

В. А. Рыжикова¹, С. В. Курсаков², В. Ю. Белов^{1,2}, В. И. Севастьянов^{1, 2}

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНИЛОКАИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ВЭЖХ С УФ-ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

¹ ФГБУ "ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. ак. В. И. Шумакова" Минздрава РФ, Россия, Москва

² АНО "Институт медико-биологических исследований и технологий", Россия, Москва; e-mail: sirin76@yandex.ru

Разработана методика определения анилокаина в плазме крови крыс методом ВЭЖХ с УФ-детектированием. Пробоподготовку проводили жидкость-жидкостной экстракцией смесью 1-бутанол — гексан (2:98 об./об.) и последующей реэкстракцией 0,1 % водным раствором муравьиной кислоты. Хроматографический анализ осуществляли в изократическом режиме на колонке Nucleodur HILIC с подвижной фазой ацетонитрил — 25 мМ раствор формиата аммония (85:15) при длине волны 205 нм. Методика валидирована по следующим параметрам: специфичность, эффект переноса, линейность, прецизионность, правильность, пределы количественного определения, допустимость разбавления, стабильность. Аналитический диапазон методики составил 25 – 1000 нг/мл. Разработанная методика может быть применена для исследования фармакокинетики препаратов анилокаина.

Ключевые слова: анилокаин; ВЭЖХ; HILIC; плазма крови; валидация.

Анилокаин (**I**, торговое название – бромокаин), известный также как броманилиддиэтиламинопропановая кислота (N¹-(2-бромфенил)-N³,N³-диэтил-β-аланинамид) — местноанестезирующее лекарственное средство группы амидных анестетиков, синтезированное в Пермской государственной фармацевтической академии и включенное в Государственный реестр лекарственных средств России.

Ценным свойством **I** является выраженное поверхностно-анестезирующее действие, а также наличие противовоспалительной и умеренной противомикробной активности, чем он выгодно отличается от других местных анестетиков, применяемых в медицинской практике. По сравнению с дикаином и лидокаином **I** оказывает более длительную поверхностную анестезию, приближающуюся по силе к дикаину и превышающую ее у лидокаина; при этом **I** в 1,5 раза менее токсичен, чем лидокаин [1]. Это обстоятельство способствует разработке эффективных средств наружного применения на основе **I**, например, трансдермальных терапевтических систем.

В настоящее время известен ряд работ по определению **I** в модельных смесях [2], водных растворах [3], моче [4, 5] и крови [5].

При проведении фармакокинетических исследований в качестве основного вида биоматериала рассматриваются плазма крови или цельная кровь [6]. Известный способ определения **I** в крови [5] характеризуется значением предела обнаружения, равным 1 мкг/мл, что может оказаться недостаточным при изучении фармакокинетики таких лекарственных форм **I**, как трансдермальная терапевтическая система.

Цель данной работы заключалась в разработке и валидации методики количественного определения **I** в плазме крови, пригодной для фармакокинетических исследований и терапевтического мониторинга.

Экспериментальная часть

В работе использовали субстанцию **I**, синтезированного в ГБОУ ВПО ПГФА (Пермь, ВФС 42-2946-97), ацетонитрил (для ВЭЖХ), 1-бутанол (для хроматографии), гексан (для ВЭЖХ), аммиак водный (25 %, х.ч.), муравьиную кислоту (х.ч.), аммония формиат (х.ч.), воду (для хроматографии).

Исходный стандартный раствор **I** готовили растворением навески в ацетонитриле и хранили в биомедицинском морозильнике Sanyo MDF-U5412 (Япония) при температуре от – 34 до – 38 °С. Рабочие стандартные растворы готовили разведением исходного стандартного раствора **I** водой и хранили в фармацевтическом холодильнике Pozis XF-400 (Россия) при температуре от 2 до 8 °С.

Образцы чистой и исследуемой плазмы крови крыс хранили в биомедицинском морозильнике при температуре от – 34 до – 38 °С. Перед подготовкой образцы размораживали при комнатной температуре.

Количественное определение проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1100 (США) с диодно-матричным детектором, автосамплером и термостатом колонок. Обработку данных проводили при помощи программного обеспечения Chem Station (США).

