УДК 543.062/.545:615.211:612.35

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИДОКАИНА И БУПИВАКАИНА В ТКАНИ ПЕЧЕНИ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

[1]Смирнова А.В., [1]Фомин А.Н., [2]Семёнов М.Б., [1]Каджоян Л.В.

[1]ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ярославль, e-mail: pharmchem.yma@yandex.ru;

[2]ООО «Такеда Фармасьютикалс», Ярославль, e-mail: semenov.mb@yandex.ru

Разработана методика количественного определения лидокаина и бупивакаина методом капиллярного электрофореза («Капель-105», ООО «Люмекс-Центрум», г. Санкт-Петербург). Предложенная методика линейна (коэффициенты корреляции составили 0,9991 и 0,9997 для лидокаина и бупивакаина соответственно), а также характеризуется удовлетворительной повторяемостью и воспроизводимостью (коэффициент вариации не превышает 1 %, а относительная ошибка среднего результата – 1,08 %). Изучены условия экстракции исследуемых анестетиков из водных растворов с учетом влияния природы экстрагента, pH среды, кратности и объема экстрагирования. Установлено, что наибольший процент экстракции наблюдается с использованием в качестве экстрагента хлороформа при pH 10,0 (бупивакаин), pH 9,0 (лидокаин), при соотношении водной и органической фаз 1:1, кратности экстрагирования равной трем и составляет 94,71 % и 80,43 % для бупивакаина и лидокаина соответственно. Дана сравнительная оценка методов выделения исследуемых веществ из ткани печени с использованием извлекателей: раствора щавелевой кислоты, pH 2,0, раствора уксусной кислоты, pH 2,0 и раствора трихлоруксуной кислоты (ТХУК), pH 1,0. Наибольшая степень выделения наблюдается с извлекателем – раствором щавелевой кислоты, pH 2,0 и составила 69,20 % и 64,82 % для лидокаина и бупивакаина соответственно. При этом граница определения составила 0,5 мкг, а граница обнаружения 0,1 мкг исследуемых веществ в 1,0 г ткани печени. Разработанные методики количественного определения лидокаина и бупивакаина в ткани печени являются валидными по критерию повторяемости результатов измерений в пределах рекомендуемых аналитических областей, а также обладают высокой чувствительностью, селективностью и экспрессностью и могут быть рекомендованы для проведения судебно-химического (химико-токсикологического) и клинического лабораторного анализов.

Ключевые слова: лидокаин, бупивакаин, ткань печени, капиллярный электрофорез

QUANTITATIVE DETERMINATION OF LIDOCAINE AND BUPYUVACINE IN THE LIVER TISSUE BY THE METHOD OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS

[1]Smirnova A.V., [1]Fomin A.N., [2]Semenov M.B., [1]Kadzhoyan L.V.

[1]Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, e-mail: pharmchem.yma@yandex.ru;

[2]OOO Takeda Pharmaceuticals, Yaroslavl, e-mail: semenov.mb@yandex.ru

A method for quantitative determination of lidocaine and bupivacaine by the method of capillary electrophoresis (Kapel-105, Lumex-Centrum, St. Petersburg) was developed. The proposed methodology is linear (the correlation coefficients are 0.9991 and 0.9997 for lidocaine and bupivacaine, respectively), and is characterized by satisfactory repeatability and reproducibility (the coefficient of variation does not exceed 1 %, and the relative error of the mean result is 1.08 %).The extraction conditions of the investigated anesthetics from aqueous solutions were studied taking into account the influence of the nature of the extractant, the pH of the medium, the multiplicity and the volume of extraction. It was found that the highest extraction percentage was observed using chloroform as an extractant at pH 10.0 (bupivacaine), pH 9.0 (lidocaine), a ratio of the aqueous and organic phases of 1:1, the extraction rate was three and equal to 94.71 % and 80.43 % for bupivacaine and lidocaine, respectively. A comparative evaluation of the methods for isolation of test substances from liver tissue using extractors is oxalic acid solution, pH 2.0, acetic acid solution, pH 2.0 and trichloroacetic acid solution (TCAA), pH 1.0. The highest degree of excretion is observed with the extractor – a solution of oxalic acid, pH 2.0 and amounted to 69.20 % and 64.82 % for lidocaine and bupivacaine, respectively. The detection limit was 0.5 μg, and the limit of qualitative determination was 0.1 μg of the test substances in 1.0 g of liver tissue. The developed methods for the quantitative determination of lidocaine and bupivacaine in liver tissue are valid according to the criteria for the repeatability of measurement results within the recommended analytical areas, and also have high sensitivity, selectivity and rapidity and can be recommended for forensic chemistry and clinical laboratory analysis.

