

УДК 543.544.5:615.211:547 – 327

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОСТОРОННИХ ПРИМЕСЕЙ В СУБСТАНЦИИ АНИЛОКАИНА МЕТОДОМ ВЭЖХ

Д.Р. Сабирзянов., Ю.Н. Карпенко, Т.Л. Малкова, И.В. Алексеева

ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия»  
Минздрава России, 614990, Россия, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2  
E-mail: perm@pfa.ru

Анилокаин – местный анестетик из группы замещенных амидов, синтезированный в Пермской государственной фармацевтической академии. Анилокаин проявляет высокую поверхностноанестезирующую, инфильтрационную и проводниковую анестезию и показывает высокую эффективность в различных областях медицинской практики. Качество производимых лекарственных средств напрямую зависит от качества фармацевтических субстанций. Одним из важнейших параметров доброкачественности фармацевтических субстанций является их чистота. **Целью** настоящей работы явилась разработка и валидация методики определения специфических примесей в субстанции анилокаина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). **Материалы и методы.** Исследования проведены на жидкостном хроматографе «LC-20 Prominence» («Shimadzu», Япония), оснащенном диодноматричным детектором (SPD-M20A). Хроматографическая колонка – «Zorbax SB-C18» (4,6 мм × 250 мм, 5 мкм). Валидационная оценка разработанной методики проведена в соответствии с требованиями ГФ XIII и международными требованиями ICH (International Conference on Harmonization). **Результаты и обсуждение.** Эксперимент по выбору условий хроматографирования показал, что оптимальное разделение анилокаина и возможных примесей (как идентифицированных, так и неидентифицированных) методом обращенно-фазной ВЭЖХ наблюдается в изократическом режиме при использовании элюента на основе фосфатного буфера с pH 3 и ацетонитрила. Скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин, длина волны детектирования 210 нм. Время регистрации хроматограммы – 20 минут. **Заключение.** В результате проведенных исследований, разработана методика количественного определения примесей в субстанции анилокаина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Проведенная процедура валидации аналитической методики установила ее специфичность, линейность, воспроизводимость и правильность. Данная методика включена в проект фармакопейной статьи на субстанцию анилокаина.

**Ключевые слова:** анилокаин, 2-броманилин, N-(2-бромфенил)акриламид, высокоэффективная жидкостная хроматография, посторонние примеси, валидация

## DETERMINATION OF RELATED IMPURITIES IN THE ANILOCAINE SUBSTANCE BY HPLC METHOD

D.R. Sabirzyanov, Yu.N. Karpenko, T.L. Malkova, I.V. Alekseeva

Perm State Pharmaceutical Academy  
2, Polevaya st., Perm, 614990, Russia  
E-mail: perm@pfa.ru

Anilocaine is a local anesthetic from the group of substituted amides, synthesized in the Perm State Pharmaceutical Academy. Anilocaine shows high surface anesthetic, infiltration and conduction anesthesia and shows the high efficiency in the various fields of medical practice. The quality of produced medicines depends on the quality of pharmaceutical substances. The purity is one of the most important parameters of the quality of pharmaceutical substances. **The aim** of this work was the development and validation of methods for identification of specific impurities in the substance of anilocaine by high-performance liquid chromatography (HPLC). **Materials and methods.** Studies were performed on liquid chromatography LC-20 Prominence (Shimadzu, Japan) equipped with a diode-array detector

### Для цитирования:

Сабирзянов Д.Р., Карпенко Ю.Н., Малкова Т.Л., Алексеева И. В. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОСТОРОННИХ ПРИМЕСЕЙ В СУБСТАНЦИИ АНИЛОКАИНА МЕТОДОМ ВЭЖХ. Фармация и фармакология. 2017;5(3):254-266. DOI:10.19163/2307-9266-2017-5-3-254-266

### For citation:

Sabirzyanov D.R., Karpenko Yu.N., Malkova T.L., Alekseeva I.V. DETERMINATION OF RELATED IMPURITIES IN THE ANILOCAINE SUBSTANCE BY HPLC METHOD. Pharmacy & Pharmacology. 2017;5(3):254-266. (In Russ.) DOI:10.19163/2307-9266-2017-5-3-254-266

(SPD-M20A). Chromatographic column was Zorbax SB-C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). Validation assessment of the developed method conducted in accordance with the requirements of FP XIII and international requirements ICH (International Conference on Harmonization). **Results and discussion.** An experiment on the selection of the conditions of chromatographically showed that optimal separation of anilocaine and possible impurities (identified and unidentified) by the method of reversed-phase HPLC is observed in isocratic mode, using an eluent based on phosphate buffer pH 3 and acetonitrile. The flow rate of mobile phase is 1 ml/min; wavelength detection is 210 nm. Time check chromatogram is 20 minutes. **Conclusion.** The method for the quantitative determination of impurities in the substance of anilocaine by high-performance liquid chromatography was developed as the result of the research. The validation procedure of the analytical methods established its specificity, linearity, precision and accuracy. This method is included in the project monograph on substance of anilocaine.

**Keywords:** anilocaine, 2-bromoaniline, N-(2-bromophenyl)acrylamide, high-performance liquid chromatography, related impurities, validation

**Введение.** Создание отечественных высокоэффективных лекарственных препаратов – одна из важнейших задач российского здравоохранения. В Пермской государственной фармацевтической академии синтезирован и совместно с ИТХ УрО РАН доведен до медицинского применения

местный анестетик из группы замещенных амидов – анилокаин (2-броманилид-3-диэтиламинопропановой кислоты гидрохлорид) (рис.1), проявляющий высокую поверхностноанестезирующую, инфильтрационную и проводниковую анестезию [1].

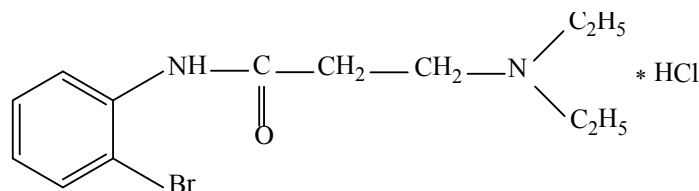


Рисунок 1 – Структурная формула анилокаина

Структурные аналоги анилокаина – лидокаин и тримекаин, давно использующиеся в медицинской практике, значительно уступают ему по выраженности поверхностноанестезирующего и антиаритмического действия [2]. Кроме того, лидокаин обладает высокой токсичностью, что обуславливает развитие различных осложнений при его применении [3]. Клинические исследования анилокаина доказали его высокую эффективность в различных областях медицины: хирургии, эндоскопии, стоматологии и т.д. [4]. 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 «Анилкам», гель «Анилогель» для использования при проведении инструментальных вмешательств [5], суппозитории, пленки лекарственные [6], аэрозоль для обезболивания в ветеринарии.

Одним из важнейших параметров доброкачественности фармацевтических субстанций является их чистота. На основании ранее проведенных исследований установлены направления распада молекулы анилокаина: 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. Структура непредельного соединения – N-(2-бромфенил)акриламида подтверждена данными элементного анализа и масс-спектрометрии. В сильноокислой среде происходит полное гидролитическое расщепление по амидной связи с выделением 2-броманилина.

Таким образом, специфическими примесями в субстанции могут являться N-(2-бромфенил)акриламид (продукт деструкции анилокаина) и 2-броманилин (как исходный продукт при синтезе и как продукт гидролитического расщепления анилокаина) (рис.2) [7].

