

### РОЗРОБЛЕННЯ ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИК ВИЗНАЧЕННЯ ФЕНІТОЇНУ В СЕЧІ МЕТОДОМ ГАЗОРІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

**Ключові слова:** валідація, біоаналітичні методики, газорідина хроматографія, фенітоїн, метод калібрувального графіка

Розроблення методик визначення сильнодіяних лікарських препаратів у біологічних рідинах людини для застосування в судовій та клінічній токсикології є однією з актуальних проблем фармацевтичної науки, але в останнє десятиріччя набагато суттєвішою і широко обговорюваною проблемою аналітичної токсикології стає валідація таких аналітичних методик [1–4].

Наявні міжнародні рекомендації з валідації біоаналітичних методик [3, 4] мають загальний характер та можуть піддаватися дуже широкому трактуванню. Це створює певні труднощі у разі спроби порівняти параметри різних методик визначення, запропонованих різними авторами, та результати, одержані за допомогою таких методик.

Враховуючи досвід розроблення в Україні стандартизованих процедур валідації [5], нами було запропоновано підходи до визначення та оцінювання таких основних валідаційних параметрів, як специфічність, ступінь ізолювання, лінійність, прецизійність та правильність, для методик кількісного визначення аналітів у біологічних рідинах, які застосовують в судово-токсикологічному аналізі, у варіанті використання методу калібрувального графіка [6–9].

Розроблені підходи успішно застосовано до методик з використанням оптичних методів аналізу (УФ-спектрофотометрія та екстракційна фотометрія) [6–8, 10]. Викликає інтерес апробація зазначених процедур валідації на хроматографічних методиках аналізу, тому **метою** цієї роботи є розроблення методик кількісного визначення фенітоїну в сечі із використанням різних процедур пробопідготовки на базі запропонованої раніше [11] методики визначення цього аналіту методом газорідинної хроматографії (ГРХ) і здійснення валідації розроблених методик у варіанті методу калібрувального графіка відповідно до запропонованих авторами підходів [6–9] для вибору оптимальної методики виділення фенітоїну з біологічної матриці.

#### Матеріали та методи дослідження

В експерименті використовували фенітоїн фармакопейної чистоти. Порядок приготування стандартних, робочих та модельних розчинів, а також калібрувальних та модельних зразків, подано на рис. 1.

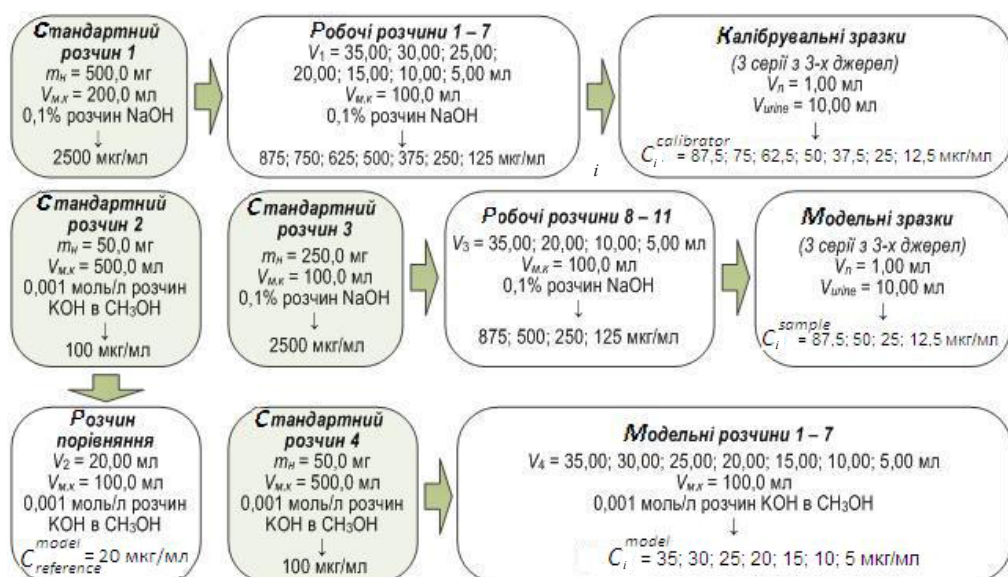


Рис. 1. Процедура приготування розчинів та зразків для валідації методик визначення фенітоїну в сечі методом ГРХ

