

ИССЛЕДОВАНИЯ В ОБЛАСТИ СТАНДАРТИЗАЦИИ СУБСТАНЦИИ АНИЛОКАИНА ПО ПОКАЗАТЕЛЮ ПОСТОРОННИЕ ПРИМЕСИ

Карпенко Ю.Н.¹, Чащина С.В.¹, Тумилович Е.Ю.¹, Алексеева И.В.¹

¹ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Пермь, Россия (614990, Пермь, ул. Полевая,2), e-mail: karpenko_pfa@mail.ru

В Пермской государственной фармацевтической академии осуществлен синтез местного анестетика анилокаина, ценным свойством которого является выраженное поверхностноанестезирующее действие, а также наличие противовоспалительной и умеренной антимикробной активности, чем он выгодно отличается от применяемых в медицинской практике других местных анестетиков. В настоящей статье приведены исследования по определению условий анализа посторонних примесей в субстанции анилокаина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Оптимальное разделение анилокаина и его возможных примесей (как идентифицированных, так и неидентифицированных) наблюдается в изократическом режиме ВЭЖХ при использовании элюента ацетонитрил – фосфатный буфер (рН 3). Скорость потока подвижной фазы – 1 мл/мин, длина волны детектирования – 210 нм. Время регистрации хроматограммы – 20 минут. Для оценки безопасности идентифицированных примесей в субстанции проведены токсикологические исследования по определению величин ЛД₅₀. Анализ нескольких серий субстанций анилокаина позволил предварительно установить нормы содержания посторонних примесей.

Ключевые слова: анилокаин, посторонние примеси, ВЭЖХ, безопасность, биологические испытания.

RESEARCH IN THE FIELD OF DETERMINATION OF IMPURITIES IN THE ANILOKAIN SUBSTANCE

Karpenko Y.N.¹, Chashchina S.V.¹, Tumilovich E.Y.¹, Alekseeva I.V.¹

¹Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, Russia (614990, Perm, Poleyaya street, 2), e-mail: karpenko_pfa@mail.ru

In the Perm State Pharmaceutical Academy the local anesthetic anilocain was synthesized. It holds such valuable properties as expressed surface anaesthesia action, anti-inflammatory and mild antimicrobial activity. These features distinguish the anilocain from another local anesthetics used in medical practice. Studies to determine the conditions of the analysis of impurities by high performance liquid chromatography were carried out. Optimum separation of anilocain and it's possible impurities (identified and unidentified ones) is observed by use of isocratic HPLC with an eluent of acetonitrile - phosphate buffer (pH 3). Mobile phase flow rate - 1 ml / min , detection wavelength - 210 nm. The time of chromatogram registration - 20 minutes. Analysis of several series of anilocain substances allowed to preset the rates of impurities in this substance.

Keywords: anilocain, drug impurities, HPLC, safety, biological tests.

Введение

Анилокаин [2-броманилид-3-диэтиламинопропановой кислоты гидрохлорид] – местный анестетик из группы замещенных амидов, синтезированный на кафедре органической химии Пермской государственной фармацевтической академии (ПГФА). Как лекарственное средство анилокаин зарегистрирован (рег. номер 97/292/2) приказом Минздрава РФ № 292 от 3.10.1997 года и внесен в Государственный реестр лекарственных средств России. Он обладает выраженной активностью при всех видах анестезии, превосходя по эффективности тримекаин. Анилокаин в 1,5 раза менее токсичен, чем лидокаин, характеризуется отсутствием отрицательного влияния на дыхание, кровообращение и ЦНС. Ценным свойством анилокаина является выраженное поверхностноанестезирующее

действие, а также наличие противовоспалительной и умеренной антимикробной активности, чем он выгодно отличается от применяемых в медицинской практике других местных анестетиков [5,9]. Кроме того, исследования по изучению антиаритмического действия препарата показали его эффективность при предсердных, желудочковых и смешанных аритмиях. На модели нейрогенной фибрилляции предсердий анилокаин превосходит лидокаин по выраженности и продолжительности антиаритмического влияния [6]. На основе анилокаина разработаны и доведены до медицинского применения ряд лекарственных форм: 1% и 2% инъекционные растворы, 5% раствор для наружного применения, мазь «Аникол», перевязочные средства длительного действия. На кафедре фармацевтической технологии Пермской фармакадемии разработаны и другие лекарственные формы с перспективой внедрения их в медицинскую и ветеринарную практику (суппозитории, пленки лекарственные, обезболивающий гель, аэрозоль и т.д.) [4].