Для пробоподготовки применяли мультитортек Multi-Vortex V32 (Латвия), центрифугу лабораторную ЕВА 20 (Германия), весы лабораторные аналитические Vibra-AF-R220CE (Япония), дозаторы переменного объема 0,5 – 10, 5 – 50, 20 – 200 и 100 – 1000 мкл (Россия).

Пробоподготовка. 500 мкл плазмы крови вносили в микроцентрифужную пробирку типа Эппендорф вместимостью 2 мл, прибавляли 15 мкл 25 % водного раствора аммиака, 1 мл смеси 1-бутанол — гексан

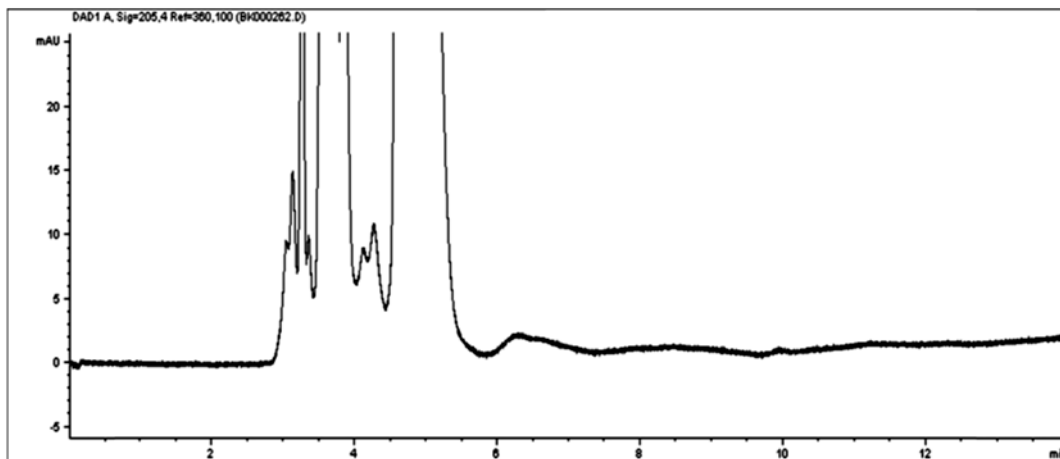


Рис. 1. Хроматограмма чистой плазмы.

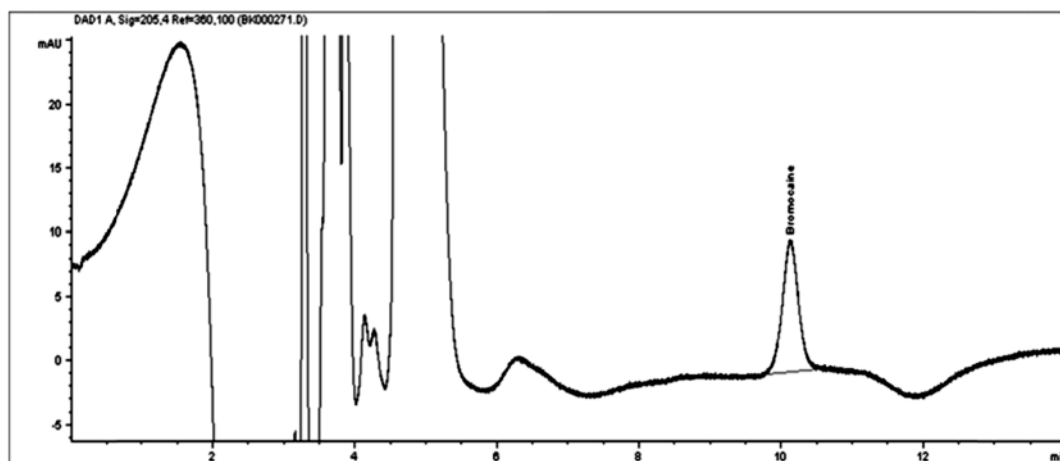


Рис. 2. Хроматограмма чистой плазмы с добавлением стандартного раствора I (250 нг/мл).