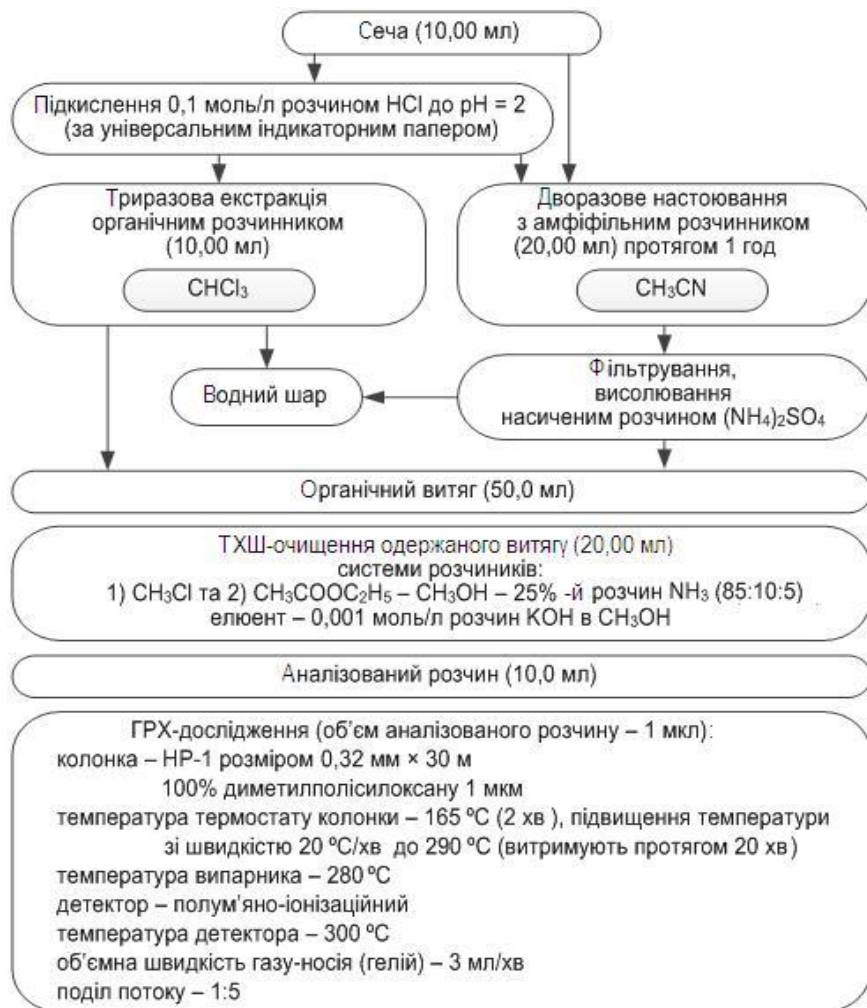


Рис. 2. Основні етапи методик визначення фенітоїну в сечі методом ГРХ

Дизайн експерименту з розроблення методик визначення фенітоїну в сечі методом ГРХ подано на рис. 2.

Для кожної із розроблених методик аналізували калібрувальні та модельні зразки (рис. 1), а також blank-зразки, що приготовано таким чином: 5 зразків (10,00 мл) сечі, отриманої від різних джерел, в які введено по 1,00 мл 0,1%-го розчину натрію гідроксиду.