Keywords: lidocaine, bupivacaine, tissue of liver, capillary electrophoresis

В последние годы в медицинской практике использование местных анестетиков стало довольно распространенным явлением. В первую очередь это связано с появлением местноанестезирующих лекарственных средств амидного типа (лидокаин, мепивакаин, бупивакаин, ропивакаин и др.), которые открыли новые возможности для повышения эффективности и безопасности контроля над болью. Кроме этого, развитие некоторых видов местной анестезии, таких как спинномозговая, эпидуральная и др., привело к увеличению числа хирургических операций на амбулаторных больных, а также к появлению новых, вызывающих меньшее кровотечение хирургических техник [1–3].

В то же время местные анестетики по частоте развития лекарственных осложнений стабильно занимают одно из первых мест. Побочные эффекты токсического ха-

рактера развиваются, как правило, на фоне повышенных концентраций препарата в крови при использовании их в дозах, превышающих рекомендуемые, при случайном попадании в сосудистое русло или быстром введении препарата, а также индивидуальной непереносимости [1, 3].

При отравлении местноанестезирующими средствами паталогоанатомическая картина не характерна. Для выявления причины смерти лиц, принимавших анестетики, решающее значение приобретают результаты химико-токсикологического (судебно-химического) исследования. В то же время в клинической хирургической практике в ряде случаев возникает потребность проведения лабораторного анализа препарата в биологических средах [4]. В связи с этим актуальной задачей является разработка экспрессных, высокочувствительных и селективных методик анализа исследуемых соединений в биологических объектах.

Несмотря на значительное число работ, посвященных анализу местных анестетиков, продолжают оставаться актуальными вопросы исследования в области разработки новых и совершенствования существующих методик их химико-токсикологического анализа. Одним из современных и перспективных аналитических методов, отвечающих требованиям судебно-химической (химико-токсикологической) практики и клинической лабораторной диагностики, является капиллярный электрофорез (КЭ), характеризующийся сочетанием разделения веществ с последующей их детекцией в УФ-области спектра непосредственно в кварцевом капилляре. Метод отличается простым аппаратурным оформлением и доступными расходными материалами [4–6].

В связи с вышеизложенным целью исследования явилось изучение возможности количественного определения лидокаина и бупивакаина в ткани печени методом капиллярного электрофореза.

Исследования проводили с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель-105» (ООО «Люмекс-Центрум», г. Санкт-Петербург). Ранее нами были установлены электрофоретические условия анализа исследуемых местных анестетиков (МА): рабочий электролит (РЭ) – буферный раствор Бриттона – Робинсона, pH 2,3; растворитель пробы (РП) – РЭ, разбавленный в 10 раз водой очищенной; ввод пробы – гидродинамическим способом (30 мбар х 15 сек); напряжение – +20 кВ; детектирование – при длине волны 200 нм; запись и обработка электрофореграмм (ЭФГ) – с помощью программного обеспечения «МультиХром для Windows» [4, 6, 7].

При разработке методики количественного определения МА методом КЭ готовили серию стандартных растворов МА в РП, содержащих от 0,5 до 20 мкг исследуемого вещества в 1 мл пробы и проводили электрофорез на приборе «Капель-105». Фотометрические сигналы (площади пиков) использовали для построения калибровочных графиков. При этом наблюдалась линейная зависимость величины фотометрического сигнала от концентрации МА в пробе. На основе полученных данных рассчитывали уравнения калибровочных графиков – $y = 1{,}454x + 0{,}39$ ($r^2 = 0{,}9991$) для лидокаина и $y = 1{,}085\ x - 0{,}055$ ($r^2 = 0{,}9997$) для бупивакаина. Коэффициенты корреляции близки к единице, что подтверждает линейность методик в указанном диапазоне концентраций.

Для валидационной оценки методики количественного определения МА методом КЭ по уравнению калибровочного графика проводили электрофорез анестетиков с концентрацией 20, 10 и 1,0 мкг/мл в приведенных выше условиях. На ЭФГ определяли площади пиков и по уравнению калибровочного графика рассчитывали концентрации МА. При статистической обработке данных, полученных при количественном определении МА на трех уровнях концентраций (табл. 1, 2), отражается вполне удовлетворительная повторяемость и воспроизводимость результатов в пределах рекомендуемой аналитической области. Коэффициент вариации не превышает 1%, а относительная ошибка среднего результата – 1,08%.