(2:98, об./об.) и перемешивали на мультивортексе при 3000 об/мин в течение 2 мин. После центрифугирования при 6000 об/мин в течение 2 мин 750 мкл верхнего органического слоя переносили в другую микроцентрифужную пробирку вместимостью 1,5 мл и прибавляли 75 мкл 0,1 % водного раствора муравьиной кислоты. Смесь перемешивали на мультивортексе в течение 2 мин и центрифугировали при 6000 об/мин в течение 2 мин.

Верхнюю органическую фазу отбрасывали, 60 мкл нижнего слоя разбавляли в 2 раза ацетонитрилом и пе-

Таблица 1
Отклонения расчетных концентраций калибровочных образцов от фактических значений

$C_{\text{факт}}$, нг/мл	$C_{\text{расчет}}$, нг/мл	ϵ , %	Норма, %, не более
25,0	22,1	- 11,5	20 %
50,0	47,4	- 5,1	15 %
100,0	92,8	- 7,2	
250,0	276,5	10,6	
500,0	517,2	3,4	
1000,0	985,7	- 1,4	

Таблица 2
Прецизионность и правильность методики количественного определения I в плазме крови крыс (inter-day)

Введено, нг/мл	Найдено, нг/мл	Найдено, нг/мл, среднее значение ($n = 5$)	RSD , % ($n = 5$)	ϵ , %
25,0	18,9	22,6	13,2	- 9,6
	22,8			
	20,5			
	24,5			
	26,3			
75,0	72,8	70,7	2,0	- 5,8
	71,2			
	70,3			
	69,8			
	69,2			
500,0	542,2	519,6	3,6	3,9
	501,7			
	527,2			
	527,9			
	498,8			
750,0	778,8	724,5	5,2	- 3,4
	689,3			
	694,4			
	712,3			
	747,5			

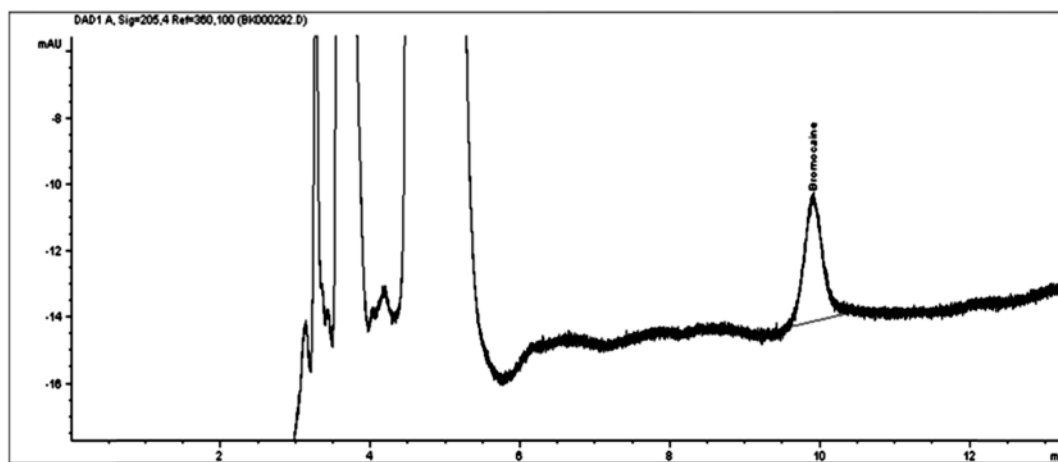


Рис. 3. Хроматограмма стандартного раствора **I** в смеси 0,1 % водный раствор муравьиной кислоты — ацетонитрил (50:50) (250 нг/мл).

ренили в стеклянную вials для ВЭЖХ с микро-вставкой вместимостью 200 мкл.