Хроматографування кожного аналізованого розчину здійснювали три рази або, за необхідності, більше, керуючись запропонованими нами вимогами до збіжності площ піків  $S$  для повторних інжекцій – відносно стандартне відхилення середнього результату  $RSD_{nom}$ , визначене відносно номінального значення площі піка  $S_{nom}$ , не має перевищувати:

$$RSD_{nom} = \frac{s}{S_{nom}} \cdot 100\% \leq \frac{0,1 \cdot \max \Delta_{As} \cdot \sqrt{n}}{t(95\%, n-1)} = \begin{cases} 1,47\%; n=3 \\ 1,88\%; n=4 \\ 2,22\%; n=5 \\ 2,52\%; n=6 \end{cases},$$

$$S_{nom} = S_{min} = \bar{S}_{25\%}^{sample},$$

де  $\max \Delta_{As}$  – максимально допустима відносна невизначеність методики аналізу,  $\max \Delta_{As} = 20\%$  [4, 9–13];

$\bar{S}_{25\%}^{sample}$  – середнє значення площі піка, одержане під час аналізу модельних зразків з концентрацією аналіту, що відповідає точці 25% в нормалізованих координатах (див. пояснення в тексті).

### Результати дослідження та обговорення

Раніше авторами було розроблено ГРХ-методику кількісного визначення фенітоїну [11] та показано її специфічність відносно інших лікарських препаратів, що є його фармакологічними аналогами. Зазначену методику було застосовано для оцінювання ефективності ізолювання фенітоїну з сечі шляхом настоювання з 0,1 моль/л розчином кислоти хлористоводневої та подальшої екстракції хлороформом в кислому середовищі (рН = 2) – ступінь ізолювання становить ~75% [11].

Нами застосовано метод ГРХ для розроблення методики кількісного визначення фенітоїну в сечі з використанням зазначеної процедури пробопідготовки. Окрім того, для підвищення ефективності ізолювання фенітоїну з сечі запропоновано робити її настоювання з амфіфільними розчинниками (після підкислення до рН = 2 – як у запропонованій раніше методиці [11] – і без додаткової обробки) з подальшим відокремленням органічного шару в умовах насичення водної фази електролітом – підхід, що користується широкою популярністю в сучасному судово-токсикологічному аналізі [2, 12, 13]. У роботі використано такий амфіфільний розчинник як ацетонітрил, як електроліт для насичення водної фази використовували амонію сульфат.

Таким чином, підсумком цього етапу роботи стала розробка низки методик визначення фенітоїну в сечі, що відрізняються процедурами пробопідготовки (рис. 2).

Для вибору оптимальної методики визначення фенітоїну в сечі здійснювали валідацію всіх розроблених методик за такими параметрами як специфічність, ступінь ізолювання, лінійність, правильність, збіжність та внутрішньолaborаторна прецизійність відповідно до запропонованих нами підходів у варіанті методу калібрувального графіка [6–9].

Процедура валідації передбачає використання нормалізованих координат. Для нормалізації одержаних експериментальних даних використовували розчин

порівняння з концентрацією аналіту, що відповідає його концентрації в кінцевому аналізованому розчині за умови нульових втрат для точки 100% в нормалізованих координатах. Для нормалізації значень площ піків калібрувальних та модельних зразків площа піка розчину порівняння коректується з урахуванням ступеня ізолювання, значущість та величину якого показано на попередньому етапі валідації.

Діапазон застосування методик  $D = 25\text{--}175\%$ ; кількість концентраційних рівнів  $g = 7$  з постійним кроком 25%; за 100% вважали середню токсичну концентрацію фенітоїну в крові [2] – 50 мкг/мл.

Валідацію методик на першому етапі виконували з використанням модельних розчинів (процедура визначення та критерії прийнятності наведено на рис. 3) виходячи з того, що невизначеність кількісного визначення аналіту в модельних розчинах  $\Delta_{As}^{model}$  є незначущою порівняно з повною невизначеністю результатів аналізу  $\Delta_{As}$  [7–9]; сумарні результати валідації подано в табл. 1.