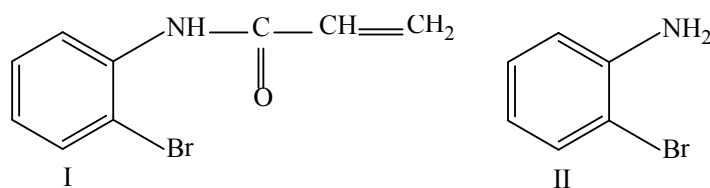


Рисунок 2 – Структурные формулы N-(2-бромфенил)акриламида (I) и 2-броманилина (II)

Временная фармакопейная статья (ВФС) на субстанцию анилокаина регламентирует определение

посторонних примесей методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) в системе н-бутанол – этилацетат

– хлороформ – аммиака раствор концентрированный (20:20:10:0,5). В качестве детектора используются пары йода. Суммарное содержание посторонних 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% [8].

Поскольку ТСХ является полуколичественным тестом, более предпочтительным в плане точности и специфичности для определения посторонних примесей является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии [9].

**Целью** настоящей работы является разработка и валидация методики определения специфических посторонних примесей в субстанции анилокаина методом ВЭЖХ для дальнейшего ее включения в проект фармакопейной статьи предприятия.

**Материалы и методы.** В качестве объектов исследования использовали фармацевтическую субстанцию анилокаина (ВФС 42-2946-97), 2-броманилин («Sigma-Aldrich»), N-(2-бромфенил)акриламид (синтез вещества осуществлен по методике [5], хроматографическая чистота не менее 99%).

Исследования проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Shimadzu LC-20 Prominence» (Япония), оснащенном диодноматричным детектором (SPD-M20A). Хроматографическая колонка – «Zorbax SB-C18» (4,6 мм × 250 мм, 5 мкм).

Регистрацию и обработку хроматографической информации осуществляли с помощью программного обеспечения «LCsolution» (ver.1,25).

Для приготовления элюентов использовали калия дигидрофосфат, фосфорную кислоту концентрированную, воду бидистиллированную, ацетонитрил (Криохром®, сорт 0). Значения pH подвижных фаз контролировали с помощью pH-метра «S400 SevenExcellence» («METTLER TOLEDO»).

**Результаты и обсуждение.** Эксперимент по выбору условий хроматографирования показал, что оптимальное разделение анилокаина и возможных

примесей (как идентифицированных, так и неидентифицированных) методом обращенно-фазовой ВЭЖХ наблюдается в изократическом режиме при использовании фосфатного буфера с pH 3 со скоростью потока 1 мл/мин. Детектирование проводили при длине волны 210 нм. Время регистрации хроматограммы – 20 минут [7].

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.

На основании ранее полученных данных о содержании специфических примесей в серийных образцах субстанции, а также биологических испытаний при оценке безопасности примесей предложено нормировать содержание 2-броманилина – не более 0,01%; N-(2-бромфенил)акриламида – не более 0,1%; единичной неидентифицированной примеси – не более 0,1%; общего содержания примесей – не более 0,5% [7, 10].

Валидацию аналитической методики проводили по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность, повторяемость, предел обнаружения и предел количественного определения в соответствии с современными требованиями [11, 12].

При подтверждении специфичности методики анализировали раствор модельной смеси субстанции анилокаина (4000 мкг/мл) и возможных примесей: N-(2-бромфенил)акриламида (4 мкг/мл) и 2-броманилина (0,4 мкг/мл) в метаноле (рис.3).

Выбранные хроматографические условия характеризуются высокой эффективностью (не менее 8000 ГТ), достаточной разрешающей способностью и воспроизводимостью. Рассчитанные критерии пригодности хроматографической системы удовлетворяют принятым критериям приемлемости (таблица 1).

**Таблица 1 – Оценка пригодности хроматографической системы**

	Время удерживания, мин	Коэффициент разделения (Rs)	Коэффициент асимметрии пика	Воспроизводимость инъекций (RSD)
Анилокаин	3,20±0,02	–	–	–
Неидентифицированная примесь (I)	6,22±0,02	6,15	1,35	1,05
N-(2-бромфенил)акриламид(II)	8,80±0,02	7,84	1,51	0,87
2-броманилин (III)	11,30±0,03	6,40	1,24	0,52
Более 2	Критерии приемлемости			
	0.75 – 2.5		Менее 5	

Линейность определяли на 7 уровнях концентраций: от 0,02% до 0,4% – для N-(2-бромфенил)акриламида, от 0,0014% до 0,044% – 2-броманилина (таблица 2). Каждый из приготовленных растворов хроматографировали 3 раза. Калибровочные

графики представлены на рис.4–5. Коэффициент корреляции в обоих случаях составил не менее 0,999, что свидетельствует о линейности методики в выбранном диапазоне концентраций.

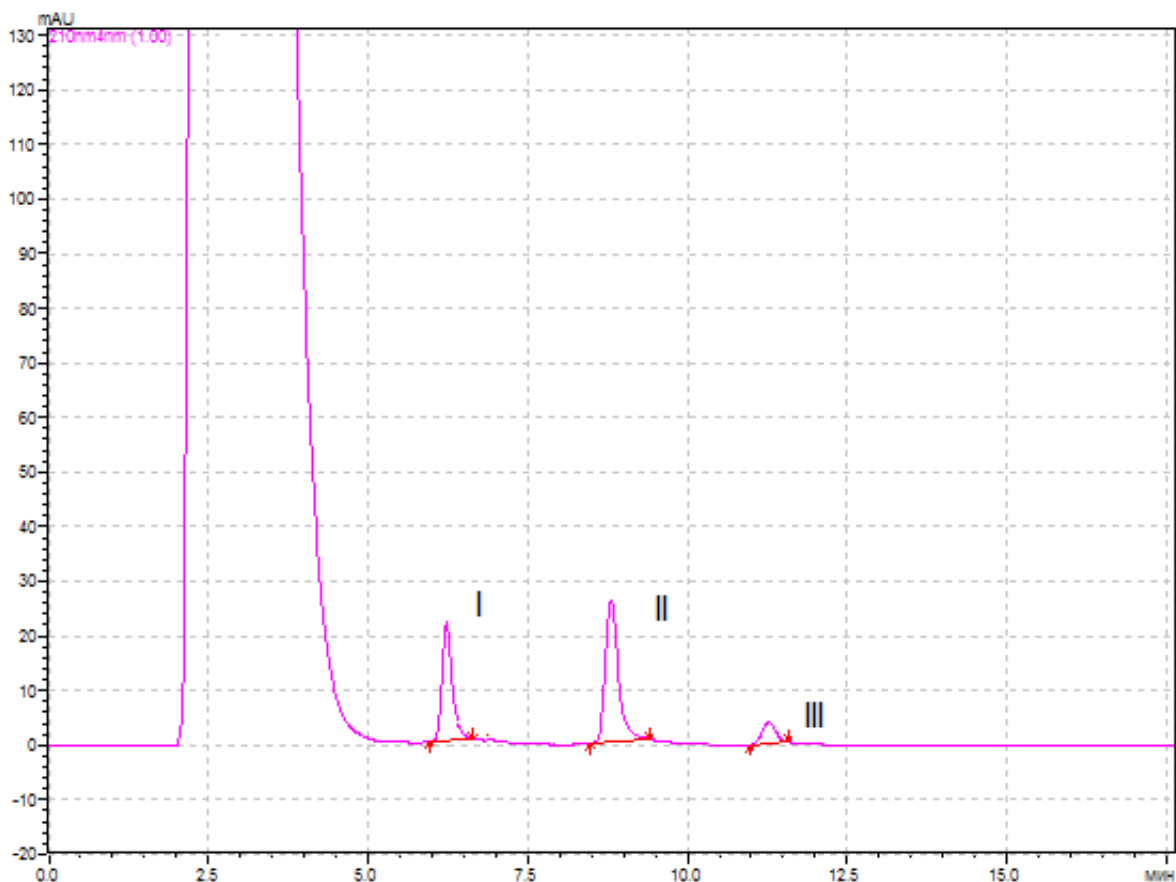


Рисунок 3 – Хроматограмма модельной смеси анилокаина, N-(2-бромфенил)акриламида (II) и 2-броманилина (III) (I – неидентифицированная примесь)

