник ПГФА: науч.практ. журн. – 2018. – № 21. – С. 132-133.
- 117. Карпенко, Ю. Н. Разработка методик обнаружения и количественного

- определения ряда местноанестезирующих средств в биологических объектах: автореф. дис. ... канд. фарм. наук: 15.00.02 / Карпенко Ю. Н. Пермь, 2006. 149 с.
- 118. Трансдермальные терапевтические системы доставки лекарственных средств / В. В. Береговых [и др.] // Вестник МИТХТ. 2012. Т. 7, № 5. С. 17-22.
- 119. Трансдермальные терапевтические системы / под ред. Ю. Б. Белоусова// Качественная клиническая практика. 2001. № 1.
- 120. Ball, A. M. Optimizing transdermal drug therapy / A. M. Ball, K. M. Smith // American J. of Health-System Pharmacy. 2008. Vol. 65, № 14. P. 1337-1346.
- 121. Брюзгин, В. В. Инновационные технологии в лечении хронического болевого синдрома у онкологических больных: трансдермальные терапевтические системы / В. В. Брюзгин // Рус. мед. журн. − 2007. − № 25. − С. 1892.
- 122. Pharmacokinetics, tolerability, and performance of a novel matrix transdermal delivery system of fentanyl relative to the commercially available reservoir formulation in healthy subjects / J. Marier [et al.] // J. of Clinical Pharmacology. 2006. Vol. 46(6). P. 642-653.
- 123. Ramesh, Y. Transdermal patch of ramipril loaded chitosan nanoparticles dispersed in carbopol gel / Y. Ramesh, V. Sireesha // J. of Drug Delivery and Therapeutics. 2017. Vol. 7(6). P. 56-65.
- 124. Чугунов, А. О. Доставка лекарств через кожу: обзор современных и будущих подходов / А. О. Чугунов // Косметика и медицина. 2008. № 2. С. 72-79.
- 125. Transdermal and Topical Drug Administration in the Treatment of Pain / W. Leppert [et al.] // Molecules. 2018. Vol. 23(3). 16 p.
- 126. Трансдермальный перенос лекарственный веществ и способы его уси-

- ления / Е. Г. Кузнецова [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. -2016. -№ 2. C. 152-162.
- 127. Murphy, M. Transdermal drug delivery systems and skin sensitivity reactions. Incidence and management / M. Murphy, A. J. Carmichael // J. Clinical Dermatology. 2000. Vol. 1, № 6. P. 361-368.
- 128. Rationale for transdermal drug administration in Alzheimer disease / W. Oertel [et al.] // Neurology. 2007. Vol. 69, № 4. P. S4-S9.
- 129. Potts, R.O. Transdermal drug delivery: clinical considerations for the obstetrician-gynecologist / R. O. Potts, R. I. A. Lobo // American J. of Obstetrics and Gynecology. 2005. Vol. 105. P. 953-61.
- 130. Physicochemical effects of terpenes on organogel for transdermal drug delivery / P. F. Lim [et al.] // International J. of Pharmaceutics. 2008. Vol. 358, № 1-2. P.102-107.
- 131. Брюзгин, В. В. Инновационные технологии в лечении хронического болевого синдрома у онкологических больных: трансдермальные терапевтические системы / В. В. Брюзгин // Рус. мед. журн. 2007. № 25. С. 1892.
- 132. Чрезкожное введение лекарственных средств: современные аппликационные лекарственные формы / под ред. П. Г. Мизиной, В. А. Быкова. Самара, 2004. С. 5-18.
- 133. Матричные и резервуарные трансдермальные терапевтические системы инсулина на основе нетканых и полимерных материалов / В. И. Севастьянов [и др.] // Перспективные материалы. 2004. № 4. С. 44-48.
- 134. Пчелинцев, М. Трансдермальные терапевтические системы с фентанилом при хронической боли / М. Пчелинцев, Г. Абузарова // Врач. 2011. № 6. С. 39-41.
- 135. Kogan, A. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles / A.