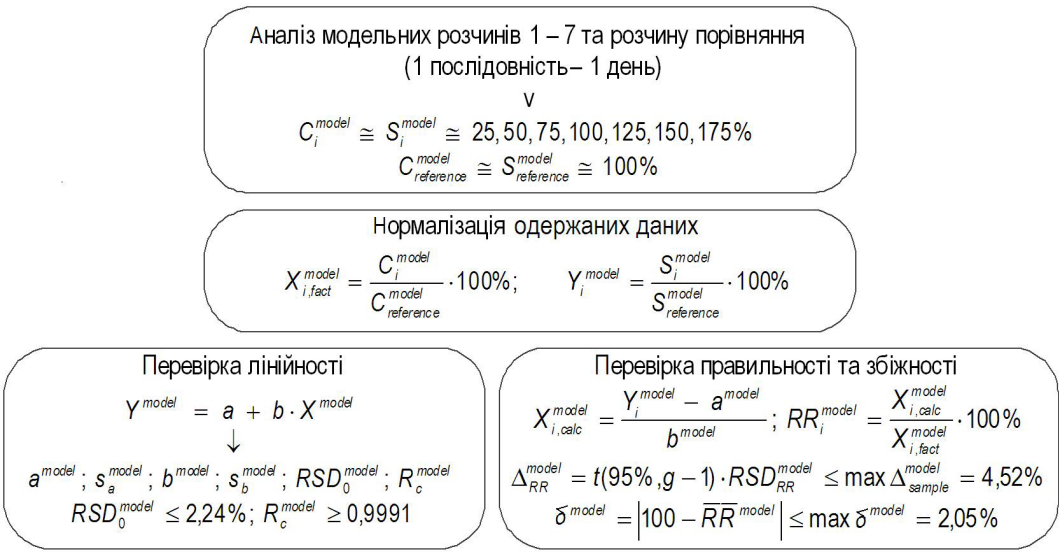


Рис. 3. Етапи валідації ГРХ-методики визначення фенітоїну з використанням модельних розчинів

Т а б л и ц я 1

**Результати валідації методики визначення фенітоїну методом ГРХ,  
одержані з використанням модельних розчинів**

Лінійність	Характеристика					
	$b^{model}$	$s_b^{model}$	$a^{model}$	$s_a^{model}$	$RSD_0^{model}$	$R_c^{model}$
	1,005	0,011	0,354	1,219	1,44	0,9997
Критерій прийнятності	—	—	—	—	$\leq 2,24\%$	$\geq 0,9991$
					соотв.	соотв.
Правильність і збіжність	Характеристика					
	$\overline{RR}^{model}$		$RSD_{RR}^{model}$	$\delta^{model}$		$\Delta_{RR}^{model}$
	100,14		1,72	0,14		3,34
Критерій прийнятності	—	—	$\leq 2,05\%$		$\leq 4,52\%$	
			соотв.		соотв.	

Таким чином, ГРХ-методика кількісного визначення фенітоїну характеризується задовільною лінійністю, правильністю та збіжністю, що дає можливість

рекомендувати її до подальшого застосування в судовій токсикології з метою розроблення методик аналізу біологічних об'єктів на вміст в них фенітоїну.

На другому етапі робили валідацію методик з використанням калібрувальних та модельних зразків – процедура визначення та критерії прийнятності наведено на рис. 4.