Таблица 2 – Определение линейности аналитической методики

N-(2-бромфенил)акриламид			2-броманилин		
Концентрация, мкг/мл	Концентрация, % от содержания анилокаина	Средняя площадь пика (n=3)	Концентрация, мкг/мл	Концентрация, % от содержания анилокаина	Средняя площадь пика (n=3)
0,85	0,0213	95188	0,055	0,00138	7794
1,7	0,0425	18576	0,11	0,00275	13598
3,41	0,085	362138	0,22	0,0055	26865
5,12	0,128	573289	0,33	0,0083	42907
6,82	0,171	753534	0,44	0,011	57927
10,22	0,255	1164350	0,88	0,022	116526
17,04	0,426	1905517	1,76	0,044	227928
Уравнение регрессии ( $Y = aX + b$ ) $a = 112011,7; b = 0,0$ Коэффициент корреляции: 0,9998136			Уравнение регрессии ( $Y = aX + b$ ) $a = 130047,7; b = 0,0$ Коэффициент корреляции: 0,9998507		

Повторяемость (сходимость) валидируемой методики оценивали при анализе модельных смесей субстанции анилокаина 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 разработан-

ной методикой 3 раза. Результаты проведенного эксперимента представлены в таблицах 3-4. Установлено, что относительное стандартное отклонение (RSD) результатов измерений не превышает 10%, что свидетельствует об их удовлетворительной сходимости на всех уровнях рассмотренных концентраций.

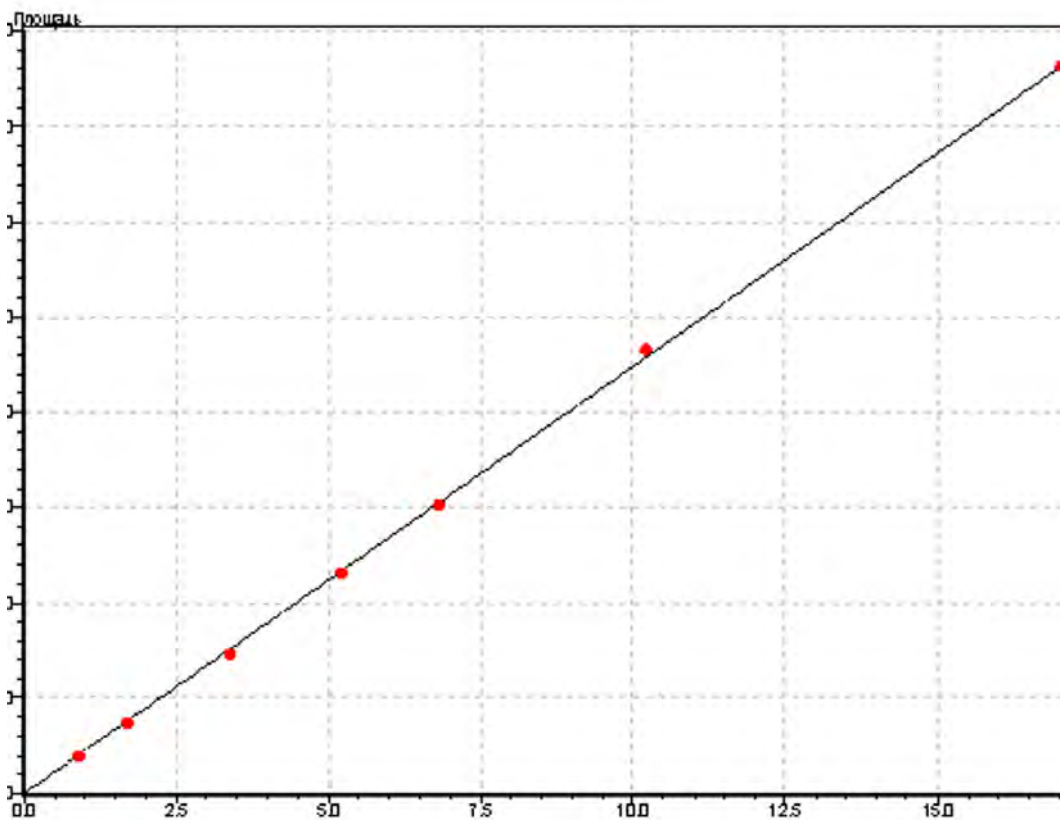


Рисунок 4 – Зависимость площади хроматографического пика от концентрации N-(2-бромфенил)акриламида

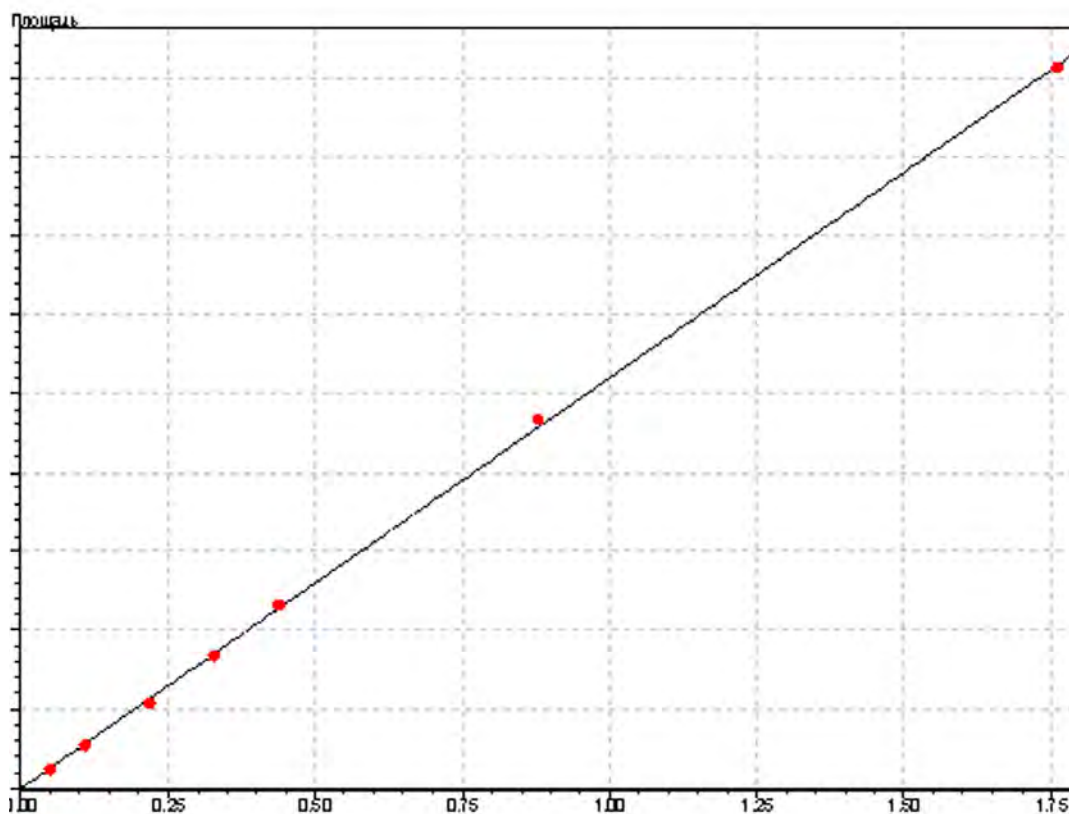


Рисунок 5 – Зависимость площади хроматографического пика от концентрации 2-броманилина

