

ВАЛИДАЦИОННАЯ ОЦЕНКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНИЛОКАИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ

Сабирзянов Д.Р.¹, Карпенко Ю.Н.¹

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

Разработана и валидирована методика количественного определения местного анестетика анилокаина в плазме крови на основе микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием. Биоаналитическая методика включает осаждение белков плазмы, жидкость-жидкостную экстракцию аналита и хроматографическое определение. Разделение проводили на колонке с обращено-фазным сорбентом ProntoSIL120-5C18 AQ в условиях градиентного элюирования при использовании в качестве подвижной фазы смеси ацетонитрил – 0,1% водный раствор кислоты трифторуксусной. Методика была подвергнута процедуре валидации в соответствии с современными требованиями, предъявляемыми к биоаналитическим методикам. Продемонстрирована хорошая линейность в диапазоне концентраций анилокаина 42-2100 нг/мл (коэффициент корреляции 0.996). Анализ контрольных образцов качества показал удовлетворительные значения показателей прецизионности (CV % не более 9) и правильности (ϵ , % не более 4).

Ключевые слова: анилокаин, фармакокинетические исследования, валидация, обращённо-фазная ВЭЖХ.

VALIDATION ESTIMATION OF THE CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR DETERMINATION OF ANILOCAIN IN BLOOD PLASMA

Sabirzyanov D.R.¹, Karpenko J.N.¹

¹«The Perm state pharmaceutical academy» Ministry of Health of Russian Federation, Perm, Russia (614990, Perm, Polevaya st.) e-mail: perm@pfa.ru

A simple and sensitive micro-column high performance liquid chromatography (HPLC) method with ultraviolet detection was developed and validated for the quantification of local anesthetic anilocain in plasma. The bioanalytical technique consists of plasma protein precipitation, liquid-liquid extraction and chromatographic assay. The separation was performed on a ProntoSIL120-5C18 AQ column under gradient conditions using a mobile phase of acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid in water. The technique was validated according to the modern requirements on bioanalytical method validation. The method shows a good linearity in the concentration range of 42-2100 ng/ml with a correlation coefficient of 0.996. Analysis of quality control samples demonstrated the precisions (CV %) were not higher than 9%, and accuracy (ϵ , %) was within 4.

Keywords: anilocain, pharmacokinetic studies, validation, reserve phase HPLC.

Анилокаин [2'-броманилида-3-диэтиламинопропановой кислоты гидрохлорид] является представителем местноанестезирующих средств из группы замещенных амидов. Сочетание доказанной высокой эффективности анилокаина при различных видах анестезии и сопутствующей противовоспалительной и умеренной антимикробной активности выгодно отличают его от импортных аналогов, применяемых в медицинской практике [2]. В Пермской государственной фармацевтической академии (ПГФА) на основе анилокаина разработаны и доведены до медицинского применения 1% и 2% инъекционные растворы, 5% раствор для наружного применения, мазь «Аникол», перевязочные средства длительного действия. В настоящее время на кафедре фармацевтической технологии продолжают исследования по созданию других лекарственных форм с перспективой внедрения их в

медицинскую и ветеринарную практику (суппозитории, пленки лекарственные, обезболивающий гель, аэрозоль и т.д.).

Изучение фармакокинетических параметров потенциального препарата, одного из важнейших этапов доклинических и клинических исследований, невозможно без разработки высокочувствительных, точных и воспроизводимых методик определения его в биологических объектах. Лидирующее место среди методов определения лекарственных средств в биологическом материале, в том числе при изучении фармакокинетики, занимает высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с различными видами детектирования [1, 3]. Микроколоночная ВЭЖХ в силу дополнительных преимуществ, таких как экспрессность, экономичность, удовлетворительные метрологические характеристики в настоящее время активно используется для решения сложных медицинских задач в области лекарственного терапевтического мониторинга и фармакокинетических исследований [6]. В связи с этим, целью настоящей работы явилась разработка и валидация методики определения анилокаина в плазме крови методом микроколоночной обращённо-фазной ВЭЖХ для целей изучения фармакокинетики.