Таблица 1

Воспроизводимость результатов методики количественного определения бупивакаина методом КЭ

Концентрация бупивакаина, мкг/мл	Метрологические характеристики (n = 5)					
	$\bar{x}$	S	CV%	$S\bar{x}$	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$%
1,0	98,20	0,84	0,86	0,38	1,06	1,08
10,0	98,80	0,67	0,68	0,30	0,83	0,84
20,0	99,00	0,56	0,57	0,25	0,70	0,71

Таблица 2

Воспроизводимость результатов методики количественного определения лидокаина методом КЭ

Концентрация лидокаина, мкг/мл	Метрологические характеристики (n = 5)					
	$\bar{x}$	S	CV%	$S\bar{x}$	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$%
1,0	99,84	0,74	0,74	0,33	0,92	0,92
10,0	100,04	0,54	0,54	0,24	0,67	0,67
20,0	100,14	0,64	0,64	0,29	0,80	0,80

Таблица 3

Сравнительная характеристика методов выделения МА из ткани печени

Экстрагент	Внесено МА в 1,0 г печени, мкг	Определено МА ($\bar{x}$, %; n = 5)	
		Лидокаин	Бупивакаин
		%	%
Раствор щавелевой кислоты, pH 2,0	100,0	69,20	64,82
Раствор уксусной кислоты, pH 2,0	100,0	58,48	51,59
Раствор трихлоруксусной кислоты, pH 1,0	100,0	44,17	40,99
Контрольный опыт	–	–	–

Выделение и определение лекарственных средств в биологических объектах является одной из самых сложных задач судебно-химического (химико-токсикологического) и клинического лабораторного анализов. Трудность обусловлена изолированием микрограммовых количеств исследуемых соединений из биосубстратов и их очисткой от соэкстрактивных веществ [4, 7].

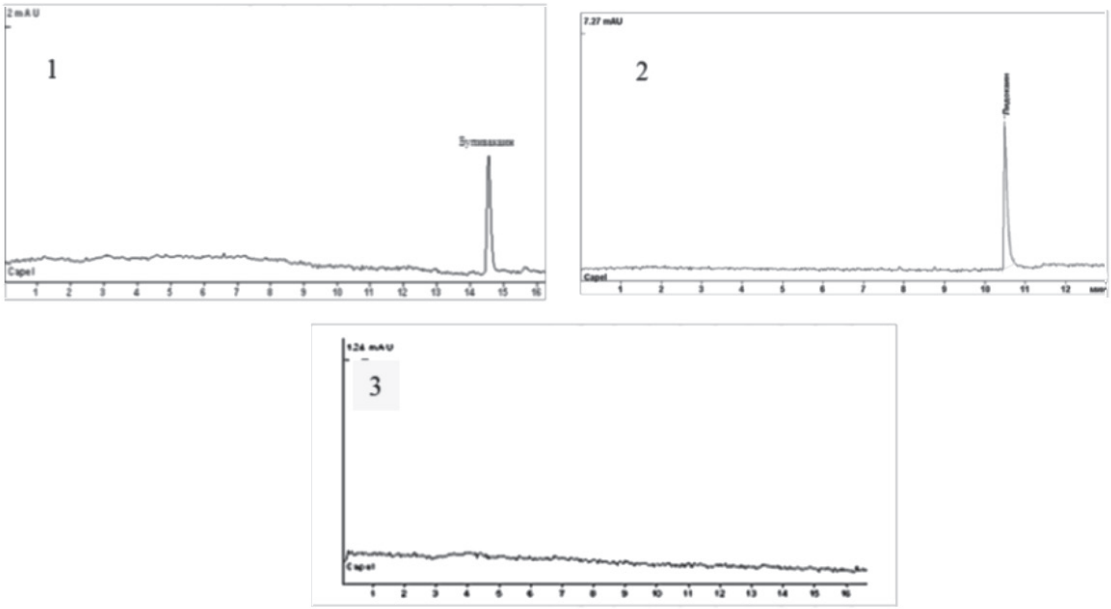
Предварительно нами были изучены условия экстракции анестетиков из водных растворов в зависимости от pH среды, природы органического растворителя, объема экстрагента и кратности экстрагирования. По результатам исследования установлено, что наибольший процент экстракции наблюдается с использованием в качестве экстрагента хлороформа при pH 10,0 (бупивакаин) и pH 9,0 (лидокаин), соотношении водной и органической фаз 1:1, кратности экстрагирования равной трем и составляет 94,71% и 80,43% для бупивакаина и лидокаина соответственно.