**Таблица 3 – Оценка повторяемости (сходимости) определения N-(2-бромфенил)акриламида**

Содержание N-(2-бромфенил)акриламида в растворе, мкг/мл	Найденное содержание N-(2-бромфенил)акриламида, мкг/мл	Метрологические характеристики (n=6; P=0,95)				
		n	$\bar{X}$	SD	RSD	$\Delta \bar{X}$
1,96 (0,049%)	2,11; 1,87; 2,07; 1,79; 1,91; 2,20	6	1,99	0,128	6,44	0,13
3,92 (0,098%)	3,83; 3,74; 3,99; 4,21; 3,69; 4,16	6	3,94	0,194	4,92	0,20
5,88 (0,147%)	6,08; 6,19; 5,91; 6,11; 5,82; 5,74	6	5,98	0,142	2,37	0,15

**Таблица 4 – Оценка повторяемости (сходимости) определения 2-броманилина**

Содержание 2-броманилина в растворе, мкг/мл	Найденное содержание 2-броманилина, мкг/мл	Метрологические характеристики (n=6; P=0,95)				
		n	$\bar{X}$	SD	RSD	$\Delta \bar{X}$
0,212 (0,0053%)	0,229; 0,216; 0,195; 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	0,034
0,636 (0,0159%)	0,711; 0,632; 0,619; 0,606; 0,754; 0,698	6	0,670	0,0581	8,67	0,061

Правильность методики оценивали с помощью тестирования открываемости определяемых примесей, введенных в плацебо (субстанцию анилокаина). Исследования проводили на трех уровнях концентраций примесей (таблицы 5–6). Границы открываемости (2-бромфенил)акриламида и 2-броманилина

с учетом доверительного интервала не выходят за нормируемые пределы (75–125% – для примесей с содержанием от 0,1% до 1%; 50–150% – с содержанием менее 0,1%), что свидетельствует о правильности методики.

**Таблица 5 – Оценка правильности определения N-(2-бромфенил)акриламида**

Содержание N-(2-бромфенил)акриламида	Открываемость (R), %	Метрологические характеристики (n=6; P=0,95)				
		n	$\bar{R}$	SD	RSD	$\Delta \bar{R}$
0,05%	94,15; 104,30; 88,18; 90,52; 107,29; 104,33	6	98,13	7,68	7,83	8,21
0,1%	104,72; 96,22; 100,90; 93,71; 108,64; 94,18	6	99,73	5,55	5,57	5,82
0,15%	97,30; 101,17; 104,62; 99,59; 106,16; 95,76	6	100,77	3,39	3,36	3,56

**Таблица 6 – Оценка правильности определения 2-броманилина**

Содержание 2-броманилина	Открываемость (R), %	Метрологические характеристики (n=6; P=0,95)				
		n	$\bar{R}$	SD	RSD	$\Delta \bar{R}$
0,005%	107,2; 98,23; 104,26; 96,30; 92,05; 108,19	6	101,04	5,65	5,59	5,93
0,01%	99,59; 106,82; 114,34; 95,02; 108,37; 97,17	6	103,55	6,91	6,67	7,25
0,015%	105,36; 96,01; 101,25; 115,35; 94,96; 106,03	6	103,16	7,42	7,19	7,78

Предел обнаружения для 2-броманилина по тестируемой методике составил 0,015 мкг/мл (0,000375%

от содержания анилокаина), для N-(2-бромфенил)акриламида – 0,1 мкг/мл (0,0025%).

Предел количественного определения 2-броманилина – 0,06 мкг/мл (0,0014% от содержания анилокаина), для N-(2-бромфенил)акриламида – 0,85 мкг/мл (0,02%).

**Заключение.** Таким образом, разработана методика количественного определения примесей в суб-

станции анилокаина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Проведенная процедура валидации аналитической методики установила ее специфичность, линейность, воспроизводимость и правильность. Данная методика включена в проект фармакопейной статьи на субстанцию анилокаина.

**Introduction.** The creation of highly efficient national medicines is one of the most important tasks of the Russian healthcare. In the Perm State Pharmaceutical Academy was synthesized and, together with ITC UB RAS, brought to medical use a

local anesthetic from the group of substituted amides – anilocaine (2-bromanilid-3-diethylaminopropanoic acid hydrochloride) (Fig. 1), which is showing the high surface anesthetic, infiltration and conduction anesthesia [1].

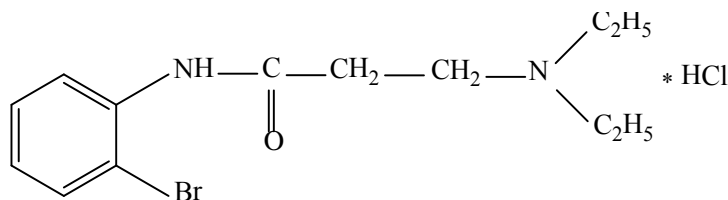


Figure 1 – Structural formula of anilocaine

Structural analogues of anilocaine lidocaine and trimecaine that have been for a long time used in medical practice, are greatly inferior to him in terms of the severity of surface anesthetic and antiarrhythmic action [2]. In addition, lidocaine has a high toxicity that causes the development of various complications during its application [3]. Clinical studies of anilocaine proved its high efficiency in the various areas of medicine: surgery, endoscopy, dentistry and other areas of medical practice [4]. Several dosage forms of anilocaine (solutions for injections, solutions for external use, dressings) brought to medical use. With prospect of implementation in the medical and veterinary practice, other drugs have been developed for external use: ointment “Anilcam” gel “Anilogel” for use during the instrumental interventions [5], suppositories, films drug [6], spray for anesthesia in the veterinary medicine.

The purity is one of the most important parameters

of quality of pharmaceutical substances. On the basis of previous studies hydrolysis of the amide link and the reaction of  $\beta$ -elimination are the main directions of degradation of the anilocaine molecules. The process of  $\beta$ -elimination prevails in neutral and slightly alkaline medium, accompanied by the allocation of an unsaturated compound and diethylamine. Along with this, partial hydrolysis takes place along the amide link. The structure of unsaturated compound N-(2-bromophenyl)acrylamide is confirmed by the data of elementary analysis and mass spectrometry. In the strong acidic medium, complete hydrolytic cleavage takes place along the amide link with the liberation of 2-bromoaniline.

Thus, the specific impurities in the substance can be N-(2-bromophenyl) acrylamide (the product of destruction of anilocaine) and 2-bromoaniline (as a starting material in the synthesis and as a product of hydrolytic cleavage of anilocaine) [7] (fig. 2).

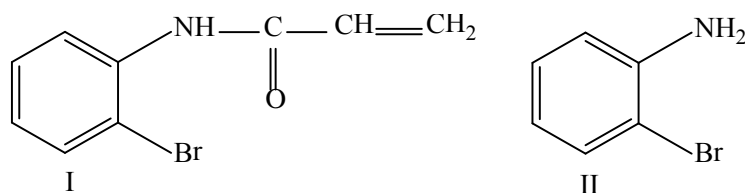


Figure 2 – Structural formulas of N-(2-bromophenyl)acrylamide (I) and 2-bromoaniline (II)

The Temporary Pharmacopoeia article (TPA) for the anilocaine substance regulates the determination of the foreign impurities by thin layer chromatography (TLC) in a n-butanol-ethylacetate-chloroform-ammonia solution, a concentrated solution (20:20:10:0.5). An iodine vapour is used as a detector. The total content of the foreign impurities estimated by the combination of the size and color intensity of their spots on the chromatogram of the test solution (2% solution of anilocaine in chloroform), in comparison with the spots on the witness

chromatograms (0,01% anilocaine solution) should not exceed 0,5% [8].