- Kogan, N. Garti // Advances in Colloid and Interface Science. 2006. Vol. 123-126. P. 369-385.
- 136. Ester prodrugs of morphine improve transdermal drug delivery: a mechanistic study / J. J. Wang [et al.] // J. of Pharmacy and Pharmacology. 2007. Vol. 59, № 7. P. 917-925.
- 137. Prajapati, S. T. Formulation and evaluation of transdermal patch of repaglinide / S. T. Prajapati, C. G. Patel, C. N. Patel // International Scholarly Research Notices Pharmaceutics. 2011. 9 p.
- 138. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс] / Фонд фармацевтической информации. 2018. URL: http://www.drugreg.ru/Bases/WebReestrQuery.asp. Дата обращения 15.03.2018.
- 139. Применение трансдермальной терапевтической системы Версатис у пациентов с заболеваниями суставов и позвоночника / Е. И. Шмидт [и др.] // Справочник поликлин. врача. 2007. № 3. С. 51-53.
- 140. Рыжикова, В. А. Трансдермальная терапевтическая система бромокаина на основе биосовместимой микроэмульсионной композиции: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 14.01.24 / Рыжикова В. А. – Москва, 2015. – 24 с.
- 141. Effect or the transfer activator on functional properties of the bromocain matrix transdermal therapeutic systems / V. A. Ryzhikova, [et al.] // Inorganic materials: applied research. − 2014. − Vol. 5, № 5. − P. 498-503. DOI: 10.1134/S207511314050177.
- 142. Влияние активатора переноса на диффузию бромокаина из матричных трансдермальных терапевтических систем / А. В. Рыжикова [и др.] // Перспективные материалы. 2014. № 2. С. 26-32.
- 143. ОФС 1.1.0006.15 Фармацевтические субстанции [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея РФ. Т. 1. 14-е изд. Москва, 2018. –

- C. 176-184. Режим доступаhttp://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_1/HTML/176/index.html
- 144. Фармацевтические субстанции. Требования государственной фармакопеи к их стандартизации / Е. И. Саканян [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. 2017. № 62. С. 63-67.
- 145. Impurities in New Drug Substances, Q3A(R2) [Электронный ресурс] //
 International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for
 Registration of Pharmaceuticals for Human Use. URL:
 http://www.ich.org/products/guidelines/ quality/article/qualityguidelines.html. Дата обращения 03.07.2018.
- 146. Совершенствование методологических подходов к стандартизации фармацевтических субстанций / Е. Л. Ковалева [и др.] // Хим-фарм. журн. -2010. Т. 44, № 1. С. 35-42.
- 147. Современные подходы к разработке стандартных образцов для оценки качества фармацевтических субстанций / В. А. Меркулов [и др.] // Хим.-фарм. журн. 2015. \mathbb{N} 11. С. 54-56.
- 148. ОФС.1.1.0008.15. Остаточные органические растворители [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея РФ. Т. 1. 14-е изд. Москва, 2018. С. 203-207. Режим доступа : http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_1/HTML/203/index.html
- 149. Impurities: guideline for residual solvents, Q3C(R7) [Электронный ресурс] // International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. URL: http://www.ich.org/products/guide-lines/quality/article/quality-guidelines.html. Дата обращения 03.07.2018.
- 150. Федорова, Г. А. Применение микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии в медицине / Г. А. Федорова, Л. А. Кожанова, Е. М. Полянская // Вестник восстановительной медицины. –

- 2008. № 1(23). C. 35-41.
- 151. Validation of analytical procedures: Text and methodology, Q2(R1) // International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use [Электронный ресурс]. URL: http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html. Дата обращения 03.07.2018.
- 152. ОФС.1.1.0012.15 Валидация аналитических методик [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея РФ. Т. 1. 14-е изд. Москва, 2018. С. 276-288. Режим доступа : http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_1/HTML/276/index.html
- 153. Сабирзянов, Д. Р. Анализ остаточных растворителей в субстанции анилокаина / Д. Р. Сабирзянов, Е. Ю. Тумилович, Ю. Н. Карпенко // Здоровье и образование в XXI веке. 2017. Vol. 19, № 10. С. 359-362.
- 154. 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.
- 155. 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 міжнародноі науково-практичноі конференціі. Одесса, 2013. С. 9-11.
- 156. Sabirzyanov, D. R. Selecting the conditions of anilocaine's chromatographic determination in biological object extracts / D. R. Sabirzyanov, J. N. Karpenko // Topical issues of new drugs development. 2016. Vol. 1. P. 216.