Также было проведено сравнительное изучение методов выделения искомых соединений с использованием извлекателей: раствора щавелевой кислоты, pH 2,0, раствора уксусной кислоты, pH 2,0 и раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУК), pH 1,0. Исследование проводили по следующим методике: к 1 г мелкоизмельченной ткани печени добавляли 1 мл 0,01% стандартных растворов МА, содержащих 100 мкг вещества в пробе, и перемешивали. Через 1 час к смеси добавляли 7 мл одного из вышеперечисленных извлекателей, перемешивали и оставляли на 1 час при периодическом перемешивании. Вытяжку центрифугировали (6000 об/мин, 10 мин). Надосадочную жидкость отделяли, добавляли 25% раствор аммония гидроксида до pH 10,0 (бупивакаин) или pH 9,0 (лидокаин) по универсальной индикаторной бумаге и проводили жидкостное экстрагирование хлороформом (10 мл х 3, 10 мин). Хлороформные экстракты отделяли и оставляли в сухом защищенном от света месте для испарения. Сухие остатки при исследовании бупивакаина растворяли в 1,0 мл РП, при исследовании лидокаина – в 1 мл хлороформа и проводили реэкстрагирование 1 мл РП. Полученные реэкстракты центрифугировали (10000 об/мин, 10 мин) и количественно определяли методом КЭ в приведенных выше условиях.

Результаты исследований (табл. 3) показали, что наибольшая степень извлечения из ткани трупной печени наблюдается при использовании в качестве экстрагента раствора щавелевой кислоты, pH 2,0 и составляет 64,82% для бупивакаина и 69,20% для лидокаина.

При этом выбранные условия пробоподготовки позволяют эффектно провести очистку исследуемых оснований от соэкстрактивных веществ ткани печени (рисунок).

Для определения чувствительности методик количественного определения МА в биосубстрате к 1 г мелкоизмельченной ткани печени добавляли аликвоты стандартных растворов МА, содержащих определенное количество вещества в пробе. Дальнейшее выделение и определение осуществляли согласно разработанной методике. Результаты исследований представлены в табл. 4.



ЭФГ бупивакаина (1) и лидокаина (2), выделенных из ткани печени; контрольный опыт (3). Экстрагент – раствор щавелевой кислоты, pH 2,0 («Капель – 105»)

Таблица 4

Количественное определение МА в тканях трупной печени

№ п/п	Внесено МА в 1 г ткани печени, мкг	Определено МА					
		Бупивакаин			Лидокаин		
		мкг	%	Метрологические характеристики	мкг	%	Метрологические характеристики
1	20,0	13,21	66,04	$\bar{x}$ = 66,04 S = 0,97 CV = 1,47 % $S\bar{x}$ = 0,43 $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ = 66,04 ± 1,20 $\bar{\varepsilon}$ = 1,82 %	13,84	69,20	$\bar{x}$ = 69,20 S = 1,08 CV = 1,55 % Sx = 0,48 $\bar{x} \pm \Delta x$ = 69,20 ± 1,34 $\bar{\varepsilon}$ = 1,93 %
2	1,0	0,656	65,60	$\bar{x}$ = 65,60 S = 0,55 CV = 0,84 % $S\bar{x}$ = 0,25 $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ = 65,60 ± 0,70 $\bar{\varepsilon}$ = 1,07 %	0,67	67,29	x = 67,29 S = 0,31 CV = 0,47 % $S\bar{x}$ = 0,14 $\bar{x} \pm \Delta x$ = 67,29 ± 0,40 $\bar{\varepsilon}$ = 0,59 %
3	0,5	0,316	63,20	$\bar{x}$ = 63,20 S = 1,10 CV = 1,74 % $S\bar{x}$ = 0,49 $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ = 63,20 ± 1,36 $\bar{\varepsilon}$ = 2,15 %	0,33	66,52	x = 66,52 S = 0,45 CV = 0,68 % $S\bar{x}$ = 0,20 $\bar{x} \pm \Delta x$ = 66,52 ± 0,56 $\bar{\varepsilon}$ = 0,84 %
4	0,1	+	–	–	+	–	–

П р и м е ч а н и е . (+) – количество вещества ниже предела количественного определения.