Since TLC is a semi-quantitative test, the method of high-performance liquid chromatography is more preferable in terms of accuracy and specificity for determining impurities [9].

**The aim** of this work is the development and validation of the procedure for the determination of the specific foreign impurities in anilocaine substance by HPLC for its further inclusion in the draft pharmacopoeia article of the enterprise.

**Materials and methods.** The pharmaceutical substance of anilocaine (TPA 42-2946-97), 2-bromoaniline (Sigma-Aldrich), N-(2-bromophenyl) acrylamide (the substance was synthesized according to the procedure of [5], the chromatographic purity is not less than 99%).

The studies were performed on a high-performance liquid chromatography Shimadzu LC-20 Prominence (Japan) equipped with a diode array detector (SPD-M20A). The chromatographic column was Zorbax SB-C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm).

Registration and processing of chromatographic information was carried out with the use of the LCsolution software (ver.1.25).

Potassium dihydrogen phosphate, concentrated phosphoric acid, doubly distilled water, and acetonitrile (Criochrome®, grade 0) were used for the preparation of eluents. The pH values of the mobile phases were monitored using a pH meter S400 SevenExcellence (METTLER TOLEDO).

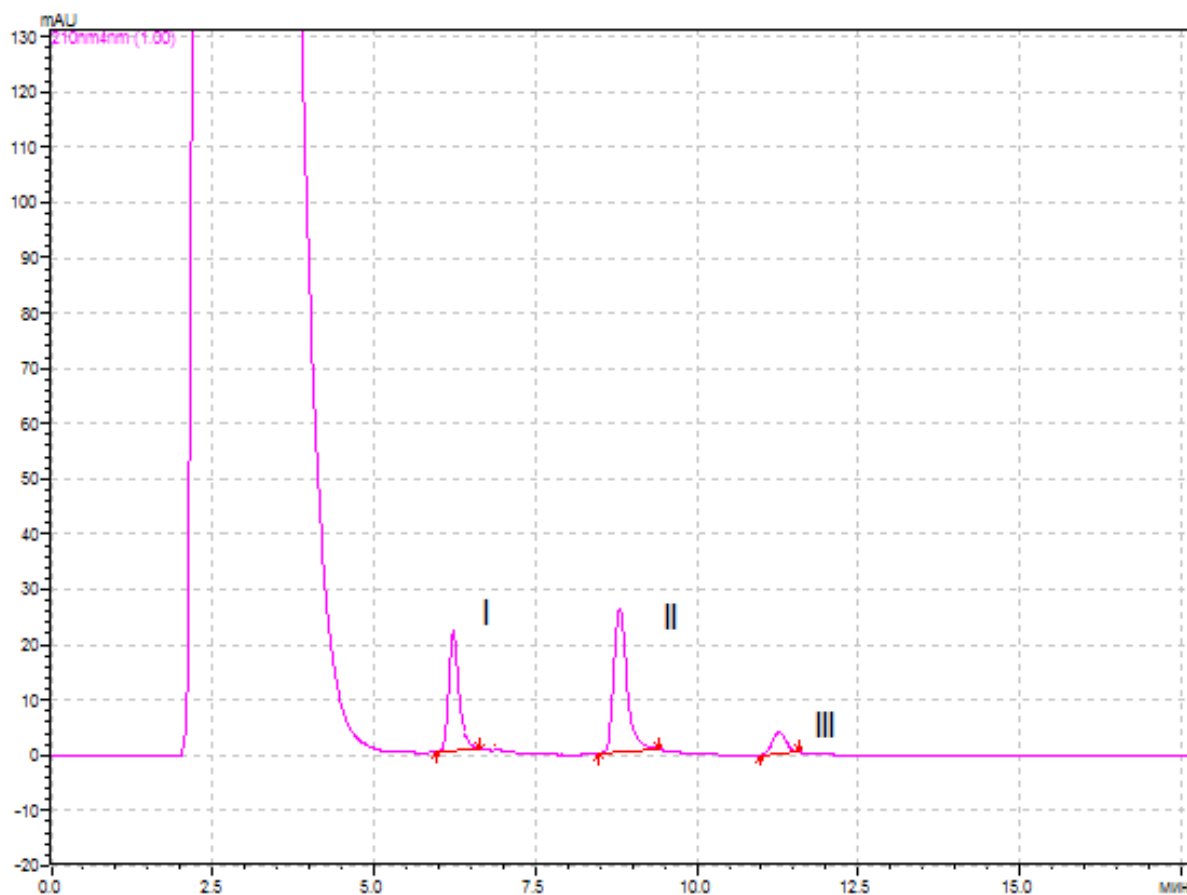
**Results and discussion.** The experiment on the choice of chromatographic conditions showed that the most optimal separation of anilocaine and possible impurities (both identified and unidentified) by reversed-phase HPLC was observed in the isocratic mode when phosphate buffer with pH 3 at a flow rate of 1 ml/min was used. Detection was carried out at a wavelength of 210 nm. The chromatogram registration time is 20 minutes [7].

To determine the possible impurities, 0,1 g of anilocaine substance was placed in a 25 ml volumetric flask and brought to the mark with methanol (test solution). 20 μl of the solution was injected into the chromatograph injector. Identification and quantitative determination of the identified impurities were carried out by using standard solutions of N-(2-bromophenyl) acrylamide and 2-bromoaniline.

Based on previously obtained data on the content of specific impurities in serial samples of the substance, as well as the biological tests in assessing the safety of impurities, it was suggested to normalize the content of 2-bromoaniline – not more than 0,01%; N-(2-bromophenyl)acrylamide – not more than 0,1%; with single unidentified impurity – not more than 0,1; total content of impurities – no more than 0,5% [7, 10].

The validation of the analytical technique was carried out according to the following characteristics: specificity, linearity, accuracy, precision, detection limit, and quantification limit in accordance with the modern requirements [11, 12].

During confirmation of the specificity of the procedure, we analyzed a solution of a model mixture of anilocaine substance (4000 μg / ml) and possible impurities: N-(2-bromophenyl)acrylamide (4 μg / ml) and 2-bromoaniline (0,4 μg / ml) in methanol (fig. 3).



**Figure 3 – Chromatogram of the model mixture of anilocaine, N-(2-bromophenyl)acrylamide (II) and 2-bromoaniline (III) (I is an unidentified impurity)**



The selected chromatographic conditions are characterized by high efficiency (not less than 8,000 TT), sufficient resolving power and reproducibility.

The calculated criteria for the suitability of the chromatographic system has satisfied the accepted acceptance criteria (Table 2).

**Table 1 – Evaluation of the suitability of the chromatographic system**

	Retention time, min.	Partition coefficient (Rs)	Coefficient of peak asymmetry	Reproducibility of injections (RSD)
Anilocaine	3.20±0.02	-	-	-
Unidentified impurity (I)	6.22±0.02	6.15	1.35	1.05
N-(2-bromophenyl) acrylamide (II)	8,80±0,02	7.84	1.51	0.87
2-bromoaniline (III)	11,30±0,03	6.40	1.24	0.52
More than 2	Eligibility criteria:			
	0.75 – 2.5	Less than 5		

Linearity was determined at 7 concentration levels: 0.02% to 0.4% for N-(2-bromophenyl) acrylamide, 0.0014% to 0.044% – 2-bromoaniline (Table 2). Each of the prepared solutions was chromatographed 3 times. The

calibration curves are shown in Fig. 4-5. The correlation coefficient in both cases was not less than 0,999, which indicates the linearity of the technique in the selected concentration range.

