

УДК 615.214.24:543.422.3/7:543.054

Л. Ю. Клименко<sup>1</sup>, С. Н. Трут<sup>1</sup>, И. М. Иванчук<sup>2</sup><sup>1</sup>Национальный фармацевтический университет, г. Харьков<sup>2</sup>ГВУЗ «Ивано-Франковский национальный медицинский университет», г. Ивано-Франковск

## РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК ЭКСТРАКЦИОННО-ФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДОКСИЛАМИНА В МОЧЕ

*Разработана серия экстракционно-фотометрических методик количественного определения доксиламина в моче с использованием амфифильных растворителей для выделения аналита из матрицы в условиях насыщения водной фазы аммония сульфатом – оптимальным является использование ацетонитрила в слабокислой среде (вклад компонентов матрицы в поглощение анализируемого образца не превышает 10 %, эффективность извлечения составляет > 90 %). Проведена валидация разработанных методик и показана возможность использования для определения как метода калибровочного графика, так и метода стандарта.*

**Ключевые слова:** валидация, биоаналитические методики, экстракционная фотометрия, доксиламин, метод калибровочного графика, метод стандарта.

### ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМЫ

В настоящее время необходимость валидации аналитических методик становится насущной и широко обсуждаемой проблемой судебной токсикологии [8, 9, 16].

Имеющиеся в наличии международные рекомендации по проведению валидации биоаналитических методик [11–13, 15] рассчитаны, во-первых, на использование исключительно хроматографических методов анализа, во-вторых, на работу методом калибровочного графика, что подразумевает выполнение большого количества рутинных анализов в практической работе. В практике судебно-токсикологического анализа более распространенными являются разовые экспертизы, и в этой ситуации более оправданным является применение метода стандарта или метода добавок.

### АНАЛИЗ ПОСЛЕДНИХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ПУБЛИКАЦИЙ

Авторами [3, 4, 5, 10, 14, 17] предложены подходы к валидации методик количественного определения для целей судебно-токсикологического анализа как к инструменту разработки оптимальной методики в рамках поставленной

цели – предложены собственно процедуры выполнения эксперимента и критерии приемлемости полученных результатов в варианте метода калибровочного графика (МКГ) и метода стандарта (МС).

### ВЫДЕЛЕНИЕ НЕ РЕШЕННЫХ РАНЕЕ ЧАСТЕЙ ОБЩЕЙ ПРОБЛЕМЫ

Для определения доксиламина авторами разработана экстракционно-фотометрическая методика, в основу которой положена реакция образования ионного ассоциата доксиламина с метиловым оранжевым при pH = 4,6 [1], но не исследована возможность ее использования для проведения количественного определения доксиламина в моче. Представляет интерес разработать методику количественного определения доксиламина в моче и изучить возможности ее применения в вариантах метода калибровочного графика и метода стандарта.

### ФОРМУЛИРОВКА ЦЕЛИ СТАТЬИ

Целью данной работы является:

- разработка набора методик количественного определения доксиламина в моче с использованием различных процедур пробоподготовки на базе предложенной ранее [1] экстракционно-фотометрической методики;

© Коллектив авторов, 2015

- выбор оптимальной процедуры пробоподготовки, обеспечивающей эффективное извлечение доксиламина из мочи и низкое содержание соэкстрактивных веществ в получаемых извлечениях при минимальной величине неопределенности методики;
- проведение валидации предложенных методик в соответствии с [3 – 5, 10, 14, 17] и сравнение возможностей использования для экстракционно-фотометрического определения доксиламина в моче МКГ и МС.

### ИЗЛОЖЕНИЕ ОСНОВНОГО МАТЕРИАЛА

В эксперименте использовали доксиламина сукцинат фармакопейной чистоты. Порядок приготовления стандартных, рабочих и модельных растворов, а также соответствующих калибровочных и модельных образцов представлен на рис. 1.

Дизайн эксперимента представлен на рис. 2.