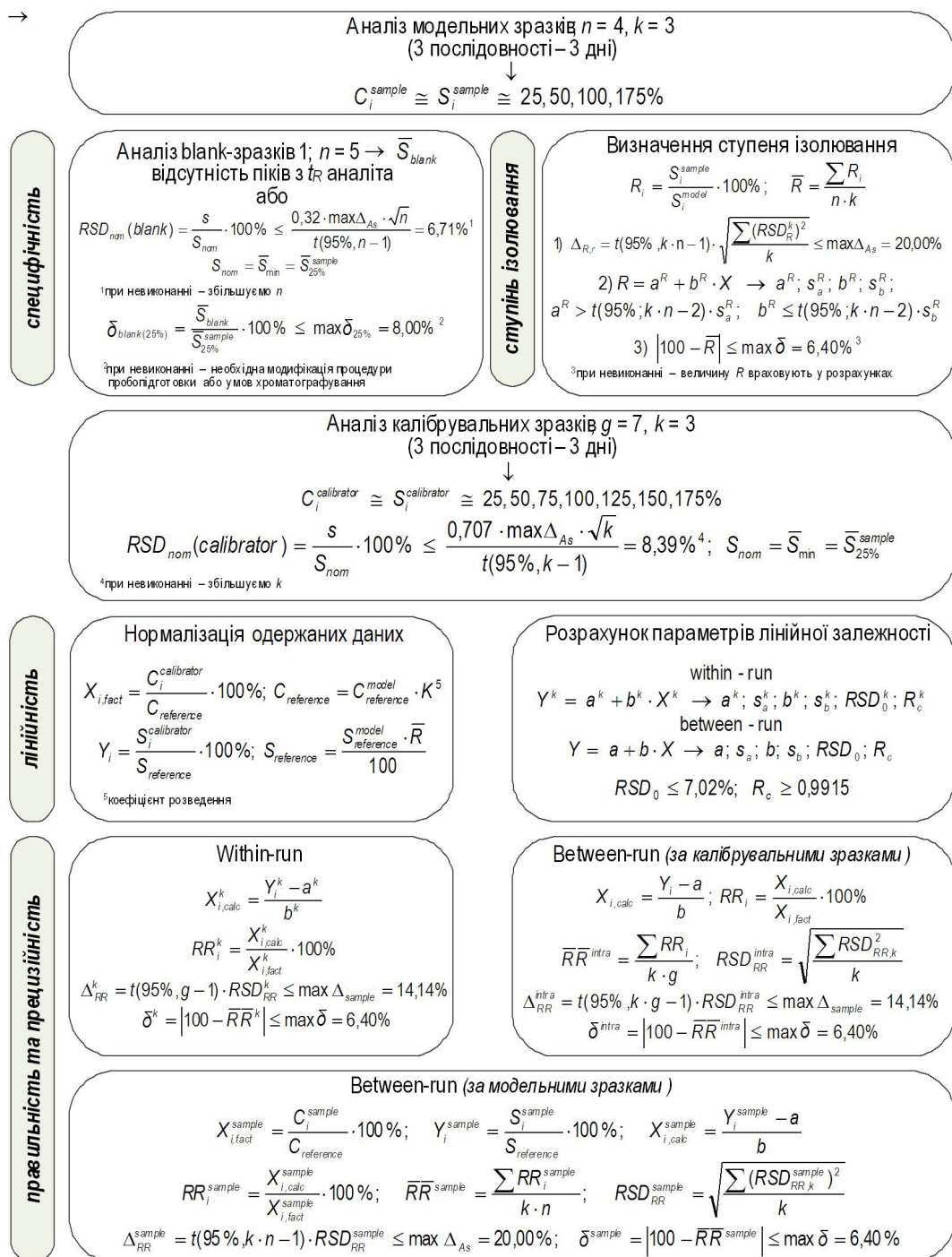


Рис. 4. Етапи валідації ГРХ-методик визначення фенітоїну в сечі із використанням модельних та калібрувальних зразків



Сумарні результати валідації подано в табл. 2, вони дають змогу вважати прийнятними показники специфічності, ступеня ізолювання, лінійності, правильності, збіжності та внутрішньолабораторної прецизійності всіх трьох розроблених ГРХ-методик кількісного визначення фенітоїну в сечі.