**Table 2 – Determination of the linearity of the analytical procedure**

N-(2-bromophenyl)acrylamide			2-bromoaniline		
Concentration, µg / ml	Concentration,% of anilocaine content	Average peak area (n=3)	Concentration, µg / ml	Concentration,% of anilocaine content	Average peak area (n=3)
0.85	0.0213	95188	0.055	0.00138	7794
1.7	0.0425	18576	0.11	0.00275	13598
3.41	0.085	362138	0.22	0.0055	26865
5.12	0.128	573289	0.33	0.0083	42907
6.82	0.171	753534	0.44	0.011	57927
10.22	0.255	1164350	0.88	0.022	116526
17.04	0.426	1905517	1.76	0.044	227928
The regression equation (Y = aX + b) a = 112011,7; b = 0,0 Correlation coefficient: 0,9998136			The regression equation (Y = aX + b) a = 130047,7; b = 0,0 Correlation coefficient: 0,9998507		

The precision of the validated procedure was evaluated in the analysis of model mixtures of anilocaine substance with an impurity content at 3 concentration levels: 0.05%; 0.1% and 0.15% for N-(2-bromophenyl)acrylamide; 0.005%; 0.01% and 0.015% for 2-bromoaniline. Each of the solutions was chromatographed 3 times

in accordance with the developed procedure. The results of the experiment are shown in Tables 4-5. It is established that the relative standard deviation (RSD) of the measurement results does not exceed 10%, which indicates their satisfactory convergence at all levels of the considered concentrations.

**Table 3 – Evaluation of the repeatability of the determination of N-(2-bromophenyl)acrylamide**

Concentration of N-(2-bromophenyl)acrylamide, µg/ml	Measured concentration of N-(2-bromophenyl)acrylamide, µg/ml	Metrological characteristics (n=6; P=0.95)				
		n	$\bar{X}$	SD	RSD	$\Delta \bar{X}$
1.96 (0.049%)	2.11; 1.87; 2.07; 1.79; 1.91; 2.20	6	1.99	0.128	6.44	0.13
3.92 (0.098%)	3.83; 3.74; 3.99; 4.21; 3.69; 4.16	6	3.94	0.194	4.92	0.20
5.88 (0.147%)	6.08; 6.19; 5.91; 6.11; 5.82; 5.74	6	5.98	0.142	2.37	0.15

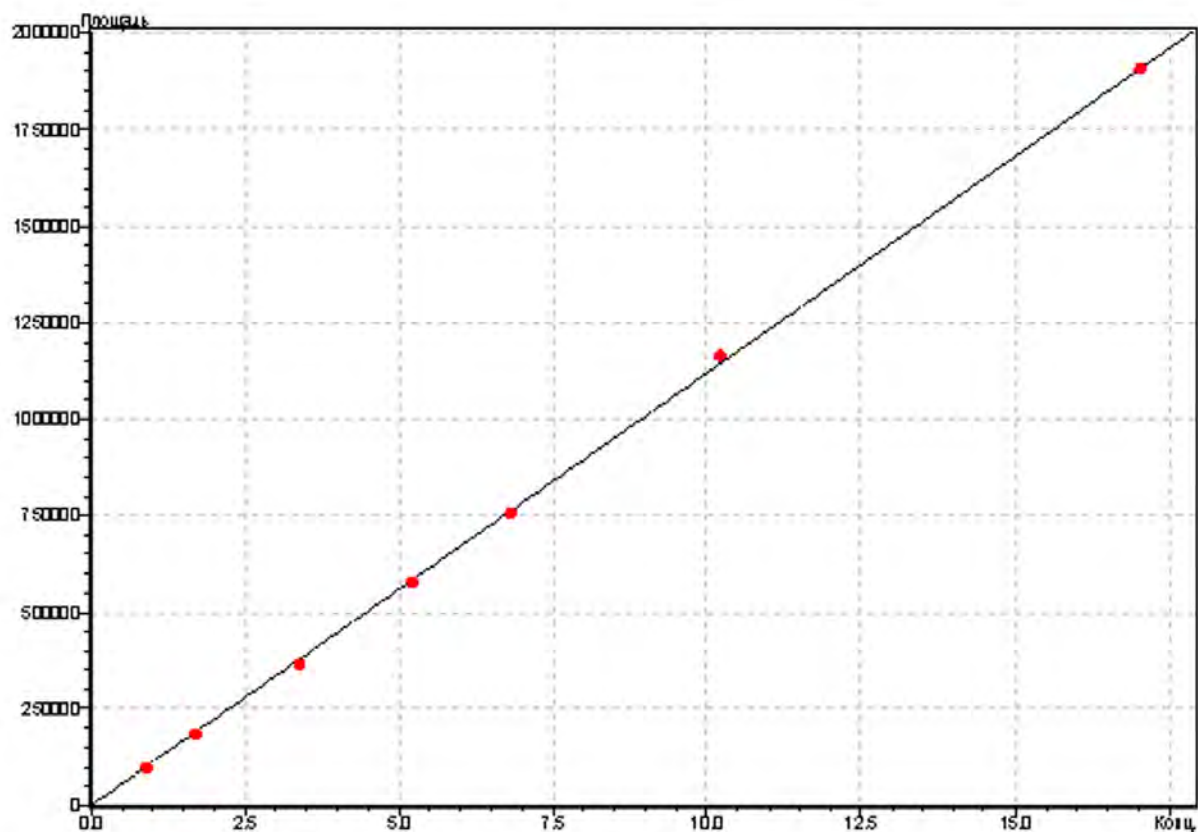


Figure 4 – Dependence of chromatographic peak area on concentration *N*-(2-bromophenyl)acrylamide

