



И.Ю. Якупов ✉   
С.И. Кулешова   
О.Н. Высочанская   
Е.П. Симонова 

## Определение содержания нафтифина и продуктов его деструкции в лекарственных препаратах методом ВЭЖХ с использованием хроматографических колонок малого объема

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

✉ Якупов Илья Юрьевич; [yakupoviy@expmed.ru](mailto:yakupoviy@expmed.ru)

### РЕЗЮМЕ

**ВВЕДЕНИЕ.** Лекарственные препараты на основе нафтифина широко используются в медицинской практике для лечения грибковых инфекций. Одним из основных показателей качества лекарственного препарата является содержание действующего вещества. При разработке методик количественного определения для рутинного анализа лекарственных средств особое внимание уделяется сокращению временных и материальных затрат.

**ЦЕЛЬ.** Модернизация методики количественного определения нафтифина и его примесей в лекарственных препаратах методом ВЭЖХ с использованием колонок малого объема, позволяющих сократить время анализа и расход реактивов.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.** Объектами исследования были субстанции и препараты нафтифина в форме 1% спиртового раствора и крема для наружного применения. Хроматографирование растворов проводили на жидкостных хроматографах Agilent 1200 Infinity и Agilent Infinity II 1290, оснащенных диодно-матричными детекторами с использованием нескольких хроматографических колонок: XBridge Phenyl 20×4,6 мм с размерами частиц 2,5 и 3,5 мкм и Acquity BEH Phenyl 75×2,1 мм, 1,7 мкм. Для оценки специфичности методики использовали образцы N-метил-1-нафталинметиламина, коричневого альдегида и растворы нафтифина после химической, термической и фотолитической деструкции.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Подобран оптимальный нетоксичный растворитель проб – 0,1% раствор ортофосфорной кислоты и доказано, что для разных лекарственных форм могут быть применены разные растворители. Выбраны условия анализа: концентрация испытуемых растворов нафтифина – 10 мкг/мл, колонка XBridge Phenyl (20×4,6 мм; 2,5 мкм), градиентный режим элюирования смесью 0,1% раствора хлорной кислоты и ацетонитрила со скоростью 1 мл/мин. Показано, что детектирование при длине волны 254 нм обеспечивает наилучшее соотношение сигнала и шума для пика нафтифина. Воспроизводимость разработанной методики количественного определения нафтифина была подтверждена валидацией согласно требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации. Специфичность методики подтверждена хроматографированием растворителя, подвижной фазы и модельных растворов, содержащих основные примеси нафтифина. Линейность методики подтверждена в диапазоне 80–120% нафтифина (коэффициент корреляции составил 0,995). При проверке правильности методики открываемость составила 100,2%. Доказана устойчивость методики при незначительных изменениях хроматографических параметров. Время удерживания пика нафтифина – около 2 мин.

**ВЫВОДЫ.** Разработана селективная и чувствительная ВЭЖХ-методика количественного определения нафтифина в лекарственных средствах, позволяющая сократить время анализа и свести к минимуму расход используемых реагентов. Результаты валидации методики удовлетворяют критериям приемлемости, подтверждают ее пригодность и воспроизводимость.

**Ключевые слова:** высокоэффективная жидкостная хроматография; ВЭЖХ; нафтифин; количественное определение; продукты деструкции нафтифина; валидация

**Для цитирования:** Якупов И.Ю., Кулешова С.И., Высочанская О.Н., Симонова Е.П. Определение содержания нафтифина и продуктов его деструкции в лекарственных препаратах методом ВЭЖХ с использованием хроматографических колонок малого объема. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(6):673–685. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-6-673-685>

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-01 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022300127-0).

**Потенциальный конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Ilya Yu. Yakupov ✉   
Svetlana I. Kuleshova   
Olga N. Vysochanskaya   
Elena P. Simonova 

## Quantitative Determination of Naftifine and Its Degradation Products in Medicines by HPLC with Small-Volume Columns

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,  
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ Ilya Y. Yakupov; [yakupoviy@expmed.ru](mailto:yakupoviy@expmed.ru)

### ABSTRACT

**INTRODUCTION.** Naftifine medicinal products are widely used in medical practice to treat fungal infections. A key quality attribute of a naftifine medicinal product is the content of the active substance. It is essential to develop quantitative analytical procedures for the routine control of medicines with a particular focus on reducing time and costs.

**AIM.** This study aimed to update the analytical procedures for the quantitative determination of naftifine and its impurities in medicines by high-performance liquid chromatography (HPLC) with small-volume columns providing a reduction in assay time and reagent consumption.

**MATERIALS AND METHODS.** This study focused on the active substance naftifine and naftifine-based medicinal products, including a 1% naftifine alcohol solution and a 1% naftifine cream for cutaneous use. The solutions were analysed on Agilent 1200 Infinity and Agilent Infinity II 1290 liquid chromatography systems equipped with diode-array detectors and several chromatographic columns: XBridge Phenyl, 20×4.6 mm, 2.5 μm; XBridge Phenyl, 20×4.6 mm, 3.5 μm; and Acquity BEH Phenyl, 75×2.1 mm, 1.7 μm. The specificity of the analytical procedure was evaluated using spiking solutions of *N*-methyl-1-naphthalenemethylamine and cinnamaldehyde as well as naftifine solutions after chemical, thermal, and photolytic decomposition.

**RESULTS.** The authors identified the optimal non-toxic solvent (0.1% orthophosphoric acid solution) and demonstrated the applicability of different solvents to different dosage forms. Additionally, the selected analytical conditions included the following: 10 μg/mL naftifine solutions were chromatographed on an XBridge Phenyl column (20×4.6 mm; 2.5 μm) using a gradient of 0.1% perchloric acid and acetonitrile at an elution rate of 1 mL/min. The study showed that the selected detection wavelength of 254 nm provided the best signal-to-noise ratio for the naftifine peak. The reproducibility of the developed quantitative determination procedure was confirmed by validation in accordance with the current requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. The specificity of the analytical procedure was shown by chromatographic analysis of the solvent, mobile phase, and solutions containing the main naftifine impurities. The validation study confirmed the linearity of the analytical procedure in the range of 80–120% (with a correlation coefficient of 0.995). During the accuracy validation, the recovery rate was 100.2%. The validation study demonstrated the robustness of the analytical procedure to minor changes in the chromatographic parameters. The naftifine retention time amounted to approximately 2 minutes.

**CONCLUSIONS.** The authors developed a selective and sensitive HPLC-based analytical procedure for the quantitative determination of naftifine in medicines. This analytical procedure provides for a reduction in assay time and reagent consumption, and its compliance with the validation acceptance criteria indicates its suitability and reproducibility.