Важной составляющей качества фармацевтической субстанции является чистота. Утвержденная в 1997 г. временная фармакопейная статья на субстанцию анилокаина предусматривает определение посторонних примесей методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) [1]. Однако современные мировые фармакопеи для оценки примесей рекомендуют замену метода ТСХ на более специфичный и точный метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [2]. В связи с возрастающими требованиями к качеству фармацевтических субстанций целью настоящей работы явилась разработка условий определения посторонних примесей в субстанции анилокаина методом ВЭЖХ, а также проведение биологических испытаний для оценки безопасности примесей. Данные исследования необходимы на этапе разработки и валидации методики определения посторонних примесей при включении её в проект фармакопейной статьи на субстанцию.

Материалы и методы исследования

Разработка условий хроматографического определения посторонних примесей проводилась на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence (Япония), оснащённом диодноматричным детектором (SPD-M20A). Хроматографическая колонка – Zorbax SB-C18 (4,6 мм × 250 мм, 5 мкм). Для приготовления подвижных фаз, а также для приготовления испытуемых и стандартных растворов были использованы реактивы квалификации «для ВЭЖХ».

Токсикологические исследования проведены в опытах на белых нелинейных мышах обоего пола массой 24-30 г, содержащихся на обычном рационе вивария. Определение средней летальной дозы (ЛД₅₀) проводилось в соответствии с Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [8]. Исследуемые соединения вводили внутривентриально в виде взвеси в 2% крахмальной слизи в возрастающих дозах. В каждой

серии использовались 8 животных. Результаты обрабатывали по В.В. Прозоровскому с вычислением средней смертельной дозы при $P=0,05$ [7].

В работе использованы серии субстанции анилокаина, синтезированные в ПГФА в период с 1988 по 2012 г, 2-броманилин (Aldrich), N-(2-бромфенил)акриламид (синтез вещества осуществлен по методике [3], хроматографическая чистота не менее 99%).

Результаты исследований и их обсуждение

Ранее проведенные исследования показали, что специфическими примесями в субстанции анилокаина могут являться N-(2-бромфенил)акриламид (продукт деструкции анилокаина в результате реакции β -элиминирования) и 2-броманилин (как исходный продукт при синтезе и как продукт гидролитического расщепления анилокаина) (рис.1).

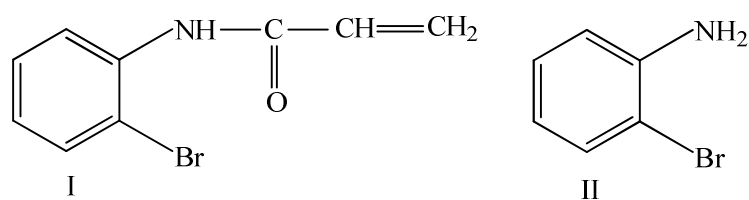


Рис. 1. Структура специфических примесей анилокаина N-(2-бромфенил)акриламид (I) и 2-броманилин (II)

Подходы к определению и нормированию примесей зависят от токсичности примеси, ее фармакологической активности, длительности приема препарата и максимальной суточной дозы [2].

Установлено, что средняя летальная доза 2-броманилина составляет 355,0 (310,0 ÷ 400,0) мг/кг массы животного, что позволяет отнести данное соединение к умеренно токсичным. Средняя летальная доза N-(2-бромфенил)акриламида составила 650,0 (530,0 ÷ 800,0) мг/кг массы животного. Это также указывает на умеренную токсичность соединения.

На этапе выбора оптимальных условий разделения исследуемых веществ в режиме обращено-фазной жидкостной хроматографии нами апробированы элюенты на основе водно-ацетонитрильных смесей. В качестве модификаторов использовались фосфатные буферы с различными значениями pH.

В качестве аналитической выбрана длина волны 210 нм, поскольку в данной области спектра изучаемые вещества характеризуются максимальным поглощением (рис.2), что в итоге обеспечит наибольшую чувствительность методики при определении примесей.