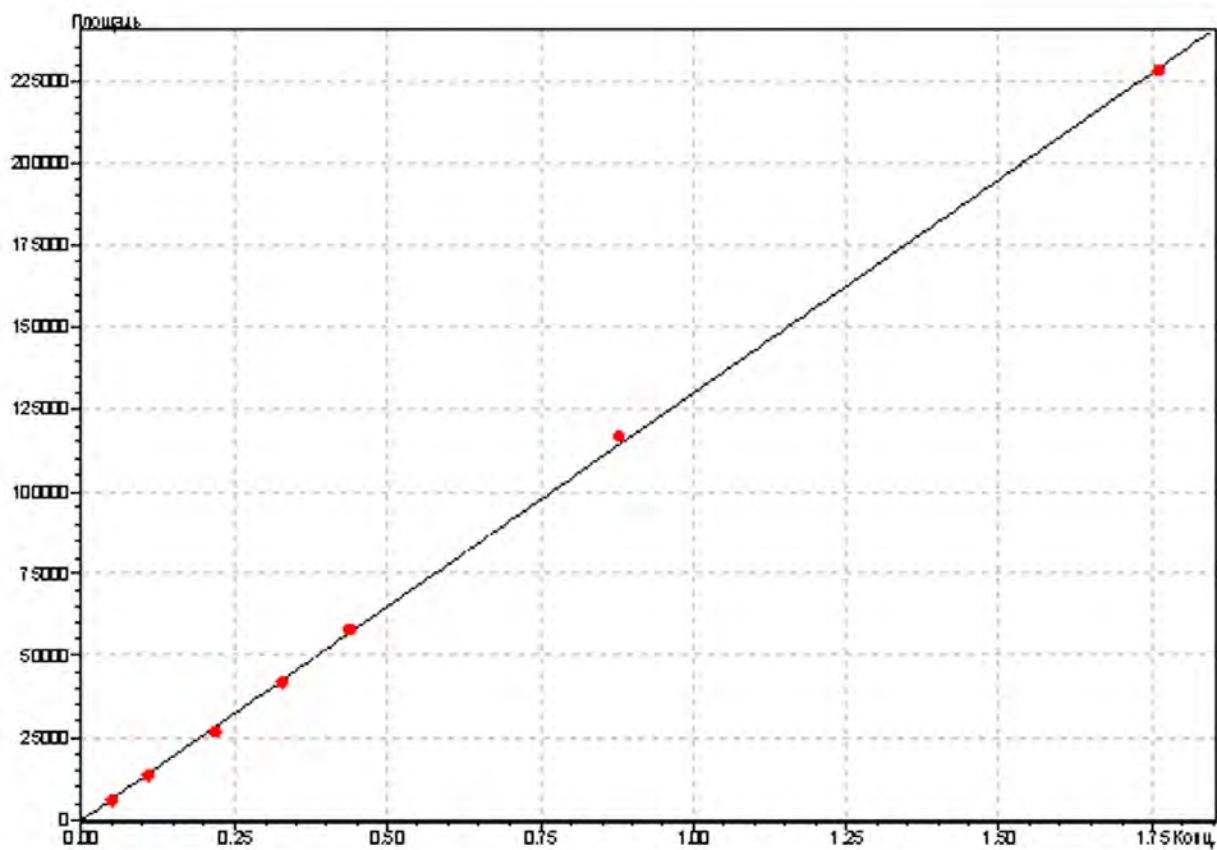


Figure 5 – Dependence of chromatographic peak area on concentration 2-bromoaniline

Table 4 – Evaluation of the repeatability of the determination of 2-bromoaniline

Concentration of 2-bromoaniline, µg/ml	Measured concentration of 2-bromoaniline, µg/ml	Metrological characteristics (n=6; P=0.95)				
		n	$\bar{X}$	SD	RSD	$\Delta \bar{X}$
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	0.034
0.636 (0.0159%)	0.711; 0.632; 0.619; 0.606; 0.754; 0.698	6	0.670	0.0581	8.67	0.061

The accuracy of the procedure was assessed by testing the detectability of detectable impurities introduced into a placebo (anilocaine substance). Studies were carried out at three levels of impurity concentrations (Tables 6-7). The limits of the openability of N-(2-bromophe-

nyl) acrylamide and 2-bromoaniline with respect to the confidence interval do not exceed the normalized limits (75-125% for impurities with a content of 0,1 to 1%, 50-150% for less than 0,1%), which indicates the correctness of the technique.

Table 5 – Evaluation of the accuracy of the determination of (2-bromophenyl)acrylamide

Concentration of N-(2-bromophenyl)acrylamide	Recovery (R), %	Metrological characteristics (n=6; P=0.95)				
		n	$\bar{R}$	SD	RSD	$\Delta \bar{R}$
0.05 %	94.15; 104.30; 88.18; 90.52; 107.29; 104.33	6	98.13	7.68	7.83	8.21
0.1 %	104.72; 96.22; 100.90; 93.71; 108.64; 94.18	6	99.73	5.55	5.57	5.82
0.15%	97.30; 101.17; 104.62; 99.59; 106.16; 95.76	6	100.77	3.39	3.36	3.56

Table 6 – Evaluation of the accuracy of the determination of 2-bromoaniline

Concentration of 2-bromoaniline	Recovery (R), %	Metrological characteristics (n=6; P=0.95)				
		n	$\bar{R}$	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	5.93
0.01 %	99.59; 106.82; 114.34; 95.02; 108.37; 97.17	6	103.55	6.91	6.67	7.25
0.015%	105.36; 96.01; 101.25; 115.35; 94.96; 106.03	6	103.16	7.42	7.19	7.78

The detection limit for 2-bromoaniline according to the test procedure was 0.015 µg / ml (0.000375% of anilocaine content), for N-(2-bromophenyl)acrylamide 0.1 µg / ml (0.0025%).

The limit of quantitative determination of 2-bromoaniline is 0.06 µg / ml (0.0014% of anilocaine content), for N-(2-bromophenyl)acrylamide 0.85 µg / ml (0.02%).

**Conclusion.** Thus, a method has been developed for the quantitative determination of impurities in anilocaine substance by the method of high-performance liquid chromatography. The performed procedure of validation of the analytical technique established its specificity, linearity, reproducibility and correctness. This technique is included in the draft pharmacopoeia article on the substance of anilocaine.

**Библиографический список**

1. Хорошкова Н.В., Панцуркин В.И., Шкляев В.С., Горнова Н.А., Прянишникова Н.Т. Гидрохлорид орто-броманилида β-диэтиламинопропионовой кислоты, проявляющий анестезирующую активность // Пат. №1146989. 1993.
2. Петропавловская Т.А., Чередник И.Л., Шейх-Заде Ю.Р., Богус С.К., Галенко-Ярошевский П.А. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ANTIARITМИЧЕСКОГО ВЛИЯНИЯ ANILOKAИНА И ЛИДОКАИНА ПРИ НЕЙРОГЕННОЙ ФИБРИЛЛЯЦИИ ПРЕДСЕРДИЙ // *Кубанский научный медицинский вестник*. 2009. №8. С. 59–62.
3. Хохлов В.Д., Круть М.И., Сашко С.Ю. АНАФИЛАКТИЧЕСКИЙ ШОК ПРИ ВВЕДЕНИИ ЛИДОКАИНА ПОСЛЕ ОТРИЦАТЕЛЬНОЙ КОЖНОЙ ПРОБЫ // *Клиническая медицина*. 2012. Т. 90. № 7. С. 62–64.
4. Панцуркин В.И., Алексеева И.В. Анилокаин, поиск, свойства. Начальный опыт применения лекарственных форм в медицинской практике. Пермь: Изд-во ГОУ ВПО ПГФА Роздрава, 2006. 173 с.
5. Алексеева И.В., Панцуркин В.И., Одегова Т.Ф., Рюмина Т.Е. РАЗРАБОТКА ОБЕЗБОЛИВАЮЩЕГО ГЕЛЯ «АНИЛОГЕЛЬ» ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ И ЛЕЧЕБНЫХ МАНИПУЛЯЦИЯХ В УРОЛОГИИ // *Химико-фармацевтический журнал*. 2012. Т. 46. № 12. С. 109–112.
6. Алексеева И.В., Рюмина Т.Е. ОБОСНОВАНИЕ СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ ПЛЁНОК ЛЕКАРСТВЕННЫХ С АНИЛОКАИНОМ // *Фундаментальные исследования*. 2014. №12 (часть 1). С. 158–163.
7. Карпенко Ю.Н., Чащина С.В., Тумилович Е.Ю., Алексеева И.В. ИССЛЕДОВАНИЯ В ОБЛАСТИ СТАНДАРТИЗАЦИИ СУБСТАНЦИИ АНИЛОКАИНА ПО ПОКАЗАТЕЛЮ ПОСТОРОННИЕ ПРИМЕСИ // *Современные проблемы науки и образования*. 2013. № 6. URL: <https://science.education.ru/ru/article/view?id=11076> (дата обращения: 06.04.2017).
8. ВФС 42-2946-97 Анилокаин.
9. Ковалева Е.Л., Багирова В.Л., Шахназаров К.С. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОЛОГИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ // *Химико-фармацевтический журнал*. 2010. Т. 44. № 1. С. 35–42.
10. Q3A (R2). Impurities in New Drug Substances and Products. ICH harmonized tripartite guideline. 2005. URL: <http://www.ich.org> (дата обращения: 06.04.2017).
11. Q2 (R1). Validation of analytical procedures: text and methodology. ICH harmonized tripartite guideline. 2005. URL: <http://www.ich.org> (дата обращения: 06.04.2017).
12. Государственная фармакопея Российской Федерации. 13-е издание, в 3-х томах. URL: <http://www.femb.ru/feml>