**Keywords:** high-performance liquid chromatography; HPLC; naftifine; quantitative determination; naftifine degradation products; validation

**For citation:** Yakupov I.Yu., Kuleshova S.I., Vysochanskaya O.N., Simonova E.P. Quantitative determination of naftifine and its degradation products in medicines by HPLC with small-volume columns. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(6):673–685. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-6-673-685>

**Funding.** This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00026-24-01 (R&D Registry No. 124022300127-0).

**Disclosure.** The authors declare no conflict of interest.

## ВВЕДЕНИЕ

Нафтифин в лекарственной форме для наружного применения используется для лечения грибковых инфекций кожи и ногтей [1], относится к классу аллиламинов [2] и обладает фунгицидным и фунгистатическим действием.

Фунгицидное действие *in vitro* нафтифин оказывает против дерматофитных микроорганизмов *Trichophyton* spp., *Microsporum* spp. и *Epidermophyton floccosum* [2, 3]. В исследованиях *in vivo* было показано, что активность нафтифина против *T. rubrum* и *T. mentagrophytes* аналогична клотримазолу [4]. Также нафтифин проявляет антибактериальную и противовоспалительную активность, что важно при лечении поверхностных дерматозов, сопровождающихся бактериальной инфекцией и воспалением.

Для количественного определения нафтифина в лекарственных средствах используют методы спектрофотометрии в ультрафиолетовом (УФ) диапазоне спектра [5] и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [6, 7]. Однако при наличии вспомогательных веществ в составе препаратов нафтифина могут быть не выполнены требования специфичности для метода УФ-спектрофотометрии, поэтому наиболее востребованным в контроле качества является метод ВЭЖХ.

В Фармакопее США (USP)<sup>1</sup> для анализа нафтифина гидрохлорида указана методика нормально-фазовой жидкостной хроматографии с использованием в качестве подвижной фазы смеси *n*-гексана, этанола, диметилформамида и муравьиной кислоты. Компоненты подвижной фазы обладают высокой токсичностью и легко воспламеняемы, а их летучесть может приводить со временем к изменению состава подвижной

фазы. Методика достаточно продолжительная, при этом из-за большой скорости потока элюента (2 мл/мин) расходуется большое количество подвижной фазы. Поэтому актуален выбор условий анализа и совершенствование методики определения нафтифина в лекарственных препаратах.

Цель работы – модернизация методики количественного определения нафтифина и его примесей в лекарственных препаратах методом ВЭЖХ с использованием колонок малого объема, позволяющих сократить время анализа и расход реактивов.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

- подобрать оптимальные условия хроматографирования нафтифина;
- выбрать условия пробоподготовки для различных лекарственных форм;
- подтвердить пригодность разработанной методики, определив ее валидационные характеристики.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объекты исследования.** Субстанция-порошок нафтифина (Olon S.p.A.), образцы лекарственных препаратов в форме 1% спиртового раствора и 1% крема для наружного применения, зарегистрированные для применения на территории Российской Федерации<sup>2</sup>, фармакопейный стандартный образец нафтифина гидрохлорида (USP).

**Реактивы.** Фосфорная кислота (85%, Supelco), метанол (99,9%, J.T. Baker), ацетонитрил (99,9%, CARLO ERBA Reagents), спирт этиловый абсолютный (Merck), хлорная кислота (70%, Sigma-Aldrich), хлороводородная кислота (37%,

<sup>1</sup> Naftifine Hydrochloride. USP-NF. Rockville, MD; 2023.

<sup>2</sup> <https://grls.rosminzdrav.ru>

Merck), натрия гидроксид (99,9%, Labochem), водорода пероксид (30%, Merck).

**Растворы стандартного образца.** Для оценки величины аналитического сигнала, эффективности хроматографической колонки и выбора альтернативного растворителя для анализа различных лекарственных форм готовили по 5 растворов стандартного образца нафтифина (200 мкг/мл) в каждом из следующих растворителей: 0,1% растворе фосфорной кислоты (P1), метаноле (P2), смеси воды и этанола (50:50 об./об., P3), этаноле (P4), смеси 0,1% хлорной кислоты и ацетонитрила (70:30 об./об., P5). Затем проводили второе разведение каждого раствора в том же растворителе до концентрации около 10 мкг/мл нафтифина. Все растворы после приготовления отфильтровывали через шприцевые мембранные фильтры из политетрафторэтилена с размером пор не более 0,45 мкм (Agilent Technologies).

**Модельные растворы примесей.** Для выбора оптимальной длины волны был приготовлен раствор, содержащий 10 мкг/мл нафтифина, 10 мкг/мл коричневого альдегида (Sigma-Aldrich) и 10 мкг/мл N-метил-1-нафталинметиламина (Sigma-Aldrich) в 0,1% фосфорной кислоте. Для определения селективности при проведении валидации методики была приготовлена серия модельных растворов. Раствор, содержащий 1000 мкг/мл N-метил-1-нафталинметиламина (Sigma-Aldrich), 1000 мкг/мл коричневого альдегида (Sigma-Aldrich) и 10 мкг/мл нафтифина в 0,1% фосфорной кислоте, готовили путем добавления образцов примесей при втором разведении раствора стандартного образца нафтифина. Растворы разложения нафтифина получали при втором разведении раствора стандартного образца путем добавления к нему растворов натрия гидроксида, соляной кислоты (до 0,1 М в конечном растворе) или водорода пероксида (до 10% в конечном растворе). Затем полученные растворы и раствор без добавления разлагающих реагентов термостатировали при 80 °С

в течение 8 ч. Раствор примесей нафтифина, полученных фотолитическим разложением, готовили при облучении УФ-лампой (длина волны 254 нм) раствора, содержащего 10 мкг/мл нафтифина в 0,1% фосфорной кислоте, в течение 8 ч.

**Растворы для количественного определения.** Для определения содержания нафтифина в лекарственных препаратах нафтифина использовали метод внешнего стандарта. Для этого готовили растворы стандартного образца нафтифина с концентрацией около 10 мкг/мл в 0,1% фосфорной кислоте в двух повторениях (стандартный раствор) и растворы лекарственных препаратов нафтифина с той же теоретической концентрацией, рассчитанной с учетом навесок, плотности и разведения препарата (испытуемый раствор). Все растворы после приготовления отфильтровали через шприцевые мембранные фильтры из политетрафторэтилена с размером пор не более 0,45 мкм (Agilent Technologies).

**Оборудование.** Хроматографирование приготовленных растворов проводили на жидкостных хроматографах Agilent 1200 Infinity и Agilent Infinity II 1290 (Agilent Technologies), оснащенных диодно-матричными детекторами. Хроматографические колонки, которые были использованы при проведении валидации методики и оценке возможности их замены, указаны в *таблице 1*.