Материалы и методы исследования

В работе использовали микроколоночный жидкостный хроматограф "Милихром А-02" (ЗАО ИХ "ЭкоНова", Новосибирск, Россия) с колонкой размером 2x75 мм, заполненной обращено-фазным сорбентом ProntoSIL 120-5C18 AQ (Bischoff, Германия), и спектрофотометрическим детектором. Обработку хроматографической информации осуществляли при помощи программного обеспечения «Мультихром».

В работе использована субстанция анилокаина (ВФС 42-2946-97), синтезированная в ПГФА. В качестве биологической матрицы для приготовления калибровочных стандартов и контрольных образцов использовали плазму крови человека, полученную со станции переливания крови. Плазму хранили в сверхнизкотемпературном морозильном аппарате при температуре не выше 60°C.

Концентрированный раствор анилокаина с концентрацией 1 мг/мл был приготовлен путем растворения в метаноле. Рабочие растворы готовились путем соответствующих разведений исходных растворов водой. Калибровочные стандарты и контрольные образцы качества анилокаина готовили из рабочих растворов путем их разведения в бланковой плазме.

Для приготовления элюентов использовали воду, полученную в системе очистки воды Simplicity UV, кислоту трифторуксусную кислоту, ацетонитрил для хроматографии (сорт 0, Кристохром, Санкт-Петербург).

Результаты исследований и их обсуждение

Проведенные ранее исследования по оптимизации условий изолирования анилокаина из плазмы крови показали, что в условиях модельного эксперимента максимальное извлечение вещества ($\approx 83\%$) наблюдается при использовании жидкость-жидкостной экстракции из щелочной среды после предварительного осаждения белков плазмы ацетонитрилом [5]. Для определения анилокаина в извлечениях использовали метод микроколоночной ВЭЖХ. Оптимальные результаты хроматографического разделения анилокаина и соэкстрактивных веществ были получены при градиентном элюировании в следующих условиях:

- элюент А – 0,1% раствор трифторуксусной кислоты, элюент В – 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 (опорная длина волны - 210 нм, вспомогательные длины волн: 220, 230, 240, 250, 260, 280, 300 нм);
- температура термостата – 40°C;
- объем вводимой пробы – 20 мкл.

В данных условиях абсолютное время удерживания анилокаина составляет $\approx 9,5$ мин.

Валидационную оценку биоаналитической методики проводили по следующим параметрам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность, предел обнаружения и количественного определения, стабильность [4].

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.1-2.

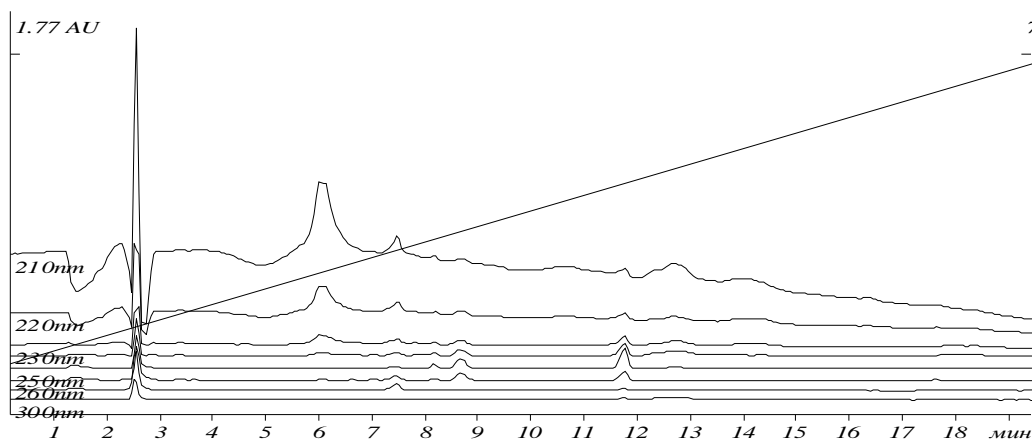


Рис.1. Хроматограмма извлечения из бланковой плазмы (холостой опыт)