Хроматографическое разделение проводили в изократическом режиме на колонке Nucleodur HILIC 250 × 4,6 мм, 5 мкм (Германия) с предколонкой размером 8 × 4 мм, заполненной тем же сорбентом. Подвижная фаза (ПФ) — смесь ацетонитрил — 25 мМ раствор формиата аммония (85:15). ПФ предварительно фильтровали и дегазировали на устройстве для фильтрации под вакуумом. Скорость потока ПФ — 0,8 мл/мин. Температура термостата колонки — 25 °С. Детектирование проводили при длине волны 205 нм, соответствующей максимуму поглощения **I**. Объем вводимой пробы — 50 мкл. Время удерживания **I** —

около 10 мин, время хроматографирования — 16 мин. Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась в программе Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение

Валидацию методики определения **I** в плазме крови проводили на основании руководств по валидации биоаналитических методик FDA [7] и EMA [8] по следующим параметрам: специфичность, эффект переноса, линейность калибровочного графика, прецизионность и правильность, пределы количественного определения, допустимость разбавления, стабильность.

Специфичность. Для определения специфичности методики проводили анализ 6 образцов чистой плазмы, образца плазмы с добавлением стандартного раствора **I** до получения концентрации 250 нг/мл и стандартного раствора **I** в смеси 0,1 % водный раствор муравьиной кислоты — ацетонитрил (50:50) концентрацией 250 нг/мл. Соответствующие хроматограммы приведены на рис. 1 – 3.

На всех хроматограммах образцов чистой плазмы не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания **I**.

Эффект переноса изучали при последовательном хроматографировании образца чистой плазмы после образца плазмы с содержанием **I** 1000 нг/мл. Отсутствие пика **I** на хроматограмме холостого образца доказывает отсутствие эффекта переноса.

Таблица 3
Прецизионность и правильность методики количественного определения **I** в плазме крови крыс (intra-day)

Введено, нг/мл	Найдено, нг/мл	Найдено, нг/мл, среднее значение (n = 5)	RSD, % (n = 5)	ε, %
25,0	19,6	21,6	8,5	-13,7
	22,9			
	23,8			
	19,9			
	21,7			
75,0	71,5	70,8	3,2	-5,6
	67,7			
	69,2			
	72,9			
	72,6			
500,0	537,1	516,8	2,8	3,4
	517,5			
	505,8			
	500,9			
	506,7			
750,0	717,4	744,3	2,7	-0,8
	748,5			
	732,9			
	768,4			
	754,4			

Таблица 4
Прецизионность и правильность определения **I** в плазме после разбавления

Введено, нг/мл	Найдено, нг/мл	Найдено (среднее значение), нг/мл (n = 5)	RSD, % (n = 5)	ε, %
500,0	534,8	515,7	4,1	3,2
	522,3			
	479,5			
	518,6			
	523,5			

Линейность. Проводили анализ 6 образцов плазмы с добавлением стандартного раствора **I** до получения концентраций: 25, 50, 100, 250, 500, 1000 нг/мл. Кроме того, проводили анализ образца чистой плазмы.

Калибровочный график зависимости площади пика **I** от его концентрации в плазме крови представлен на рис. 4. Коэффициенты регрессионного уравнения калибровочной прямой $S = aC + b$ имели значения: $a = 0,585$, $b = 7,461$; коэффициент корреляции $R = 0,9991$.

Для оценки приемлемости линейности в уравнение калибровочной кривой подставляли средние значения площадей пиков калибровочных образцов и рассчитывали отклонения полученных значений концентраций от фактических ϵ (табл. 1).

Полученные значения отклонений соответствуют нормам FDA и EMA [7, 8].

Прецизионность и правильность методики определяли на одних и тех же пробах на 2 уровнях — inter-day (в течение 1 рабочего дня) и intra-day (в течение нескольких рабочих дней) [7, 8]. Для этого проводили анализ 4 образцов плазмы, к каждому из которых предварительно прибавляли стандартный раствор **I** до получения концентраций: 25, 75, 500 и 750 нг/мл.

Каждую пробу хроматографировали 5 раз, определяли по калибровочной кривой концентрации **I** и рассчитывали величины относительного стандартного отклонения (*RSD*) и относительной погрешности (ϵ), характеризующие соответственно прецизионность и правильность методики (табл. 2, 3).

Полученные величины относительного стандартного отклонения и относительной погрешности соответствуют нормам [7, 8]: не более 20 % для минимальной концентрации, не более 15 % для остальных концентраций.