Таким образом, разработанные методики количественного определения лидокаина и бупивакаина в ткани печени характеризуются удовлетворительной повторяемостью в пределах данной аналитической области по критерию воспроизводимости (стандартное отклонение среднего результата) и позволяют определить 63,20–66,04 %

бупивакаина и 69,20–66,52 % лидокаина. При этом граница определения составила 0,5 мкг, а граница обнаружения – 0,1 мкг обоих веществ в 1 г ткани печени.

Выводы

1. Проведена сравнительная характеристика методов выделения исследуемых местных анестетиков из ткани печени. При этом наибольшая степень выделения наблюдается при использовании в качестве извлекателя раствора щавелевой кислоты, pH 2,0. Граница определения составила 0,5 мкг, а граница обнаружения – 0,1 мкг исследуемых веществ в 1,0 г ткани печени.

2. Разработанные методики количественного определения лидокаина и бупивакаина в ткани печени являются валидными по критерию повторяемости результатов измерений в пределах рекомендуемых аналитических областей.

3. Предложенные методики выделения и определения исследуемых местных анестетиков высокочувствительны, селективны и могут быть рекомендованы для проведения судебно-химического (химико-токсикологического) и клинического лабораторного анализов.

Список литературы

1. Калви Т.Н. Фармакология для анестезиолога / Т.Н. Калви, Н.Е. Уильямс: пер. с англ. – М.: БИНОМ, 2007. – 176 с.

2. Местная анестезия. Практическое руководство / М. Малрой, К.М. Бернардс, С.Б. Макдональд, Ф.В. Салинас. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. – 400 с.

3. Рафмелл Д.П. Регионарная анестезия: Самое необходимое в анестезиологии / Д.П. Рафмелл, Д.М. Нил, К.М. Вискоуми; пер. с англ.; под общ. ред. А.П. Зильбера, В.В. Мальцева. – 3-е изд. – М.: МЕДпресс-информ, 2013. – 272 с.

4. Джурко Ю.А. Исследование артикаина в биологических объектах методом капиллярного электрофореза: автореф. дис. … канд фарм. наук. – Москва, 2006. – 26 с.

5. Комарова Н.В. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ»/ Н.В. Комарова, Я.С. Каменцев. – СПб.: ООО «Веда», 2006. – 212 с.

6. Идентификация артикаина и бупивакаина методом капиллярного электрофореза / А.Н. Фомин [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2010. – № 7. – С. 68–72.

7. Идентификация ряда азотсодержащих соединений основного характера в присутствии соэкстрактивных веществ мочи и крови методом капиллярного электрофореза / А.Н. Фомин [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2010. – Т. 44, № 9. – С. 46–48.

References

1. Kalvi T.N. Farmakologija dlja anesteziologa / T.N. Kalvi, N.E. Uiljams: per. s angl. M.: BINOM, 2007. 176 p.

2. Mestnaja anestezija. Prakticheskoe rukovodstvo / M. Malroj, K.M. Bernards, S.B. Makdonald, F.V. Salinas. M.: BINOM. Laboratorija znanij, 2014. 400 p.

3. Rafmell D.P. Regionarnaja anestezija: Samoe neobhodimoe v anesteziologii / D.P. Rafmell, D.M. Nil, K.M. Viskoumi; per. s angl.; pod obshh. red. A.P. Zilbera, V.V. Malceva. 3-e izd. M.: MEDpress-inform, 2013. 272 p.

4. Dzhurko Ju.A. Issledovanie artikaina v biologicheskih obektah metodom kapilljarnogo jelektroforeza: avtoref. dis. … kand farm. nauk. Moskva, 2006. 26 p.

5. Komarova N.V. Prakticheskoe rukovodstvo po ispolzovaniju sistem kapilljarnogo jelektroforeza «KAPEL» / N.V. Komarova, Ja.S. Kamencev. SPb.: OOO «Veda», 2006. 212 p.

6. Identifikacija artikaina i bupivakaina metodom kapilljarnogo jelektroforeza / A.N. Fomin [i dr.] // Voprosy biologicheskoj, medicinskoj i farmacevticheskoj himii. 2010. no. 7. pp. 68–72.

7. Identifikacija rjada azotsoderzhashhih soedinenij osnovnogo haraktera v prisutstvii sojekstraktivnyh veshhestv mochi i krovi metodom kapilljarnogo jelektroforeza / A.N. Fomin [i dr.] // Himiko-farmacevticheskij zhurnal. 2010. T. 44, no. 9. pp. 46–48.