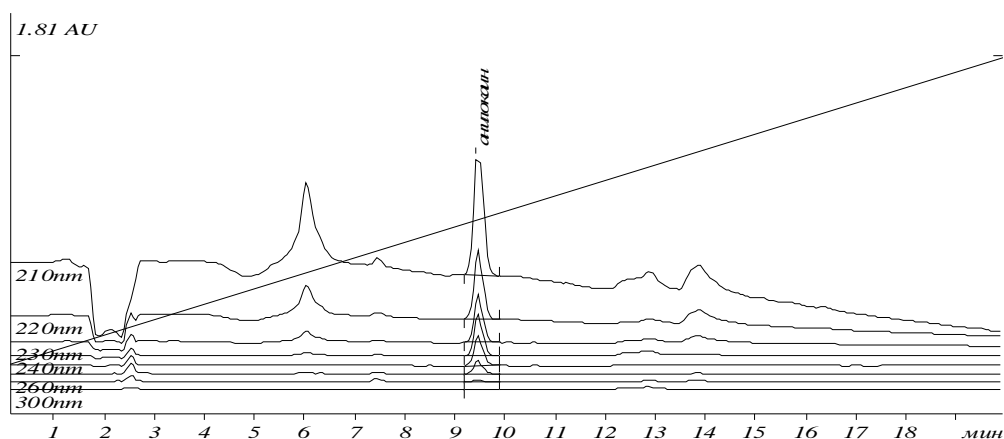


Рис.2. Хроматограмма извлечения из модельной смеси плазмы с содержанием анилокаина (500 нг/мл)

Анализ хроматограмм «холостого» опыта показал отсутствие пиков эндогенных веществ плазмы на времени выхода анилокаина. Коэффициент разделения пика анилокаина и соседних пиков составил не менее 5.

Для установления линейности методики были проанализированы 8 образцов модельных смесей плазмы с содержанием анилокаина от 42 до 2100 нг/мл. Результаты представлены на рис.3 и таблице 1.

Градуировочная зависимость описывается уравнением $S = 0,0024 \times C$ (S – площадь хроматографического пика, C – концентрация анилокаина в плазме, нг/мл), коэффициент корреляции R^2 составил 0.9963. Предел количественного определения анилокаина в плазме по предложенной методике – 40 нг/мл.

Таблица 1

Отклонения концентраций калибровочных стандартов от фактических значений

$C_{\text{факт.}}$, нг/мл	42	105	210	525	840	1050	1575	2100
$C_{\text{рассч.}}$, 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

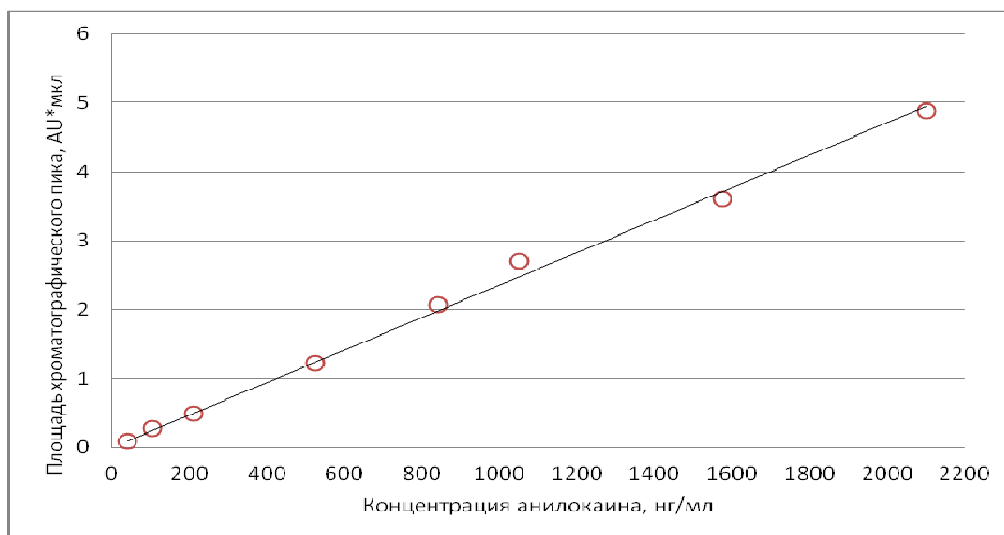


Рис.3. Зависимость площади пика от концентрации анилокаина (нг/мл) в калибровочных стандартах

Полученные отклонения концентраций калибровочных стандартов от фактических значений соответствуют современным требованиям, предъявляемым к биоаналитическим методикам [4].