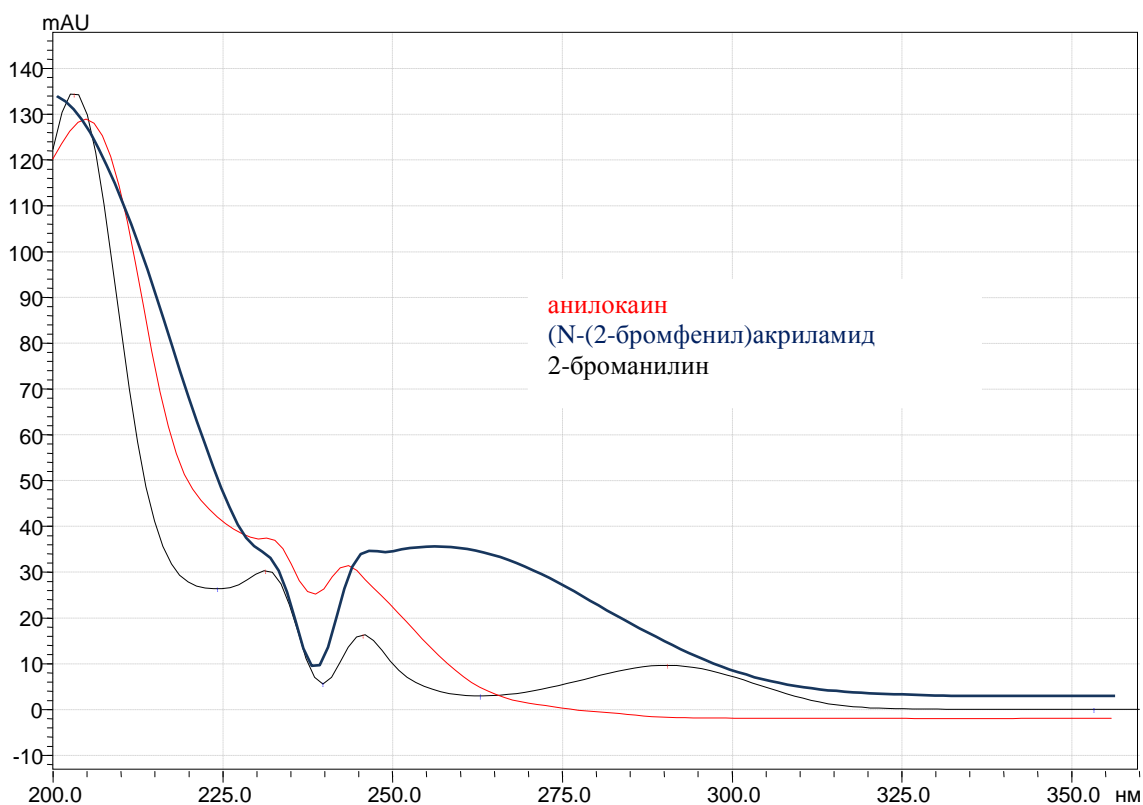


Рис.2. УФ-спектры исследуемых веществ

Европейская фармакопея для анализа субстанции лидокаина гидрохлорида (структурного аналога анилокаина) методом ВЭЖХ на наличие органических примесей рекомендует в качестве элюента смесь ацетонитрила и фосфатного буфера с рН 8 [10]. При использовании этой подвижной фазы в анализе модельной смеси анилокаина и его специфических примесей исследуемые вещества элюировались в следующем порядке: N-(2-бромфенил)акриламид со временем удерживания 8,8 мин., 2-броманилин – 11,3 мин. и анилокаин – 12,1 мин. Однако данные условия не позволили эффективно разделить анилокаин 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 на фосфатные буферы с рН 5 и рН 3 привело к уменьшению удерживания анилокаина в колонке (время удерживания – 4,1 и 3,2 мин соответственно) и отличному разделению всех компонентов пробы. Времена удерживания пиков N-(2-бромфенил)акриламида и 2-броманилина не изменились. Пример хроматограммы модельной смеси приведен на рис.3 (концентрация компонентов 200 мкг/мл).