Т а б л и ц я 2

**Сумарні результати валідації ГРХ-методик визначення фенітоїну в сечі**

Параметр	Процедура ізолювання									Критерій прийнятності
	CHCl <sub>3</sub> (pH = 2)			CH <sub>3</sub> CN (pH = 2)			CH <sub>3</sub> CN			
Ступінь ізолювання										
$\bar{R}$	76,86			97,95			85,04			–
$\Delta_{Rf}$	8,32			6,01			5,11			≤ 20,00%
$b^R / s_b^R$	–0,013 / 0,019			–0,008 / 0,017			–0,005 / 0,014			$b^R \leq 1,812 \cdot s_b^R$
$a^R / s_a^R$	77,98 / 1,98			98,68 / 1,76			85,44 / 1,42			$a^R > 1,812 \cdot s_a^R$
$ 100 - \bar{R} $	23,14			2,05			14,96			≤ 6,40%
Лінійність										
$a^k$	0,731	–	1,524	–	1,383	–	0,549	0,616	–	≤ 7,02%
$a$	0,120			–0,123			0,330			
$b^k$	0,984	1,004	0,968	1,002	0,993	1,006	1,001	1,000	1,011	
$b$	0,985			1,000			1,004			
$RSD_0^k$	2,00	1,51	2,50	2,29	1,68	1,69	1,76	1,06	3,02	
$RSD_0$	1,38			1,42			1,48			≥ 0,9915
$R_c^k$	0,999	0,999	0,999	0,999	0,999	0,999	0,999	0,999	0,998	
	4	7	0	3	6	6	6	8	7	
$R_c$	0,9997			0,9997			0,9997			
Правильність										
$\bar{R}R^k$	100,3	96,89	102,5	98,60	101,7	97,95	100,2	101,1	98,85	–
	7		3		1		6	5		
$\delta^k$	0,37	3,11	2,53	1,40	1,71	2,05	0,26	1,15	1,15	≤ 6,40%
$\bar{R}R^{intra}$	99,90			99,41			100,08			–
$\delta^{intra}$	0,10			0,59			0,08			≤ 6,40%
$\bar{R}R^{sample}$	101,31			99,79			99,47			–
$\delta^{sample}$	1,31			0,21			0,53			≤ 6,40%
Прецизійність										
$RSD_{RR}^k$	2,93	3,59	3,25	2,29	1,47	4,92	3,03	2,07	4,32	–
$\Delta_{RR}^k$	5,69	6,98	6,32	4,45	2,86	9,56	5,89	4,02	8,39	≤ 14,14%
$RSD_{RR}^{intra}$	3,27			3,26			3,28			–
$\Delta_{RR}^{intra}$	5,64			5,62			5,66			≤ 14,14%
$RSD_{RR}^{sample}$	3,91			3,15			3,44			–
$\Delta_{RR}^{sample}$	7,02			5,66			6,17			≤ 20,00%

Результати аналізу свідчать про відсутність на хроматограмах blank-зразків піків, що мають час утримування, який співпадає або близький до часу утримування фенітоїну, для всіх варіантів процедур ізолювання аналіту із сечі, що вказує на прийнятну специфічність розроблених методик відносно компонентів біологічної матриці.

За результатами вивчення ступеня ізолювання найбільша ефективність виділення фенітоїну із сечі фіксується у разі виконання експерименту за  $\text{pH} = 2$  і використання ацетонітрилу. Відтворюваність значень ступеня ізолювання відповідає критеріям прийнятності для всіх варіантів методик.

Для методик з використанням ацетонітрилу розрахунок параметрів лінійності, правильності та прецизійності робили як із виконанням корекції на величину  $R$ , так і без неї – відсутність такої корекції не призводить до значущого погіршення валідаційних параметрів методики.