**Условия анализа.** Объем ввода пробы 5 мкл, скорость потока подвижной фазы 1,0 мл/мин, температура колонки 30 °С, детектирование при 254 нм, подвижная фаза А – 0,1% раствор хлорной кислоты, подвижная фаза Б – ацетонитрил, элюирование проводили в градиентном режиме (*табл. 2*).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По своей структуре нафтифин (I) представляет собой третичный амин с метильным, (1-нафтил) метильным и циннамильным заместителями на атоме азота. Нафтифин не растворим в воде,

**Таблица 1.** Характеристики использованных для анализа нафтифина хроматографических колонок

**Table 1.** Main characteristics of the columns used for naftifine determination

Колонка <i>Column</i>	Длина, мм <i>Length, mm</i>	Внутренний диаметр, мм <i>Inner diameter, mm</i>	Размер частиц, мкм <i>Particle size, µm</i>	Степень покрытия (доля углерода), % <i>Carbon load, %</i>	Площадь поверхности, м <sup>2</sup> /г <i>Surface area, m<sup>2</sup>/g</i>	Свободный объем колонки, мл <i>Empty column volume, mL</i>
XBridge Phenyl	20	4,6	2,5	14,5	185	0,33
XBridge Phenyl	20	4,6	3,5	14,5	185	0,33
Acquity BEH Phenyl	75	2,1	1,7	15	185	0,3

Таблица составлена авторами по данным производителя колонок (Waters Corp.) / The table is prepared by the authors using data of the column manufacturer (Waters Corp.)

Таблица 2. Программа градиентного режима элюирования

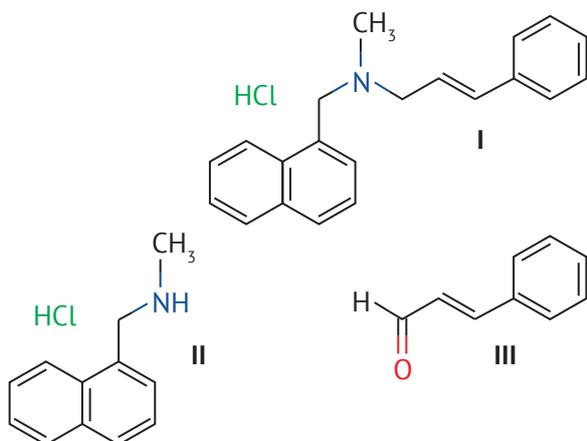
Table 2. Gradient elution programme

Время, мин Time, min	Подвижная фаза А, % Mobile phase A, %	Подвижная фаза Б, % Mobile phase B, %
0	70	30
2	65	35
3	20	80
3,5	70	30
5,5	70	30

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

растворим в этаноле, метаноле, диметилсульфоксиде и других органических растворителях, а также в водных растворах кислот.

Возможными примесями нафтифина являются N-метил-1-нафталинметиламин (II), являющийся исходным продуктом при производстве субстанции, и коричный альдегид (III), близкий по структуре к циннамилхлориду – второму компоненту синтеза субстанции.



Основными критериями для выбора условий хроматографирования были максимально возможное сокращение времени анализа и снижение расхода подвижной фазы. Это было достигнуто за счет использования колонок малого объема (свободный объем около 0,3 мл) и выбора состава подвижной фазы, не требующего длительного уравнивания колонки.

Выбор компонентов подвижной фазы был основан на возможной эффективности разделения, сокращении времени уравнивания колонки и данных о токсичности растворителя. Ацетонитрил выбран как обладающий большей элюирующей силой и при этом менее токсичный компонент по сравнению с метанолом и более

удобный в работе, чем обладающий резким запахом тетрагидрофуран. Хлорная кислота в составе подвижной фазы выбрана как компонент, позволяющий обеспечить растворение нафтифина и при этом не требующий длительного уравнивания колонки в отличие от солей алкилсульфоновых кислот.

Применение колонок малого объема (свободный объем около 0,3 мл) при относительно большой скорости потока подвижной фазы (1 мл/мин) позволяет использовать градиентное элюирование с быстрым изменением состава подвижной фазы и значительно сократить время уравнивания колонки перед последующим анализом.

В качестве неподвижной фазы при хроматографировании использовали колонки с фенилгексилсилильным сорбентом (L11 по классификации USP), поскольку при применении такого сорбента основные примеси нафтифина имеют значительно отличающуюся хроматографическую подвижность.

Пригодность хроматографической системы оценивали по разделению пиков нафтифина и его примесей. При хроматографировании раствора, содержащего около 10 мкг/мл каждого из определяемых компонентов, для пиков N-метил-1-нафталинметиламина и коричневого альдегида разрешение составило  $4,9 \pm 0,1$ , а для пиков коричневого альдегида и нафтифина  $6,9 \pm 0,1$  (рис. 1).

Для спектров поглощения нафтифина и его примесей (рис. 2) характерны максимумы 222 и 254 нм (нафтифин), 222 и 282 нм (N-метил-1-нафталинметиламин) и 206, 222, 290 нм (коричневый альдегид).

Основанием для выбора длины волны стала наибольшая чувствительность хроматографической системы, характеризующаяся соотношением сигнала и шума для пика определяемого компонента. Для количественного определения нафтифина выбрали длину волны 254 нм, поскольку для этого максимума поглощения нафтифина наблюдали низкий уровень шумов и дрейфа базовой линии. Для определения примесей выбрали длину волны 222 нм, при которой чувствительность хроматографической системы была выше, чем при 254 нм.

В таблице 3 представлены основные характеристики методики в зависимости от используемого растворителя и количественного содержания нафтифина в растворе стандартного образца (С, мкг/мл): средние площади пиков нафтифина (S, mAU×с), средний отклик, выраженный как отношение средней площади пика к концентрации