Для каждой из разработанных методик анализировали калибровочные и модельные образцы (рис. 1), а также blank-образцы, приготовленные следующим образом: 1) 5 образцов (20,00 мл) мочи, полученной от различных источников, в которые введено по 1,00 мл воды дистиллированной; 2) 3 образца (20,00 мл) воды дистиллированной.

Оптическую плотность растворов измеряли по 3 раза с рандомизацией положения кюветы.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изолирование доксиламина из мочи предложено проводить с помощью амфифильных растворителей в условиях насыщения водной фазы электролитом – подход, пользующийся широкой популярностью в современном судебно-токсикологическом анализе [2, 6, 9]. В работе использованы такие амфифильные растворители, как метанол, изопропанол и ацетонитрил; в качестве электролита для насыщения водной фазы использовали аммония сульфат.

Изолирование проводили в щелочной среде (рН = 11) и слабокислой – рН = 5. Выполнение изолирования аналитов из биологических объектов в слабокислой среде в ряде случаев приводит к уменьшению процессов соэкстракции компонентов биологической матрицы [2, 6, 9]. Необходимо отметить, что использование амфифильных растворителей и насыщенного раствора аммония сульфата позволяет сохранять эффективность изолирования веществ основного характера в слабокислой среде на том же уровне, что и в щелочной – это обусловлено смещением реального значения рН в щелочную сторону для смесей насыщенных растворов электролитов с амфифильными растворителями [7].

Таким образом, итогом данного этапа работы стала разработка ряда методик определения доксиламина в моче с использованием экстракционной спектрофотометрии, отличающихся процедурами пробоподготовки (рис. 2).