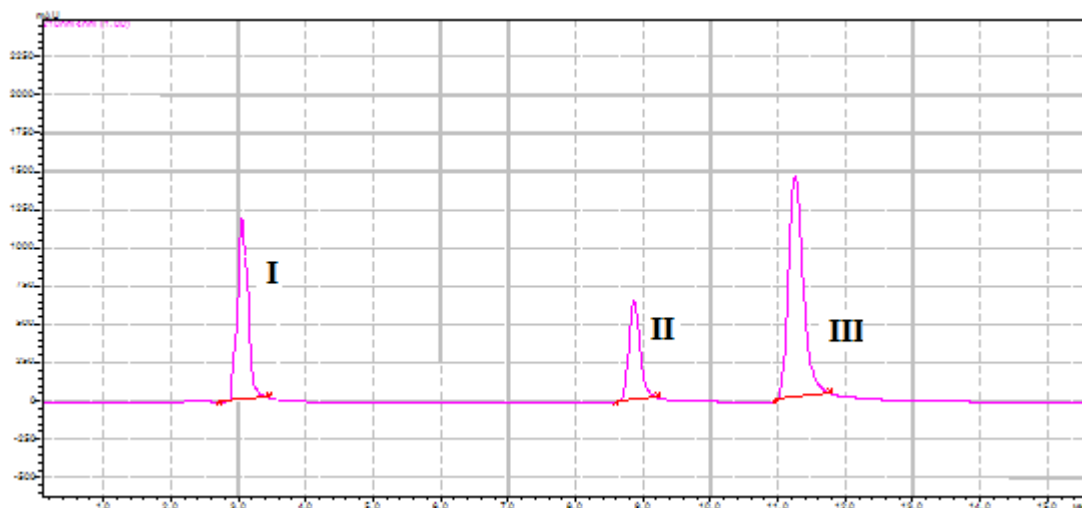


Рис.3. Хроматограмма модельной смеси анилокаина (I),
N-(2-бромфенил)акриламида (II) и 2-броманилина (III)

(элюент: ацетонитрил – фосфатный буфер с pH3 (40: 60), скорость потока: 1мл/мин.)

Хроматографическое исследование концентрированных растворов субстанций анилокаина (4000 мкг/мл) показало, что при использовании подвижной фазы на основе ацетонитрила и фосфатного буфера с pH 3 на хроматограммах обнаруживалась дополнительная неидентифицированная примесь с относительным временем удерживания по анилокаину около 1,9 (абсолютное время удерживания 6,2 мин.) (рис.4).

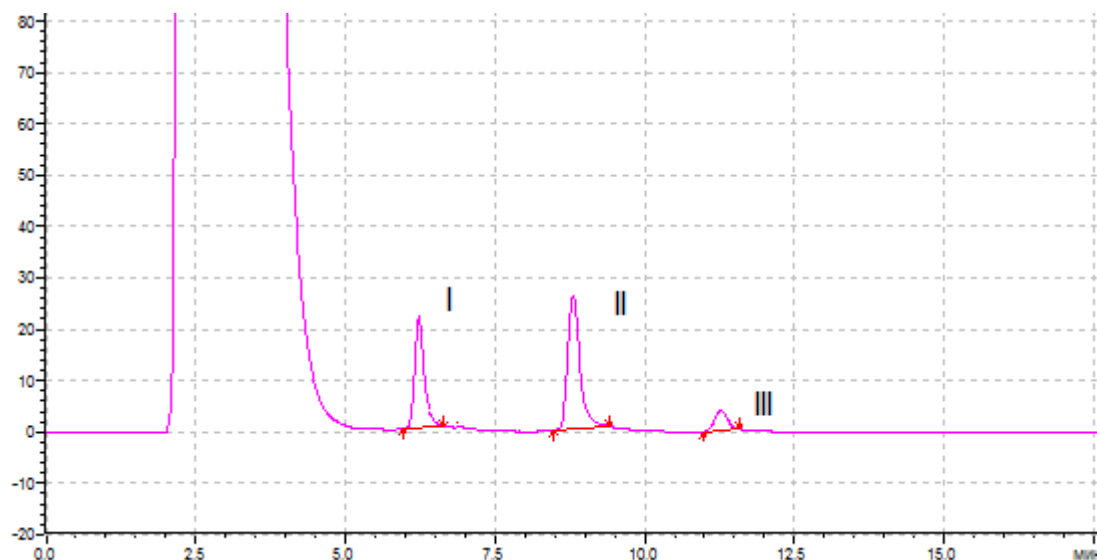


Рис. 4. Хроматограмма модельной смеси анилокаина (4000 мкг/мл), N-(2-бромфенил)акриламида (II) и 2-броманилина (III), I – неидентифицированная примесь