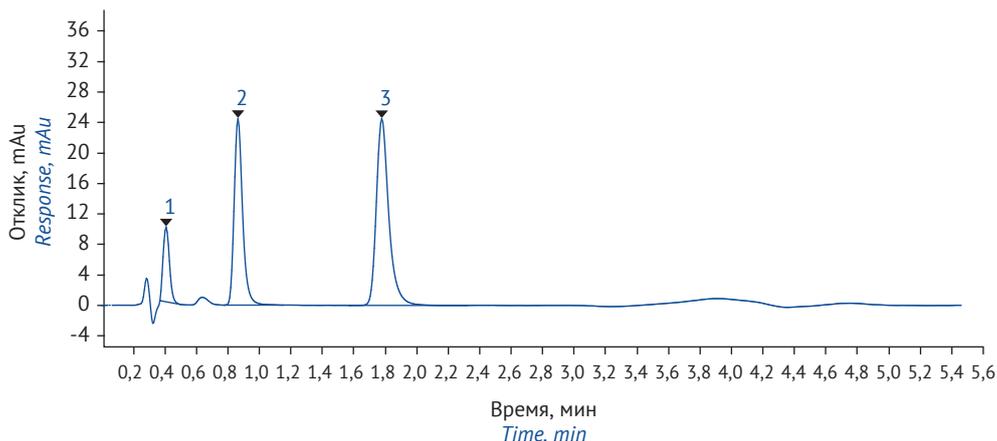


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

**Рис. 1.** Хроматограмма модельного раствора, содержащего по 10 мкг/мл нафтифина (3)  $RT \approx 1,6$  мин, *N*-метил-1-нафталинметиламина (1)  $RT \approx 0,4$  мин и коричного альдегида (2)  $RT \approx 0,8$  мин. Условия анализа: колонка XBridge Phenyl (20×4,6 мм, с размером частиц 2,5 мкм), объем ввода пробы 5 мкл, скорость потока 1,0 мл/мин, температура колонки 30 °С, детектирование при 254 нм, подвижная фаза А – 0,1% водный раствор хлорной кислоты, подвижная фаза Б – ацетонитрил, элюирование в градиентном режиме

**Fig. 1.** Chromatogram of a model solution with 10 µg/mL spikes of naftifine (retention time (RT)≈1.6 min) (3), *N*-methyl-1-naphthalenemethylamine (RT≈0.4 min) (1), and cinnamaldehyde (RT≈0.8 min) (2). Analytical conditions: XBridge Phenyl column (20×4.6 mm, particle size: 2.5 µm), injection volume of 5 µL, flow rate of 1.0 mL/min, column temperature of 30 °C, detection at 254 nm, gradient elution with 0.1% aqueous perchloric acid (mobile phase A) and acetonitrile (mobile phase B)

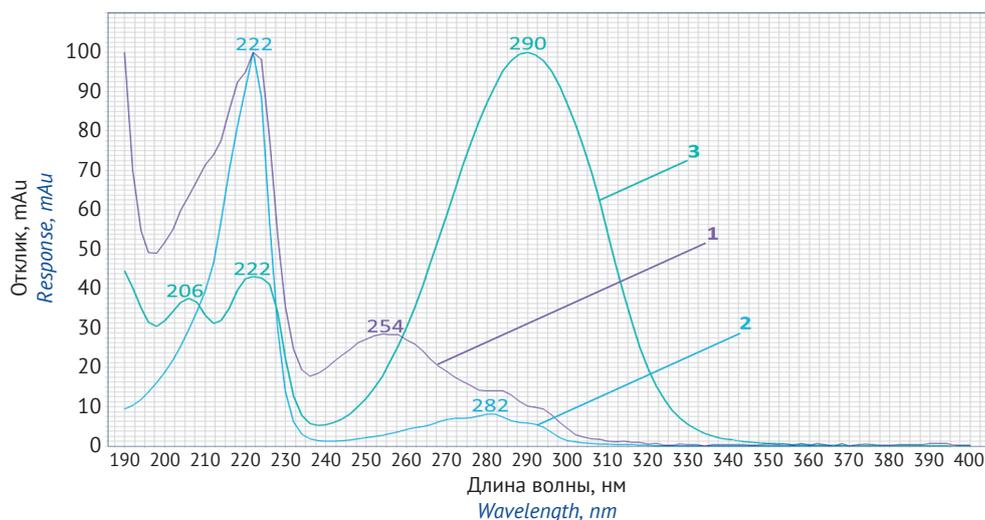


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

**Рис. 2.** УФ-спектры поглощения нафтифина (1), *N*-метил-1-нафталинметиламина (2) и коричного альдегида (3)

**Fig. 2.** UV absorption spectra of naftifine (1), *N*-methyl-1-naphthalenemethylamine (2), and cinnamaldehyde (3)

( $S/C$ , mAU×смл/мкг), относительное стандартное отклонение ( $RSD$ ) полученного значения  $S/C$  для растворов 10 и 200 мкг/мл нафтифина, а также для всей выборки растворов.

Для проверки отсутствия влияния растворителя на форму пика нафтифина, которое могло бы нарушить точность определения площадей пиков, дополнительно определяли средние значения времени удерживания, асимметрии пика и эффективности, выраженной в количестве теоретических тарелок.

$RSD$  отношения  $S/C$  для раствора 10 мкг/мл стандартного образца нафтифина в различных растворителях составило 0,486%, что не превышает 2%, требуемых для соблюдения критериев правильности методики. Растворы 200 мкг/мл стандартного образца нафтифина использовали для проверки сходимости результатов. На хроматограммах этих растворов наблюдали увеличение асимметрии пика и уменьшение количества теоретических тарелок, что свидетельствует о слишком большом количестве аналита

Таблица 3. Изменение характеристик пика нафтифина на хроматограммах в зависимости от используемого растворителя проб

Table 3. Characteristics of the naftifine peak in chromatograms depending on the solvent

Определяемый показатель <i>Measured parameter</i>	Растворитель <i>Solvent</i>									
	10 мкг/мл нафтифина <i>10 µg/mL of naftifine</i>					200 мкг/мл нафтифина <i>200 µg/mL of naftifine</i>				
	P1	P2	P3	P4	P5	P1	P2	P3	P4	P5
S	177,4	207,5	197,5	191,4	180,2	3520,5	4078,6	3914,9	3863,4	3488,0
C	10,15	11,75	11,10	11,00	10,15	202,90	235,00	222,00	220,00	203,00
S/C	17,49	17,57	17,64	17,44	17,62	17,42	17,42	17,56	17,52	17,33
RSD, %	0,486					0,522				
RSD всей выборки, % <i>Total RSD, %</i>	0,566									
Время удерживания, мин <i>Retention time, min</i>	2,22	2,20	2,21	2,19	2,21	2,12	2,10	2,10	2,10	2,11
Количество ТТ <i>NTP</i>	2171	2179	2242	1983	2182	1768	1734	1722	1765	1685
Фактор симметрии <i>Symmetry factor</i>	1,15	1,14	1,16	1,12	1,14	1,34	1,38	1,39	1,37	1,37

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

**Примечание.** P1 – 0,1% раствор фосфорной кислоты, P2 – метанол, P3 – смесь воды и этанола (50:50 об./об.), P4 – этанол, P5 – смесь 0,1% хлорной кислоты и ацетонитрила (70:30 об./об.), S – площадь пика нафтифина, C – концентрация нафтифина в растворе стандартного образца (мкг/мл), S/C – отношение средней площади пика к концентрации нафтифина в растворе, RSD – относительное стандартное отклонение, ТТ – теоретические тарелки.

**Note.** P1, 0.1% phosphoric acid; P2, methanol; P3, water-ethanol mixture (50:50 v/v); P4, ethanol; P5, 0.1% perchloric acid-acetonitrile mixture (70:30 v/v); S, naftifine peak area; C, naftifine concentration in the reference standard solution (µg/mL); S/C, naftifine peak-to-mean concentration ratio of the corresponding solution; RSD, relative standard deviation; NTP, number of theoretical plates.