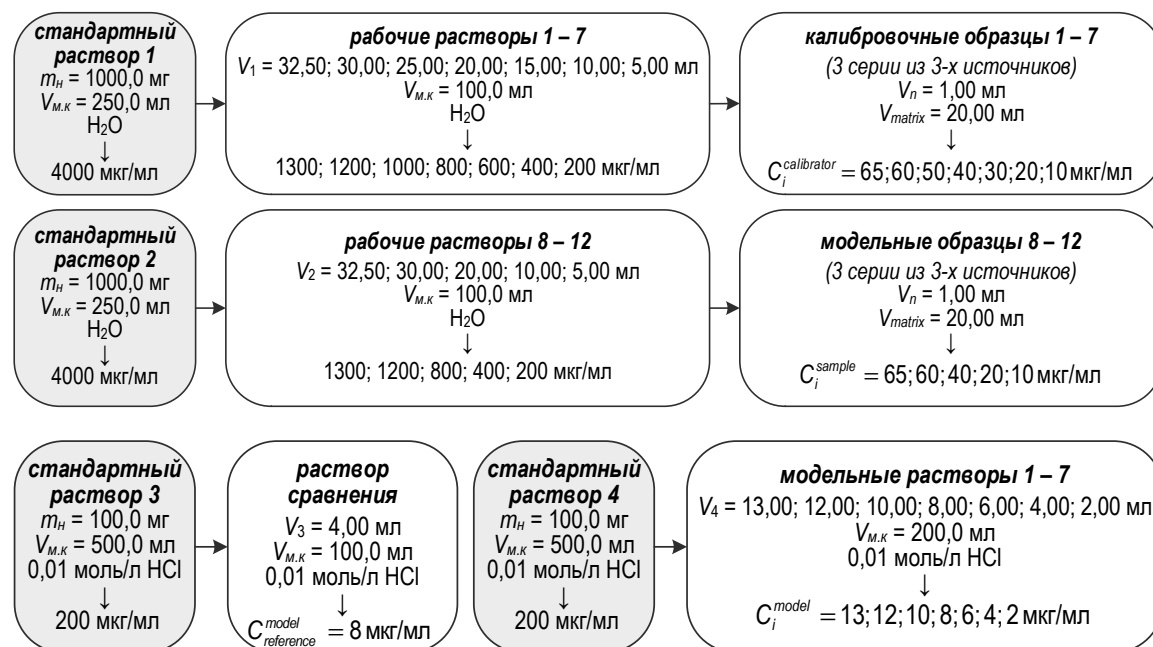
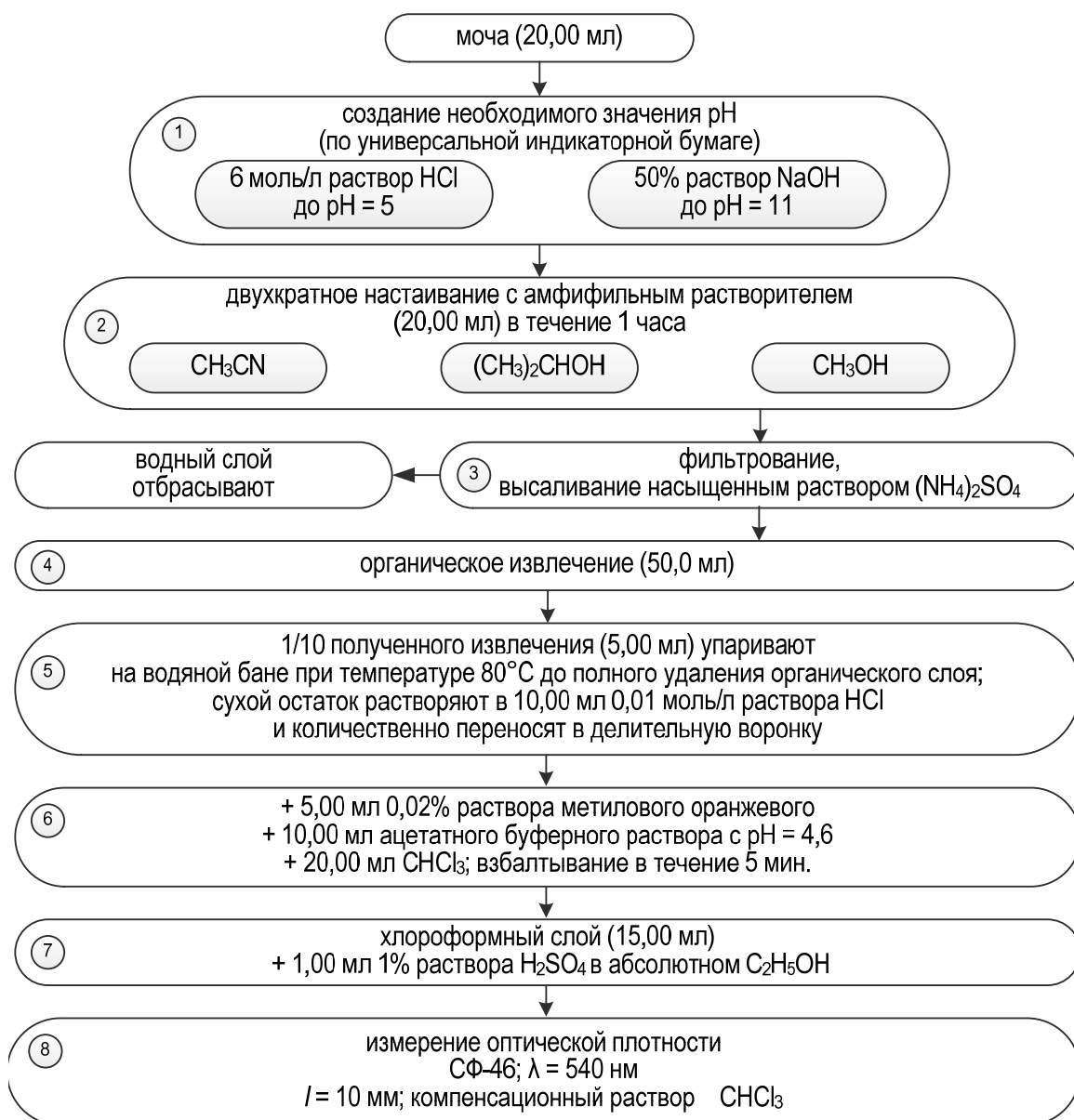