Загалом, всі досліджені методики характеризуються задовільними параметрами лінійності, правильності та прецизійності – для методики з виконанням екстракції хлороформом у кислому середовищі ці показники дещо гірші, ніж у разі використання настоювання з ацетонітрилом, але висока ефективність витягання фенітоїну із сечі за низької величини невизначеності методики дає змогу вважати оптимальною методику з використанням ацетонітрилу в кислому середовищі для пробопідготовки сечі до подальшого ГРХ-визначення фенітоїну.

## В и с н о в к и

1. Таким чином, нами розроблено серію ГРХ-методик кількісного визначення фенітоїну в сечі із використанням різних процедур пробопідготовки – екстракції хлороформом в кислому середовищі та настоювання з ацетонітрилом без підкислення і за  $\text{pH} = 2$  з подальшим відокремленням органічного шару в умовах насичення водної фази амонію сульфатом.

2. Здійснено валідацію розроблених методик і встановлено, що оптимальним для визначення фенітоїну в сечі є використання ацетонітрилу в кислому середовищі ( $\text{pH} = 2$ ) – ефективність ізолювання максимальна і становить  $\sim 97\%$  за оптимальних показників лінійності, правильності та прецизійності.

3. Показано можливість застосування запропонованих підходів до валідації методик кількісного визначення для судово-токсикологічного аналізу у варіанті методу калібрувального графіка для валідації методик із використанням методу газорідинної хроматографії.

## Л І Т Е Р А Т У Р А

1. *Tiwari G., Tiwari R.* Bioanalytical method validation: an updated review // *Pharm. Methods.* – 2010. – V. 1, N 1. – P. 25–38.
2. *Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material: 4<sup>th</sup> ed.* / Edited by *A. C. Moffat, M. D. Osselton, B. Widdop.* – London: Pharmaceutical Press, 2011. – 2609 p.
3. *Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens* / United Nations Office on Drugs and Crime, Laboratory and Scientific Section. – New York: United Nations, 2009. – 70 p.
4. *Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology* / Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX). – 2013. – 52 p.
5. *Гризодуб А. И.* Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств / Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств: в 3 т. / Под ред. чл.-кор. НАН Украины *В. П. Георгиевского.* – Харьков: НТМТ, 2011. – Т. 3. – 520 с.
6. *Klimenko L. Yu., Trut S. M., Petyunin G. P. et al.* Validation of UV-spectrophotometric methods of quantitative determination in forensic and toxicological analysis: recovery // *Фармация Казахстана.* – 2013. – № 12. – С. 42–48.
7. *Клименко Л. Ю., Петюнин Г. П., Трут С. Н. и др.* Критерии приемлемости линейной зависимости при проведении валидации УФ-спектрофотометрических методик количественного определения в судебно-токсикологическом анализе // *Акт. питання фарм. мед. науки та практики.* – 2014. – № 2 (15). – С. 15–22.

8. *Klimenko L. Yu., Trut S. M., Petyunin G. P. et al.* Determination of accuracy when validating UV-spectrophotometric methods of quantitative determination in forensic and toxicological analysis // Укр. біофарм. журн. – 2014. – № 2 (29). – С. 55–67.

9. *Klimenko L. Yu., Trut S. M., Mykytenko O. Ye.* Approaches to determination of precision for UV-spectrophotometric methods of quantitative determination in forensic and toxicological analysis // Фармация Казахстана. – 2014. – № 3. – С. 43–50.

10. *Клименко Л. Ю., Гуменюк Е. В., Новицкий А. И.* Разработка и валидация экстракционно-фотометрических методик количественного определения зопиклона в биологических жидкостях в варианте метода калибровочного графика // Вестник Таджикского национального университета. Серия естественных наук. – 2014. – № 1/1 (126). – С. 241–247.

11. *Багуля О. В.* Хіміко-токсикологічне дослідження дифеніну: Автореф. дис. ... канд. фарм. наук. – Харків, 2014. – 24 с.

12. *Герасимов Д. А.* Химико-токсикологическое исследование нимесулида и близких по структуре соединений: Дис. ... канд. фарм. наук. – Курск, 2014. – 326 с.