для данной колонки, однако RSD отношения S/C составило 0,522% (0,566% для всей выборки). На хроматограммах, полученных для растворов нафтифина в этаноле, было отмечено уменьшение числа теоретических тарелок на ≈20% и увеличение ширины пика, при этом другие параметры изменились в допустимых пределах.

В качестве растворителя проб выбрали 0,1% раствор ортофосфорной кислоты как наиболее экономичный и сделали вывод о возможности применения любого из рассмотренных растворителей для приготовления растворов стандартного образца и испытуемых растворов препаратов, для которых может потребоваться альтернативный растворитель. Хроматограммы стандартного и испытуемого растворов представлены на рисунке 3.

Валидацию методики проводили согласно фармакопейным требованиям<sup>3</sup>, оценивали специфичность, аналитическую область, линейность, правильность, внутрилабораторную прецизионность, сходимоссть и устойчивость (робастность) методики. Для проведения валидации выбрали лекарственный препарат в фор-

ме 1% спиртового раствора нафтифина для наружного применения, поскольку входящие в его состав вспомогательные вещества не влияют на хроматографическое поведение нафтифина и растворение препарата не требуется. Для препаратов в форме крема с различным составом вспомогательных веществ могут требоваться значительные корректировки растворителя при пробоподготовке.

**Специфичность.** Хроматографировали растворитель (0,1% ортофосфорная кислота), подвижную фазу (смесь 0,1% хлорной кислоты и ацетонитрила в соотношении 70:30) и модельные растворы, содержащие родственные примеси нафтифина, получая не менее трех хроматограмм каждого раствора. В качестве модельных растворов использовали растворы, содержащие N-метил-1-нафталинметиламин и коричневый альдегид, и растворы, подвергшиеся ускоренному разложению.

На хроматограмме модельного раствора, содержащего по 1000 мкг/мл N-метил-1-нафталинметиламина и коричневого альдегида и 10 мкг/мл нафтифина, обнаружили

<sup>3</sup> ОФС.1.1.0012 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Т. 1. М., 2023.

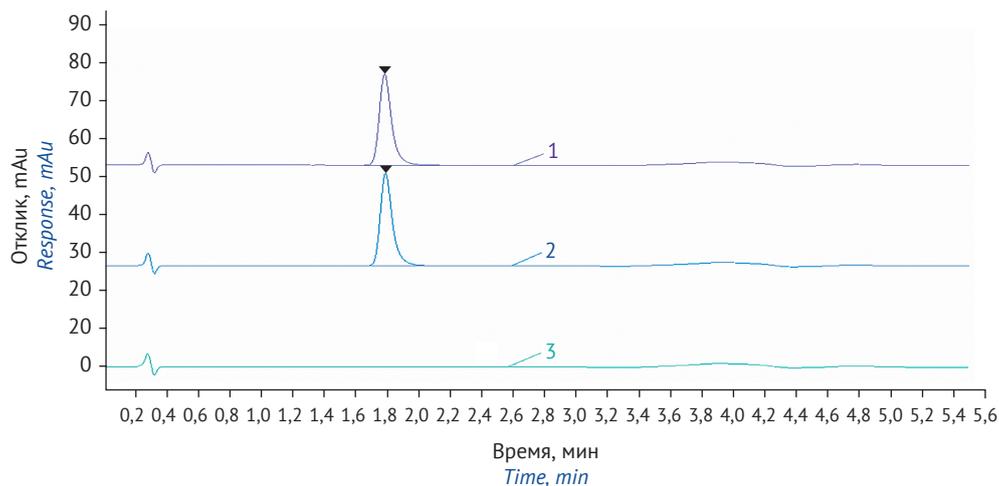


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

**Рис. 3.** Хроматограммы стандартного (1) и испытуемого (2) растворов нафтифина. Растворитель проб – 0,1% ортофосфорная кислота (3). Условия анализа: колонка XBridge Phenyl (20×4,6 мм, с размером частиц 2,5 мкм), объем ввода пробы 5 мкл, скорость потока 1,0 мл/мин, температура колонки 30 °С, детектирование при 254 нм, подвижная фаза А – 0,1% водный раствор хлорной кислоты, подвижная фаза Б – ацетонитрил, элюирование в градиентном режиме

**Fig. 3.** Chromatograms of standard (1) and test (2) solutions of naftifine. Solvent: 0.1% orthophosphoric acid (3). Analytical conditions: XBridge Phenyl column (20×4.6 mm, particle size: 2.5 μm), injection volume of 5 μL, flow rate of 1.0 mL/min, column temperature of 30 °C, detection at 254 nm, gradient elution with 0.1% aqueous perchloric acid (mobile phase A) and acetonitrile (mobile phase B)

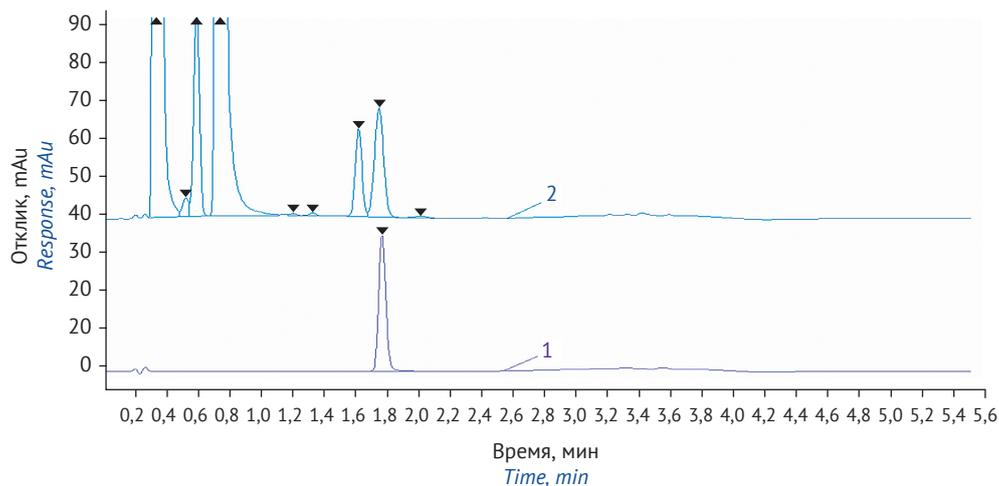


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

**Рис. 4.** Хроматограммы стандартного раствора нафтифина 10 мг/мл (1) и модельного раствора (2), содержащего 10 мкг/мл нафтифина, 1000 мкг/мл N-метил-1-нафталинметиламина и 1000 мкг/мл коричного альдегида. Условия анализа: колонка XBridge Phenyl (20×4,6 мм, с размером частиц 2,5 мкм), объем ввода пробы 5 мкл, скорость потока 1,0 мл/мин, температура колонки 30 °С, детектирование при 254 нм, подвижная фаза А – 0,1% водный раствор хлорной кислоты, подвижная фаза Б – ацетонитрил, элюирование в градиентном режиме