Пределы количественного определения (ПКО) методики оценивали на основании данных линейности, прецизионности и правильности. За нижний ПКО методики принимали минимальную концентрацию **I** в плазме, для которой величины относительного стан-

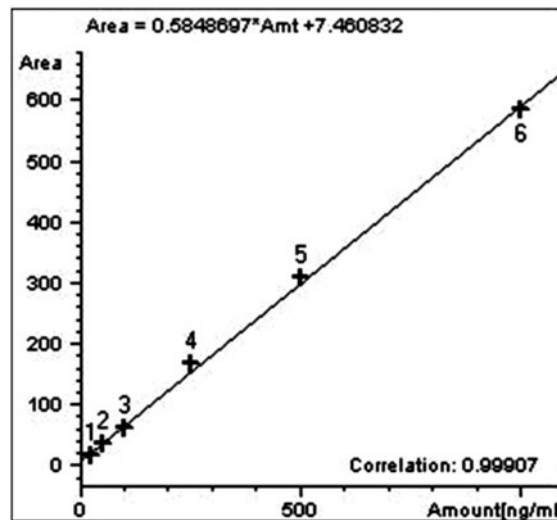


Рис. 4. Калибровочный график зависимости площади пика **I** от его концентрации в плазме.

дартного отклонения и относительной погрешности не превышают 20 % на уровнях inter-day и intra-day [7, 8]. Нижний предел количественного определения методики составил 25 нг/мл при отношении сигнал/шум, равном 6.

Хроматограмма, демонстрирующая нижний ПКО методики, приведена на рис. 5.

Верхний предел количественного определения **I**, которому соответствует верхняя точка линейного диапазона калибровочной кривой, равен 1000 нг/мл.

Допустимость разбавления. В образец чистой плазмы добавляли стандартный раствор **I** до получения концентрации 5 мкг/мл. Приготовленную пробу разбавляли чистой плазмой до концентрации 500 нг/мл и хроматографировали 5 раз. По результатам анализа рассчитаны величины относительного стандартного отклонения и относительной погрешности определения концентрации **I** (табл. 4).

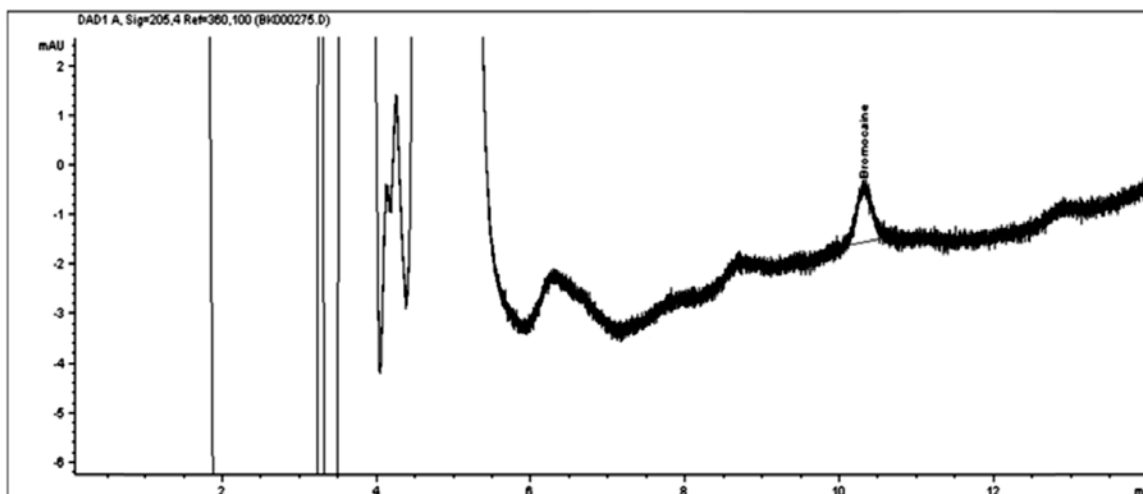


Рис. 5. Хроматограмма плазмы крови с содержанием **I** 25 нг/мл.

Полученные величины *RSD* и ε не превышают 15 %, что соответствует требованиям FDA и ЕМА [7, 8].