**References**

1. Horoshkova N.V., Pantsurkin V.I., Shklyayev V.S., Gornova N.A., Pryanishnikova N.T. Gidrohlorid orto-bromanilida -diethylaminopropionovoj kisloty pro-yavlyayushchij anesteziyuyushchuyu aktivnost [Ortho-bromoanilide hydrochloride of β-diethylaminopropionic acid demonstrating anesthetic activity]. Pat. 1146989, Russia. 1993. (In Russ.)
2. Petropavlovskaya T.A., Cherednik I.L., Sheykh-Zade Yu.R., Bogus S.K., Galenko-Yaroshevskiy P.A. SRV-NITELNAYA HARAKTERISTIKA ANTIARITMICHESKOGO VLIYANIYA ANILOKAINA I LIDOKAINA PRI NEJROGENNOJ FIBRILLYACII PREDSERDIJ [COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE ANTIARRHYTHMIC EFFECT OF ANILOCAINE AND LIDOCAINE IN NEUROGENIC ATRIAL FIBRILLATION]. *Kubanskij nauchnyj medicinskij vestnik [Kuban Scientific Medical bulletin]*. 2009. N 8(113). P.59-62. (In Russ.)
3. Khokhlov V.D., Krut' M.I., Sashko S.U. ANAFILAKTICHESKIY SHOK PRI VVEDENII LIDOKAINA POSLE OTRICATELNOJ KOZHNOJ PROBY [ANAPHYLACTIC SHOCK WHEN LIDOCAINE IS ADMINISTERED AFTER A NEGATIVE SKIN TEST]. *Klinicheskaya medicina [Clinical medicine]*. 2012. Vol. 90, N 7. P. 62-64. (In Russ.)
4. Pantsurkin V.I., Alekseeva I.V. Anilokain poisk svojstva Nachalnyj opyt primeneniya lekarstvennyh form v medicinskoj praktike [Anilocaine, search, properties. Initial experience in the use of medicinal forms in medical practice]. Perm Izdatelstvo GOU VPO PGFA Rozdrava [Perm: Publishing house of the State Educational Institution of Higher Professional Education of the City of Roshrava], 2006. 173 p. (In Russ.)
5. Alekseeva I.V., Pantsurkin V.I., Odegova T.F., Ryumina T.E. RAZRABOTKA OBEZBOLIVAYUSHCHEGO GELYA ANILOGEL DLYA PRIMENENIYA PRI DIAGNOSTICHESKIH I LECHEBNYH MANIPULYACIYAH V UROLOGII [DEVELOPMENT OF ANALGESIC GEL “ANILOGEL” FOR USE IN DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC MANIPULATIONS IN UROLOGY]. *Himiko-farmaceuticheskij zhurnal [Chemical-Pharmaceutical Journal]*. 2012. Vol.46. N 12. P.109-112. (In Russ.)
6. Alekseeva I.V., Ryumina T.E. OBOSNOVANIE SOSTAVA I TEKHNOLOGII PLENOK LEKARSTVENNYH S ANILOKAINOM [SUBSTANTIATION OF THE COMPOSITION AND TECHNOLOGY OF MEDICINAL FILMS WITH ANILOCAINE]. *Fundamentalnye issledovaniya [Fundamental Research]*. N 12 (part 1). 2014. P.1 58-163. (In Russ.)

7. Karpenko Yu.N., Chashchina S.V., Tumilovich E.Yu., Alekseeva I.V. ISSLEDOVANIYA V OBLASTI STANDARTIZACII SUBSTANCII ANILOKAINA PO POKAZATELYU POSTORONNIE PRIMESI [STUDIES IN THE FIELD OF STANDARDIZATION OF THE SUBSTANCE OF ANILOCAINE IN TERMS OF THE FOREIGN IMPURITY INDEX]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* [Current problems of science and education]. 2013. N 6. URL: <https://scienceeducation.ru/ru/article/view?id=11076> (access data: 06.06.2017). (In Russ.)
8. ТРА 42-2946-97 Anilocaine. (In Russ.)
9. Kovaleva E.L., Bagirova V.L., Shakhnazarov K.S. SOVERSHENSTVOVANIE METODOLOGICHESKIH PODHODOV K STANDARTIZACII FARMACEVTICHESKIH SUBSTANCIJ [IMPROVEMENT OF METHODOLOGICAL APPROACHES TO STANDARDIZATION PHARMACEUTICAL SUBSTANCES]. *Himiko-farmaceuticheskij zhurnal* [Chemical-pharmaceutical magazine]. 2010. Vol.44. N 1. P.35-42. (In Russ.)
10. Q3A (R2). Impurities in New Drug Substances and Products. ICH harmonized tripartite guideline. 2005. URL: <http://www.ich.org> (дата обращения: 06.04.2017).
11. Q2 (R1). Validation of analytical procedures: text and methodology. ICH harmonized tripartite guideline. 2005. URL: <http://www.ich.org> (дата обращения: 06.04.2017).
12. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossijskoj Federacii. 13-e izdanie. v 3-h tomah [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th edition, in 3 volumes]. URL: <http://www.femb.ru/feml> (In Russ.)

---

**Конфликт интересов**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest.

---

**Авторы:**

**Сабирзянов Денис Робертович** – ассистент кафедры токсикологической химии, Пермская государственная фармацевтическая академия. Область научных интересов: разработка и валидация аналитических методик, высокоэффективная жидкостная хроматография. E-mail: [denissabyrzyanov@gmail.com](mailto:denissabyrzyanov@gmail.com)

**Карпенко Юлия Николаевна** – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры токсикологической химии, Пермская государственная фармацевтическая академия. Область научных интересов: разработка и валидация биоаналитических методик, исследования в области фармацевтического и химико-токсикологического анализа, фармакокинетические исследования, высокоэффективная жидкостная хроматография. E-mail: [karpenko\\_pfa@mail.ru](mailto:karpenko_pfa@mail.ru)

**Малкова Тамара Леонидовна** – доктор фармацевтических наук, заведующий кафедрой токсикологической химии, Пермская государственная фармацевтическая академия. Область научных интересов: разработка и совершенствование методик определения лекарственных средств, в том числе, имеющих токсикологическое значение, исследование новых психоактивных веществ, обеспечение качества аналитических исследований.

**Алексева Ирина Владимировна** – профессор фармацевтической технологии, Пермская государственная фармацевтическая академия. Область научных интересов: комплексные исследования с целью создания лекарственных форм на основе местного анестетика анилокаина.

**Autors:**

**Sabyrzyanov Denis** – an assistant of the faculty of Toxicological chemistry, Perm State Pharmaceutical Academy. Research interests: development and validation of analytical methods, high performance liquid chromatography. E-mail: [denissabyrzyanov@gmail.com](mailto:denissabyrzyanov@gmail.com)

**Karpenko Yulia** – Candidate of Sciences (Pharmacy), an associate professor of the faculty of Toxicological chemistry, Perm State Pharmaceutical Academy. Research interests: development and validation of bioanalytical methods, studies in the field of pharmaceutical and chemical-toxicological analysis, pharmacokinetic studies, high performance liquid chromatography. E-mail: [karpenko\\_pfa@mail.ru](mailto:karpenko_pfa@mail.ru)

**Malkova Tamara** – Doctor of Sciences (Pharmacy), the Head of the faculty of Toxicological chemistry, Perm State Pharmaceutical Academy. Research interests: development and improvement of methods for detection of drugs, including those of toxicological significance, the study of new psychoactive substances, quality assurance of analytical studies.

**Alekseeva Irina** – the professor of pharmaceutical technology, Perm State Pharmaceutical Academy. Research interests: a complex study with the aim of development of medicinal forms on the basis of local anesthetic anilocaine.