**Fig. 4.** Chromatograms of the 10 mg/mL naftifine reference standard solution (1) and a model solution spiked with 10 μg/mL of naftifine, 1000 μg/mL of N-methyl-1-naphthalenemethylamine, and 1000 μg/mL of cinnamaldehyde (2). Analytical conditions: XBridge Phenyl column (20×4.6 mm, particle size: 2.5 μm), injection volume of 5 μL, flow rate of 1.0 mL/min, column temperature of 30 °C, detection at 254 nm, gradient elution with 0.1% aqueous perchloric acid (mobile phase A) and acetonitrile (mobile phase B)

дополнительный пик примеси коричневого альдегида, элюирующейся вблизи пика нафтифина (рис. 4). Концентрация примесей в модельном растворе в 100 раз больше концентрации нафтифина, при этом площади пика нафтифина на хроматограммах модельного и стандартного растворов различаются менее чем на 10%.

Таким образом, присутствие данных примесей даже в значительных количествах не оказывает существенного влияния на определение содержания нафтифина в препарате.

На хроматограммах растворов, полученных после термического, кислотного и щелочного разложения нафтифина, не обнаружили новых

пиков примесей по сравнению со стандартным раствором, что свидетельствует об устойчивости нафтифина в данных условиях.

После окислительного и фотолитического разложения нафтифина на хроматограммах соответствующих растворов обнаружили новые пики примесей, а площадь пика нафтифина значительно уменьшилась. Пики примесей имеют разрешение с пиком нафтифина не менее 2,0 и не влияют на количественное определение нафтифина в растворе.

**Аналитическая область методики.** С учетом лекарственных форм, в которых препараты нафтифина представлены на российском фармацевтическом рынке (растворы для наружного применения и кремы для наружного применения), была определена аналитическая область методики. В диапазоне 80–120% от предлагаемой концентрации нафтифина в испытуемом растворе (10 мкг/мл) проводили определение линейности, правильности и прецизионности методики.

**Линейность.** Для определения зависимости величины сигнала от концентрации определяемого вещества в испытуемом растворе готовили пять растворов, содержащих 8, 9, 10, 11 и 12 мкг/мл стандартного образца нафтифина

в 0,1% фосфорной кислоте, соответствующих уровням концентрации 80, 90, 100, 110 и 120%. Зависимость площади пика нафтифина на хроматограммах полученных растворов от его концентрации описывается линейным уравнением регрессии  $y=18,536x-1,4793$ . Аппроксимация линейной регрессии считается приемлемой при значениях коэффициента корреляции ( $R$ ) не менее 0,99, для нафтифина в диапазоне концентраций от 80 до 120%  $R^2$  составил 0,9943, что подтверждает линейность методики.

**Правильность.** Открываемость результатов при оценке правильности методики должна находиться в диапазоне от 98,0 до 102,0%<sup>4</sup>. Готовили два стандартных раствора нафтифина (10 мкг/мл) для расчета сходимости между ними, а также три испытуемых раствора препарата, содержащих около 8, 10 и 12 мкг/мл нафтифина (табл. 4). Концентрацию нафтифина в испытуемом растворе ( $C_{исп}$ ) определяли методом внешнего стандарта по формуле (1):

$$C_{исп} = S_{исп} \times \bar{O}_{ст} \quad (1)$$

где  $S_{исп}$  – площадь пика нафтифина на хроматограмме испытуемого раствора,  $\bar{O}_{ст}$  – среднее значение отклика пика нафтифина ( $O_{ст}$ ), рассчитанного по формуле (2) для двух последовательных

Таблица 4. Результаты оценки правильности методики количественного определения нафтифина

Table 4. Accuracy assessment results for the analytical procedure for the quantitative determination of naftifine

Уровень содержания, % Content level, %	Навеска препарата, мг Sample weight (medicinal product), mg	Площадь пика, mAu×с Peak area, mAu×с	Найденная концентрация нафтифина в испытуемом растворе, мкг/мл Calculated naftifine concentration (test solution), µg/mL	Найденное содержание нафтифина в препарате, мг/мл Calculated naftifine content (medicinal product), mg/mL	Открываемость, % Recovery, %
80	8209,44	131,58	7,47	9,80	100,09
		131,68	7,47	9,81	100,17
		131,70	7,47	9,81	100,19
100	10665,80	171,03	9,71	9,81	100,17
		171,32	9,72	9,83	100,34
		171,13	9,71	9,81	100,22
120	13014,44	208,56	11,84	9,80	100,05
		208,66	11,84	9,80	100,10
		209,01	11,86	9,82	100,27
Среднее значение Mean				9,81±0,01	100,18±0,06
RSD, %				0,09	

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

**Примечание.** RSD – относительное стандартное отклонение.

**Note.** RSD, relative standard deviation.

<sup>4</sup> Там же.

хроматограмм стандартного раствора, полученных до и после хроматографирования испытуемого раствора.

$$O_{\text{ст}} = \frac{a_{\text{ст}} \times P_{\text{ст}}}{\bar{S}_{\text{ст}} \times V_{\text{ст}}}, \quad (2)$$

где  $a_{\text{ст}}$ ,  $P_{\text{ст}}$ ,  $V_{\text{ст}}$  – навеска, чистота и объем разведения стандартного образца нафтифина соответственно,  $\bar{S}_{\text{ст}}$  – средняя площадь пика нафтифина на хроматограммах стандартного раствора. Содержание нафтифина в препарате рассчитывали по формуле (3):

$$X_{\text{исп}} = \frac{C_{\text{исп}} \times V_{\text{исп}}}{a_{\text{исп}} \times \rho_{\text{исп}}}, \quad (3)$$

где  $a_{\text{исп}}$ ,  $\rho_{\text{исп}}$ ,  $V_{\text{исп}}$  – навеска, плотность и объем разведения препарата нафтифина соответственно,  $C_{\text{исп}}$  – концентрация нафтифина в испытуемом растворе.

Для вычисления открываемости использовали известное значение содержания нафтифина в препарате  $9,79 \pm 0,09$  мг/мл, определенное по методике производителя. Открываемость (%) рассчитывали как отношение определенного значения содержания нафтифина в препарате к известному.

Среднее значение открываемости составило  $100,18 \pm 0,06\%$  и находилось в границах диапазона приемлемости и диапазона известного значения содержания нафтифина в препарате. Полученные результаты подтверждают правильность разработанной аналитической методики.