- 157. Сабирзянов, Д. Р. Оптимизация условий пробоподготовки плазмы крови к хроматографическому исследованию для изучения фармакокинетики аналокаина / Д. Р. Сабирзянов, Ю. Н. Карпенко // Современная фармация: образование, наука, бизнес : материалы науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 50-летию фарм. фак. Тюмень, 2014.
- 158. Сабирзянов, Д. Р. Валидационная оценка хроматографической методики определения анилокаина в плазме крови / Д. Р. Сабирзянов, Ю. Н. Карпенко // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 2 (2 часть).
- 159. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том первый / А. Н. Миронов [и др.]. Москва: Гриф и К, 2013. 328 с.
- 160. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation // U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evolution and Research (CDER). Washington, 2001. P. 22.
- 161. Guideline on bioanalytical method validation // European medicines agency: science medicines health. London, 2011. P. 22.
- 162. 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.

приложение

УТВЕРЖДАЮ

Пиректор АНО «ИМБИИТ»

Севастьянов В.И.

февраля 2015 г.

Акт внедрения результатов научных исследований

1. Наименование разработки:

Методика количественного определения бромокаина в микроэмульсионной трансдермальной терапевтической системе 0,05 г (0,10 г) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

2. Место разработки:

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра токсикологической химии.

3. Авторы:

Аспирант кафедры токсикологической химии Сабирзянов Д.Р., доцент кафедры токсикологической химии, к.ф.н. Карпенко Ю.Н.

4. Место внедрения:

Автономная некоммерческая организация «Институт медико-биологических исследований и технологий»

5. Результаты внедрения:

Предложенная авторами методика количественного определения бромокаина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии дает точные и воспроизводимые результаты для предполагаемой области применения. Разработанная методика включена в проект Φ CП «ТТС бромокаина, терапевтическая система трансдермальная, 0,05 г (0,10 г)».

Зав. лабораторией систем доставки лекарственных веществ

Мероч Саломатина Л.А.

УТВЕРЖДАЮ

Директор АНО «ИМБИИТ»

Севастьянов В.И.

🗱 7» февраля 2015 г.

Акт внедрения результатов исследования

1. Наименование разработки:

Методика определения посторонних примесей в микроэмульсионной трансдермальной терапевтической системе (TTC) бромокаина 0,05 г (0,10 г) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

2. Место разработки:

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра токсикологической химии.

3. Авторы:

Аспирант кафедры токсикологической химии Сабирзянов Д.Р., доцент кафедры токсикологической химии, к.ф.н. Карпенко Ю.Н.

4. Место внедрения:

Автономная некоммерческая организация «Институт медико-биологических исследований и технологий»

5. Результаты внедрения:

Предложенные авторами условия ВЭЖХ позволяют эффективно разделить и количественно определить специфические примеси бромокаина в ТТС. Методика отличается высокой чувствительностью, специфичностью, дает точные и воспроизводимые результаты. Разработанная методика включена в проект ФСП «ТТС бромокаина, терапевтическая система трансдермальная, 0,05 г (0,10 г)».

Зав. лабораторией систем доставки лекарственных веществ

Марсе Саломатина Л.А.



Акт внедрения результатов исследования

1. Наименование разработки:

Методика определения бромокаина в плазме крови лабораторных животных методом микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии.

2. Место разработки:

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра токсикологической химии.

3. Авторы:

Аспирант кафедры токсикологической химии Сабирзянов Д.Р., доцент кафедры токсикологической химии, к.ф.н. Карпенко Ю.Н.

4. Место внедрения:

Автономная некоммерческая организация «Институт медико-биологических исследований и технологий»

5. Результаты внедрения:

Предложенная авторами методика хроматографического определения бромокаина в плазме крови лабораторных животных отличается высокой чувствительностью, специфичностью, экспрессностью, в условиях модельного эксперимента дает точные и воспроизводимые результаты. Разработанная методика использована при проведении доклинических фармакокинетических исследований образцов микроэмульсионной трансдермальной терапевтической системы (ТТС) бромокаина.

Зав. лабораторией систем доставки лекарственных веществ

Марон — Саломатина Л.А.

УТВЕРЖДАЮ

Директор АНО «ИМБИИТ»

имвиит

Севастьянов В.И.

февраля 2015 г.

Акт внедрения результатов исследования

1. Наименование разработки:

Методика определения бромокаина в биологических объектах методом микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии.

2. Место разработки:

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра токсикологической химии.

3. Авторы:

Аспирант кафедры токсикологической химии Сабирзянов Д.Р., доцент кафедры токсикологической химии, к.ф.н. Карпенко Ю.Н.