Стабильность. Было проведено испытание следующих видов стабильности:

1) стабильность исходного стандартного раствора **I** при хранении в течение 1 мес при температуре от – 34 до – 38 °С;

2) стабильность рабочего стандартного раствора **I** при хранении в течение 1 недели при температуре 2 – 8 °С;

3) стабильность **I** в плазме крови после 3 циклов заморозки и разморозки;

4) длительная стабильность **I** в плазме крови при хранении в морозильнике (от – 34 до – 38 °С) в течение 1 мес;

5) кратковременная стабильность **I** в плазме крови при хранении в холодильнике (2 – 8 °С) в течение 4 ч;

6) кратковременная стабильность приготовленных проб при хранении в холодильнике (2 – 8 °С) в течение 4 ч;

7) стабильность приготовленных проб при хранении в автосамплере в течение 4 ч.

Стабильность исходного и рабочего растворов **I** определяли после соответствующего разбавления до концентрации 500 нг/мл.

Для определения других видов стабильности проводили анализ 3 проб плазмы крови, к каждой из которых предварительно прибавляли стандартный раствор **I** до получения концентраций 50 и 1000 нг/мл.

Относительная погрешность концентраций **I** после хранения не превышала 15 % по сравнению с фактическими значениями.

Таким образом, разработана методика количественного определения **I** в плазме крови методом ВЭЖХ с УФ-детектированием на колонке HILIC. Аналитический диапазон методики составил 25 – 1000 нг/мл. Валидация методики подтвердила соответствие ее характеристик (специфичность, эффект переноса, линейность, пределы количественного определения, прецизионность и правильность, допустимость разбавления, стабильность) установленным требованиям.

Разработанная методика может быть применена для фармакокинетических исследований препаратов **I**.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н. А. Горнова, С. В. Чащина, В. И. Панцуркин, *Тез. докл. межвуз. науч.-практ. конф.*, Пермь (2000), сс. 39 – 40.
2. Е. Е. Столяров, Т. Л. Малкова, М. С. Гайсинович и др., *Проблемы экспертизы в медицине*, № 3, 25 – 27 (2004).
3. В. А. Рыжикова, А. А. Тихобаева, Л. А. Саломатина и др., *Перспективные материалы*, № 2, 26 – 32 (2014).
4. А. А. Поспелова, Т. Л. Малкова, Л. Н. Карпова, *Биомед. ж.*, **13**, 94 – 102 (2012).
5. Е. Е. Столяров, Ю. Н. Карпенко, Т. Л. Малкова, *Суд.-мед. экспертиза*, № 3, 24 – 27 (2009).
6. А. Н. Миронов (ред.), *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, Ч. 1, Гриф и К, Москва (2012), с. 844.
7. *Guidance for Industry. Bioanalytical method validation*, Washington (2013).
8. *Guideline on bioanalytical method validation*, London (2011).

Поступила 20.05.15

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF HPLC-UV METHOD FOR ANILOCAINE DETERMINATION IN BLOOD PLASMA

V. A. Ryzhikova¹, S. V. Kursakov², V. Yu. Belov^{1,2}, and V. I. Sevast'yanov^{1,2}

¹ V. I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 123182 Russia

² Institute of Biomedical Research and Technology, Moscow, 123557 Russia

A method for anilocaine determination in the blood plasma of rat using HPLC with UV detection has been developed. Sample preparation was performed by liquid – liquid extraction with 1-butanol – hexane mixture (2 : 98 v/v) and subsequent stripping with 0.1% aqueous solution of formic acid. The chromatographic analysis was performed on isocratic Nucleodur HILIC column eluted with a mobile phase of acetonitrile – 25 mM ammonium formate solution (85 : 15) with UV detection at a wavelength of 205 nm. The method was validated according to the following parameters: selectivity, carry-over, calibration curve, precision and accuracy, limit of quantification, dilution integrity, and stability. The analytical range was 25.0 – 1000.0 ng/mL. The proposed method can be applied to studying the pharmacokinetics of anilocaine preparations.

Keywords: anilocaine; HPLC-UV; HILIC column; blood plasma; method validation.