**Внутрилабораторная прецизионность и сходимость.** Анализ отдельных проб испытуемого

образца, отобранных в одной и той же серии, проводили два аналитика в разные дни на разном оборудовании с применением одних и тех же реактивов. Сходимость результатов определения содержания нафтифина для каждого аналитика оценивали по значению *RSD*, которое не должно было превышать 2,0%. Внутрилабораторную прецизионность определяли по значению *RSD* для общей выборки результатов двух аналитиков, также оценивали пересечение доверительных интервалов средних значений содержания нафтифина (табл. 5). Значение *RSD* не должно было превышать 2,0%, а пересечение доверительных интервалов считали приемлемым, если среднее значение содержания нафтифина, полученного каждым из аналитиков, находилось в границах доверительного интервала другого аналитика.

Значение *RSD* найденного содержания нафтифина не превышало 2,0% для каждого аналитика (0,59 и 0,26%). Для общей выборки результатов двух аналитиков *RSD* составило 0,44%, средние значения, полученные каждым аналитиком, находились в границах интервала другого аналитика. Полученные результаты подтверждают внутрилабораторную прецизионность и сходимость методики.

**Устойчивость.** Для оценки устойчивости методики количественного определения нафтифина при изменении условий проведения анализа хроматографировали стандартный раствор нафтифина концентрацией 10 мкг/мл и регистрировали влияние следующих параметров на результат:

- изменение температуры термостата колонок (от 20 до 60 °С);
- изменение скорости потока ( $\pm 20\%$ );

Таблица 5. Результаты оценки прецизионности и сходимости методики количественного определения нафтифина

Table 5. Precision and repeatability assessment results for the analytical procedure for the quantitative determination of naftifine

Найденное содержание нафтифина, мг/мл <i>Calculated naftifine content, mg/mL</i>		Оценка сходимости <i>Repeatability assessment</i>		Оценка внутрилабораторной прецизионности <i>Interlaboratory precision assessment</i>	
Аналитик 1 <i>Analyst 1</i>	Аналитик 2 <i>Analyst 2</i>	Аналитик 1 <i>Analyst 1</i>	Аналитик 2 <i>Analyst 2</i>	Среднее значение <i>Mean</i>	<i>RSD</i> , %
9,63	9,72	9,72±0,05 <i>RSD</i> =0,59%	9,71±0,02 <i>RSD</i> =0,26%	9,71±0,04	0,44
9,79	9,73				
9,70	9,69				
9,73	9,70				
9,68	9,69				
9,77	9,75				

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

**Примечание.** *RSD* – относительное стандартное отклонение.

**Note.** *RSD*, relative standard deviation.

## Определение содержания нафтифина и продуктов его деструкции в лекарственных препаратах методом ВЭЖХ...

- изменение длины волны детектора ( $\pm 2$  нм от заданного значения 254 нм);
  - использование альтернативных колонок (табл. 1).
  - изменение площади пика нафтифина составляет от 0,8 до 1,5;
  - число теоретических тарелок по пику нафтифина составляет не менее 2000;
  - изменение площади пика нафтифина относительно полученной в стандартных условиях проведения анализа удовлетворяет критериям правильности и находится в диапазоне  $\pm 2\%$ .
- Влияние изменений перечисленных параметров на результат анализа считали незначительным при соблюдении следующих характеристик пригодности системы:
- $RSD$  площади пика нафтифина не превышает 2,0%;
  - $RSD$  времени удерживания пика нафтифина не превышает 2,0%;
- Результаты проведенных тестов, а также их соответствие критериям приемлемости приведены в таблице 6.

Таблица 6. Результаты оценки устойчивости методики количественного определения нафтифина при изменении условий анализа

Table 6. Robustness assessment results for the analytical procedure for the quantitative determination of naftifine (with changes in the analytical conditions)

Параметр системы System parameter	Значение параметра Parameter value	$RSD_s$ , %	$RSD_t$ , %	Симметрия пика Peak symmetry	Количество ТТ NTP	$\Delta S$ , %
Температура термостата колонок, °С Column oven temperature, °C	20	0,45	0,06	1,32	6206	-0,28
	25	0,72	0,05	1,13	3186	-0,19
	28	0,65	0,05	1,11	3200	-0,30
	30	0,65	0,05	1,12	3189	-
	32	0,79	0,05	1,28	3196	-0,03
	35	0,81	0,05	1,42	3189	-0,46
	40	0,61	0,09	1,46	3099	-0,49
	50	0,61	0,11	1,41	2922	-0,34
Скорость потока, мл/мин Flow rate, mL/min	0,8	0,30	0,26	1,36	2831	-0,60
	0,9	0,24	0,47	1,36	2652	-0,46
	1,0	0,20	0,20	1,38	2525	-
	1,1	0,17	0,18	1,39	2434	-0,09
	1,2	0,30	0,22	1,35	2320	0,35
Длина волны детектора, нм Detection wavelength, nm	252	0,13	0,07	1,21	2660	-1,59
	254	0,19	0,07	1,21	2660	-
	256	0,30	0,07	1,21	2660	-0,38
Замена колонки Column replacement	3,5 мкм* 3.5 $\mu\text{m}^*$	0,11	0,02	1,45	2150	1,58
	2,5 мкм* 2.5 $\mu\text{m}^*$	0,19	0,07	1,21	2660	-
	75×2,1 мм, 1,7 мкм** 75×2.1 mm, 1.7 $\mu\text{m}^{**}$	0,08	0,08	1,30	8567	0,16

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

**Примечание.**  $RSD_s$  – относительное стандартное отклонение площади пика,  $RSD_t$  – относительное стандартное отклонение времени удерживания, ТТ – теоретические тарелки.

\* колонка XBridge Phenyl.

\*\* колонка Acquity BEH Phenyl.

**Note.**  $RSD_s$ , relative standard deviation of the peak area;  $RSD_t$ , relative standard deviation of the retention time; NTP, number of theoretical plates.

\* XBridge Phenyl column.

\*\* Acquity BEH Phenyl column.

При изменении температуры термостатирования хроматографической колонки в диапазоне 25–60 °С не наблюдали значительных изменений характеристик пиков. При температуре 20 °С обнаружили увеличение числа теоретических тарелок для пика нафтифина, что связано с увеличением времени удерживания пика и его элюированием на другой стадии градиентной программы. При таком режиме элюирования есть вероятность наложения пика нафтифина на пики примесей и получения ошибочных результатов анализа. Влияния других параметров системы на характеристики ее пригодности не обнаружили.