Для оценки параметров методики «Прецизионность» и «Правильность» готовили по 6 модельных образцов плазмы на 5 уровнях концентраций анилокаина: 39; 117; 468; 936, 1404 нг/мл (контрольные образцы качества). Подготовку образцов для анализа осуществляли в соответствии с описанной методикой. Прецизионность и правильность методики оценивалась по величинам относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ϵ ,%) соответственно. Метрологические характеристики методики представлены в таблице 2. Полученные результаты контроля не превышают 15%, допускаемых для биоаналитических методик, что свидетельствует об отсутствии значимых систематических ошибок в результатах анализа [4].

Таблица 2

Прецизионность и правильность методики количественного определения анилокаина в плазме крови методом ВЭЖХ

Концентрация анилокаина в модельной смеси, нг/мл	Найденная концентрация (нг/мл), \bar{X} , (n = 6)	SD	RSD, %	ϵ ,%
39	40,3 (44,6; 37,9; 40,1; 34,7; 42,8; 41,8)	3,5	8,7	3,3
117	119,5 (122,4; 126,0; 107,1; 128,3; 110,9; 122,5)	8,4	7,1	2,1
468	460,4 (485,5; 451,9; 434,2; 479,9; 444,8; 466,1)	20,1	4,4	-1,6

936	906,8 (911,2; 896,4; 940,2; 903,3; 915,0; 874,9)	16,3	1,8	-3,2
1404	1387,3 (1351,6; 1298,1; 1340,1; 1464,2; 1398,9; 1470,6)	59,2	4,3	-1,2

Изучена стабильность контрольных образцов качества с концентрацией анилокаина 39 и 1404 нг/мл при замораживании/размораживании (3 цикла) и при хранении в течение 12 часов при комнатной температуре. Доказано, что величина относительной погрешности рассчитанных значений концентраций от фактических не превышает 15%.

Выводы:

1. Разработана методика количественного определения анилокаина в плазме крови методом микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием.
2. Валидационная оценка показала высокую чувствительность, точность и воспроизводимость методики.
3. Разработанная методика может быть использована для количественного определения анилокаина в плазме крови на этапе доклинических и клинических фармакокинетических исследований препаратов анилокаина.

Список литературы

1. Медведев Ю.В. ВЭЖХ и СВЭЖХ как методы для определения лекарственных веществ в крови (обзор) / Раменская Г.В., Шохин И.Е., Ярушок Т.А. // Химико-фармацевтический журнал. – 2013. – Том 47, №14. – С. 45-51.
2. 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.
3. Рейхарт Д.В. Высокочувствительные методы в оценке биоэквивалентности лекарственных препаратов (обзор) / Рейхарт Д.В., В.В. Чистяков // Химико-фармацевтический журнал. – 2009. – Том 43, №12. – С. 39-46.
4. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том III. — М.: ПОЛИГРАФ-ПЛЮС, 2014 — 344 с.
5. Сабирзянов Д.Р. Оптимизация условий пробоподготовки плазмы к хроматографическому исследованию для изучения фармакокинетики анилокаина / Сабирзянов Д.Р., Карпенко Ю.Н. // Современная фармация: образование, наука, бизнес:

сборник мат. науч.-практ. конференции с международным участием, посвящ. 50-летию фармацевтического факультета – Тюмень, 2014. – С.193-195.

б. Федорова Г.А. Применение микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии в медицине / Кожанова Л.А., Полянская Е.М. // Вестник восстановительной медицины. – 2008. – №1(23). – С. 35-41.

Рецензенты:

Малкова Т.Л., д.фарм.н., профессор, заведующий кафедрой токсикологической химии ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России, г. Пермь;

Ярыгина Т.И., д.фарм.н., профессор, профессор кафедры фармацевтической химии ФОО ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России, г. Пермь.