4. Место внедрения:

Автономная некоммерческая организация «Институт медико-биологических исследований и технологий»

5. Результаты внедрения:

Разработанная авторами методика пробоподготовки в условиях модельного эксперимента обеспечивает высокий процент извлечения бромокаина из биоматериала (тканей и органов лабораторных животных). Предложенные условия хроматографического анализа позволяют эффективно разделять бромокаин от соэкстрактивных веществ. Методика отличается высокой чувствительностью и воспроизводимостью. Разработанная методика использована для определения бромокаина в тканях и органах лабораторных животных (коже, почках, печени) при проведении доклинических фармакокинетических исследований образцов микроэмульсионной трансдермальной терапевтической системы (ТТС) бромокаина.

Зав. лабораторией систем доставки лекарственных веществ

Мароге Саломатина Л.А.

ФКП «Армавирская биофабрика»

Производство лекарственных средств медицинского назначения Отдел контроля качества лекарственных средств (Лицензия № 00008-ЛС от 15.06.2015 г)

«<u>ДО» феврала</u> 2017 года

АКТ АПРОБАЦИИ

методик контроля качества субстанции бромокаина

согласно проекта ФСП

- 1. **Наименование разработки.** Проект фармакопейной статьи предприятия (ФСП) на субстанцию бромокаина.
- 2. **Место разработки методик.** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра токсикологической химии.
- 3. Разработчики методик. Аспирант кафедры токсикологической химии Сабирзянов Д.Р., доцент кафедры токсикологической химии, к.ф.н. Карпенко Ю.Н., зав. кафедрой токсикологической химии, д.ф.н. Малкова Т.Л., профессор кафедры фармацевтической технологии Алексеева И.В.
- 4. Результаты апробации методик. Апробация методик проведена в химической лаборатории Отдела контроля качества ФКП «Армавирская биофабрика» на трех сериях субстанции. Полученные результаты соответствуют показателям и требованиям проекта ФСП. Предлагаемые авторами методики отличаются чувствительностью, специфичностью, позволяют получать точные и воспроизводимые результаты. Проект ФСП составлен в соответствии с требованиями ОСТ 91500.05.001.00 "Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения".

Начальник ОКК-

Уполномоченное лицо по качеству/

Г.А. Никульча

Начальник производства ЛС МН -

Уполномоченное лицо по производству ЛС, к.ф.н.

Е.А. Коваленко



Акт внедрения научных достижений в учебный процесс

Материалы диссертационной работы Сабирзянова Дениса Робертовича, включающие разработку методик определения подлинности, чистоты и количественного определения бромокаина в субстанции и трансдермальной лекарственной форме, внедрены в учебный процесс кафедры токсикологической химии Пермской государственной фармацевтической академии при проведении обучения студентов очного факультета на дисциплине по выбору «Методы инструментальной хроматографии в анализе лекарственных и наркотических средств».

Разработанные методики на основе газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии используются в лекционном материале на тему «Высокоэффективная жидкостная хроматография и газовая хроматография в фармацевтическом анализе: установление подлинности, чистоты и количественного содержания», а также на практических занятиях по темам «Газовая хроматография в фармацевтическом анализе. Определение остаточных органических растворителей в субстанциях» и «ВЭЖХ в фармацевтическом анализе: установление чистоты». Методики отличаются высокой чувствительностью, специфичностью, дают точные и воспроизводимые результаты.

Зав. кафедрой токсикологической химии, д. фарм. н., профессор

All

Т.Л. Малкова

Проректор по учебно-воспитательной работе ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России, д.ф.н., доцент

Е.Р. Курбатов



АКТ ВНЕДРЕНИЯ научных достижений в учебный процесс

Материалы диссертационной работы Сабирзянова Дениса Робертовича, включающие разработку методик определения бромокаина в биологических объектах на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии внедрены в учебный процесс Пермской государственной фармацевтической академии и используются на практическом занятии «Высокоэффективная жидкостная лекарственных хроматография В анализе средств, доклинических фармакокинетических исследованиях биологически активных соединений», которое проводится на цикле повышения квалификации для преподавателей фармацевтических ВУЗов и училищ химического, технологического профиля, фармакогнозии и ботаники под общим названием «Стандартизация, подтверждение соответствия и контроль качества лекарственных средств» на базе кафедры токсикологической химии и Регионального испытательного центра «Фарматест».

Методика отличаются высокой чувствительностью, специфичностью, дают точные и воспроизводимые результаты.

Руководитель РИЦ «Фарматест» ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России, заведующий кафедрой токсикологической химии, д. фарм. н., профессор

Ilh

Т.Л. Малкова

12.12.2018 г.