При изменении скорости потока учитывали, что особенностью проточного спектрофотометрического детектора является изменение времени нахождения детектируемого вещества в ячейке детектора. Поэтому в расчетах при определении влияния скорости потока на результат значение площади пика нафтифина умножали на соответствующее значение скорости потока подвижной фазы (мл/мин). На основании полученных данных подтвердили, что при учете пересчета площадей система остается устойчивой к изменениям скорости потока элюента. При проведении анализа при измененной, но постоянной в течение анализа скорости потока, значительных влияний на результаты не обнаружили.

Изменение длины волны детектора в диапазоне  $\pm 2$  нм от заданного значения не оказало существенного влияния на результат анализа. При замене хроматографической колонки также не обнаружили значительных различий в результатах количественного определения нафтифина. Однако при использовании колонки Acquity BEH Phenyl большей длины и с частицами меньшего размера (75 $\times$ 2,1 мм, 1,7 мкм) обнаружили значительное увеличение эффективности хроматографического разделения, что может улучшить определение примесей нафтифина и послужить основой для более детального анализа. За счет изменения диаметра колонки ее свободный объем отличается незначительно (табл. 1), вследствие чего не происходит изменения времени удерживания пика нафтифина. Недостатком такой замены можно считать дополнительные требования к хроматографической системе, связанные с большим давлением на колонке Acquity BEH Phenyl, что требует использования хроматографа

системы ультраэффективной жидкостной хроматографии (УВЭЖХ).

Полученные результаты позволили подтвердить, что внесение изменений в условия проведения анализа не приводит к значительным изменениям результатов определения содержания нафтифина.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования была разработана эффективная ВЭЖХ-методика количественного определения нафтифина в лекарственных средствах, которая позволяет сократить время анализа (время удерживания нафтифина – около 2 мин) и свести к минимуму расход используемых реагентов с сохранением критериев пригодности хроматографической системы. В ходе исследований определены оптимальные условия анализа: колонка XBridge Phenyl (20 $\times$ 4,6 мм, с размером частиц 2,5 мкм), температура колонки 30 °С, подвижная фаза А – 0,1% раствор хлорной кислоты, подвижная фаза Б – ацетонитрил, элюирование в градиентном режиме с увеличением доли ацетонитрила от 30 до 80%, скорость потока подвижной фазы 1,0 мл/мин, объем ввода пробы 5 мкл, детектирование при 254 нм для количественного определения нафтифина и 222 нм для определения примесей.

Показана возможность использования разных растворителей для приготовления испытуемого раствора для препаратов различных лекарственных форм без значимых изменений хроматографических параметров.

Проведена валидация разработанной методики, подтверждены ее специфичность, аналитическая область (концентрация растворов от 8 до 12 мг/мл), линейность ( $R^2$  составил 0,9943), правильность ( $RSD$  составило 0,09%), сходимость ( $RSD$  составило 0,59%), внутрилабораторная прецизионность ( $RSD$  составило 0,44%) и робастность. Полученные результаты валидации соответствуют требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации и свидетельствуют о пригодности и воспроизводимости разработанной методики.

Выбраны предварительные условия анализа для определения содержания примесей нафтифина. Установлена возможность их разделения и предварительно определена длина волны детектирования (222 нм).

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Gupta AK, Ryder JE, Cooper EA. Naftifine: a review. *J Cutan Med Surg.* 2008;12(2):51–8. <https://doi.org/10.2310/7750.2008.06009>
- Trailokya AA, Shirsat AB, Madhu R, Shah B. Naftifine: a topical allylamine for superficial dermatophytosis. *J Assoc Physicians India.* 2023;71(5):11–2. <https://doi.org/10.5005/japi-11001-0241>
- Mühlbacher JM. Naftifine: a topical allylamine antifungal agent. *Clin Dermatol.* 1991;9(4):479–85. [https://doi.org/10.1016/0738-081x\(91\)90076-w](https://doi.org/10.1016/0738-081x(91)90076-w)
- Šveikauskaitė I, Briedis V. Potential of naftifine application for transungual delivery. *Molecules.* 2020;25(13):3043. <https://doi.org/10.3390/molecules25133043>
- Косенкова СИ, Краснюк ИИ, Краснюк (мл.) ИИ, Беяцкая АВ, Степанова ОИ, Нарышкин СР. Оценка возможности использования метода УФ-спектрофотометрии для разработки количественного определения нафтифина гидрохлорида в его растворе с комбинацией ПЭГ для лечения грибковых инфекций. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2020;9(1):35–8.
- Kosenkova SI, Krasnyuk II, Krasnyuk (Jr.) II, Belyatskaya AV, Stepanova OI, Naryshkin SR. Evaluation of the possibility of using the method of UV spectrophotometry for the development of quantitative determination of naftifine hydrochloride in its solution with a combination of PEG for the treatment of fungal infections. *Drug Development & Registration.* 2020;9(1):35–8 (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-1-35-38>
- de Oliveira CH, Barrientos-Astigarraga RE, de Moraes MO, Bezerra FA, de Moraes ME, de Nucci G. Terbinafine quantification in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry: application to a bioequivalence study. *Ther Drug Monit.* 2001;23(6):709–16. <https://doi.org/10.1097/00007691-200112000-00019>
- Gurule S, Khuroo A, Monif T, Goswami D, Saha A. Rational design for variability minimization in bioanalytical method validation: illustration with LC-MS/MS assay method for terbinafine estimation in human plasma. *Biomed Chromatogr.* 2010;24(11):1168–78. <https://doi.org/10.1002/bmc.1423>

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: И.Ю. Якупов — идея, написание и графическое оформление текста рукописи, разработка хроматографических условий и проведение испытаний, выполнение валидации методики, интерпретация полученных результатов; С.И. Кулешова — разработка концепции исследования, критический пересмотр текста рукописи, анализ результатов; О.Н. Высочанская — проведение валидации, написание и графическое оформление текста рукописи; Е.П. Симонова — разработка условий проведения испытания, выполнение валидации методики.

**Authors' contributions.** All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Ilya Yu. Yakupov conceived the study idea, drafted the manuscript, designed the graphical material, developed the chromatographic conditions, conducted testing, validated the analytical procedure, and interpreted the results obtained. Svetlana I. Kuleshova conceptualised the study, critically revised the manuscript, and analysed the study results. Olga N. Vysochanskaya conducted validation, drafted the manuscript, and designed the graphical material. Elena P. Simonova developed the testing conditions and validated the analytical procedure.

## ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Якупов Илья Юрьевич / Ilya Yu. Yakupov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3068-0396>

Кулешова Светлана Ивановна, канд. биол. наук / Svetlana I. Kuleshova, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9103-9239>

Высочанская Ольга Николаевна / Olga N. Vysochanskaya

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4327-6640>

Симонова Елена Павловна / Elena P. Simonova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2221-5534>

Поступила 29.08.2024

После доработки 29.10.2024

Принята к публикации 04.12.2024

Received 29 August 2024

Revised 29 October 2024

Accepted 4 December 2024