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

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

Данные условия были апробированы при анализе нескольких серийных образцов субстанции анилокаина (20.05.2012; 17.10.2011; 15.04.2008; 10.02.88). Для определения возможных примесей 0,1 г субстанции анилокаина помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили до метки метанолом (испытуемый раствор). 20 мкл раствора вводили в инжектор хроматографа. Идентификацию и количественное определение идентифицированных примесей осуществляли с использованием стандартных растворов N-(2-бромфенил)акриламида и 2-броманилина. Для оценки содержания неидентифицированных примесей использовали разведения испытуемой субстанции. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты анализа серийных образцов анилокаина

Серия	Содержание идентифицированных примесей (%)		Содержание неидентифицированной примеси с относительным временем удерживания 1,9	Общее содержание примесей
	N-(2-бромфенил)акриламид	2-броманилин		
20.05.2012	0,0056%	0,0010%	Не более 0,2%	Не более 0,5%
17.10.2011	0,0026%	0,0013%	Не более 0,2%	Не более 0,5%
15.04.2008	0,0009%	0,00025%	Не более 0,2%	Не более 0,5%
10.02.88	0,0015%	0,0047%	Не более 0,2%	Не более 0,5%

На основании полученных данных предложено нормировать содержание в субстанции анилокаина: 2-броманилина – не более 0,01%; N-(2-бромфенил)акриламида – не более 0,1%; единичной неидентифицированной примеси с относительным временем удерживания 1,9 – не более 0,2%; любой другой примеси – не более 0,1%; общее содержание примесей – не более 0,5%.

Выводы

1. Для оценки безопасности идентифицированных специфических примесей в субстанции анилокаина (2-броманилина и N-(2-бромфенил)акриламида) установлены их величины ЛД₅₀.
2. Определены условия определения посторонних примесей в субстанции анилокаина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.
3. На основании анализа нескольких серий субстанций анилокаина в разработанных хроматографических условиях проведено предварительное нормирование содержания посторонних примесей.

Список литературы

1. ВФС 42-2946-97 Анилокаин: субстанция. – Введ.03 октября 1997 г. – [Б. м., б. г.]. – 10с.
2. Ковалева Е.Л. Совершенствование методологических подходов к стандартизации фармацевтических субстанций / В.Л. Багирова, К.С. Шахназаров // Химико-фармацевтический журнал. – 2010. – Т. 44, №1. – С. 35-42.
3. Малкова Т.Л. Разработка методов анализа и стандартизация нового местноанестезирующего средства анилокаина: дисс....канд. фармац. наук, – Пермь, 1991. – 191 с.
4. Панцуркин В.И., Алексеева И.В. Анилокаин, поиск, свойства. Начальный опыт применения лекарственных форм в медицинской практике: монография. – Пермь: Изд-во ГОУ ВПО ПГФА Роздрава, 2006. – 174 с.
5. Панцуркин В.И., Колла В.Э., Одегова Т.Ф. «Гидрохлорид орто-броманилида β-диэтиламинопропионовой кислоты, проявляющий противовоспалительную и антимикробную активность, мазь, обладающая анестезирующей, противовоспалительной и антимикробной активностью на его основе» // Патент России №2139050. Патент РФ № 2139050,1999.
6. Петропавловская Т.А. Сравнительная активность анилокаина и лидокаина при моделировании нарушений сердечного ритма: дис....канд. медич. наук. – Краснодар, 2010. – 151 с.
7. Прозоровский В.В. Экспресс-метод определения средней эффективной дозы и ее ошибки / М.П. Прозоровская, В.М. Демченко // Фармакол. и токсикол. – 1978. – №4 – С. 497-502.
8. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. – 1 ч. / под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
9. Хорошкова Н.В., Панцуркин В.И., Шкляев В.С., Горнова Н.А., Прянишникова Н.Т. Гидрохлорид орто-броманилида β-диэтиламинопропионовой кислоты, проявляющий анестезирующую активность // Патент России №1146989.1993.

10. European Pharmacopoeia. – 6th ed. – Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines, 2008. – P. 2269-2270.

Рецензенты:

Вихарева Е.В., д.фарм.н., доцент, заведующий кафедрой аналитической химии ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России, г. Пермь.

Сыропятов Б.Я., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой физиологии с основами анатомии ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России, г. Пермь.