13. *Маміна О. О.* Розробка та удосконалення методів аналізу органічних лікарських речовин загального дослідження при проведенні судово-медичних експертиз: Дис. ... д-ра фарм. наук. – Харків, 2008. – 294 с.

Надійшла до редакції 01. 10. 2014.

*Л. Ю. Клименко<sup>1</sup>, В. С. Бондарь<sup>1</sup>, Е. В. Гуменюк<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> *Национальный фармацевтический университет, г. Харьков*

<sup>2</sup> *Харьковское областное бюро судебно-медицинской экспертизы*

#### РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕНИТОИНА В МОЧЕ МЕТОДОМ ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

**Ключевые слова:** валидация, биоаналитические методики, газожидкостная хроматография, фенитоин, метод калибровочного графика

#### А Н Н О Т А Ц И Я

Разработка методик определения сильнодействующих лекарственных препаратов в биологических жидкостях человека для применения в судебной и клинической токсикологии является одной из актуальных проблем фармацевтической науки. В последнее десятилетие гораздо более насущной и широко обсуждаемой проблемой аналитической токсикологии становится валидация таких аналитических методик.

Целью работы была разработка методик количественного определения фенитоина в моче на базе предложенной ранее методики определения данного аналита методом газожидкостной хроматографии и проведение валидации разработанных методик в варианте метода калибровочного графика в соответствии с предложенными авторами подходами для выбора оптимальной методики выделения фенитоина из этой биологической матрицы.

Разработана серия ГЖХ-методик количественного определения фенитоина в моче с использованием различных процедур пробоподготовки – экстракции хлороформом в кислой среде и настаивания с ацетонитрилом без подкисления и при pH = 2 с последующим отделением органического слоя в условиях насыщения водной фазы аммония сульфатом.

Проведена валидация разработанных методик и установлено, что оптимальным для определения фенитоина в моче является использование ацетонитрила в кислой среде (pH = 2) – эффективность извлечения максимальна и составляет ~97% при оптимальных показателях линейности, правильности и прецизионности.

Показана возможность применения предложенных подходов к валидации методик количественного определения для судебно-токсикологического анализа в варианте метода калибровочного графика для валидации методик с использованием метода газожидкостной хроматографии.



## DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHODS OF PHENYTOIN DETERMINATION IN URINE BY THE METHOD OF GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY

**Key words:** validation, bioanalytical methods, gas-liquid chromatography, phenytoin, method of calibration curve

### ABSTRACT

Development of the methods of strong medicines determination in human biological liquids for application in forensic and clinical toxicology is one of actual problems of pharmaceutical science, but validation of the analytical methods becomes much more vital and widely discussed problem in analytical toxicology in the last decade.

The purpose of the paper was to develop the methods of phenytoin quantitative determination in urine based on the offered before procedure of the analyte determination by the method of gas-liquid chromatography and to carry out validation of the developed methods in the variant of the method of calibration curve according to the approaches offered by authors for choosing the optimal procedure of phenytoin isolation from the mentioned biological matrix.

The set of GLC-methods of phenytoin quantitative determination in urine using different procedures of sample preparation – by extraction with chloroform in the acid medium and by maceration with acetonitrile without acidifying and at pH = 2 with subsequent separation of organic layer under the conditions of aqueous phase saturation by ammonium sulphate – has been developed.

Validation of the developed methods has been carried out and it has been set that acetonitrile application in the acid medium (pH = 2) is optimal for phenytoin determination in urine – extraction efficiency is maximal and equal to ~97%, and performance of linearity, accuracy and precision is optimal.

Application possibility of the offered approaches to validation of quantitative determination methods for forensic and toxicological analysis in the variant of the method of calibration curve for validation of procedure using the method of gas-liquid chromatography has been shown.

*Електронна адреса для листування з авторами: lynnne2@ukr.net*