Рис. 1. Схема процедуры приготовления растворов и образцов для валидации экстракционно-спектрофотометрических методик определения доксиламина в моче



**Рис. 2.** Схема основных этапов методик экстракционно-фотометрического определения доксиламина в моче

Для выбора оптимальных методик определения доксиламина в моче проводили их валидацию по таким параметрам как специфичность, степень извлечения, линейность, правильность, сходимість и внутрилабораторная прецизионность в соответствии с предложенными нами подходами в варианте метода калибровочного графика [4, 5, 10, 14, 17] и метода стандарта [3].

Процедура валидации предусматривает использование нормализованных координат. Для нормализации полученных экспериментальных данных использовали раствор сравнения с концентрацией аналита, соответствующей его концентрации в конечном анализируемом растворе

при условии нулевых потерь для точки 100 % в нормализованных координатах. Для нормализации значений оптических плотностей калибровочных и модельных образцов оптическая плотность раствора сравнения корректируется с учетом степени извлечения, значимость и величину которой показано на предварительном этапе валидации.

Диапазон применения методик  $D = 25 - 175 \%$ ; количество концентрационных уровней  $g = 7$  с постоянным шагом 25%; за 100% принимали среднюю летальную концентрацию доксиламина в моче [9] в пересчете на доксиламина сульфат.

Валидацію методик на першому етапі проводили з використанням модельних розчинів (рис. 3) виходячи з того, що неопределенність кількісного визначення аналіта в модельних розчинах  $\Delta_A^{model}$  рівна неопределенності процедури пробопідготовки аналізованих зразків [3, 5, 10, 14]; суммарні результати валидації приведені в табл. 1.

Таким образом, модифікована методика кількісного визначення доксиламіна сукцинату методом екстракційної фотометрії характеризується задовільною лінійністю, правильною і збіжністю, що дає можливість рекомендувати її к дальнішому застосуванню в судовій токсикології з метою розробки методик аналізу біологічних об'єктів на вміст в них доксиламіна.

Необхідно відзначити можливість виконання аналізу як методом калібрувального графіка, так і методом стандарту.

На другому етапі проводили валидацію методик з використанням калібрувальних і модельних зразків (рис. 4). Суммарні результати валидації приведені в табл. 2–3 і дозволяють говорити про прийнятні показники специфічності, ступеня вилучення, лінійності, правильності, збіжності і внутрілабораторної прецизійності всієї серії розроблених екстракційно-фотометричних методик кількісного визначення доксиламіна в сечі.

Результати вивчення специфічності показують, що во всіх випадках проведення ізолювання доксиламіна з сечі при  $pH = 5$

забезпечує більш низький внесок компонентів біологічної матриці в поглинання основного досвіду, ніж в разі використання лужного значення  $pH$ ; в той же час, за результатами вивчення ступеня вилучення, в даних умовах відзначається невелике зменшення ефективності вилучення доксиламіна з сечі – на 3–5 %. Найбільшою ефективністю вилучення характеризуються методики з використанням ацетонітрила.

Воспроизводимость значений ступеня вилучення і оптичної щільності  $blank$ -зразків відповідає критеріям прийнятності для всіх варіантів методик.

Значення оптичних щільностей, отримані для  $blank$ -зразків 2, свідчать про правильний вибір процедури пробопідготовки для всіх розглянутих випадків.

З урахування даних стосовно  $A_{blank}$  і  $R$  дослідження лінійності, правильності і прецизійності проводилися тільки для серії методик з використанням слабкої кислотної середовища для вилучення доксиламіна з сечі.

В цілому, всі вивчені методики характеризуються задовільними параметрами лінійності, правильності і прецизійності як в варіанті МКГ, так і МС.

В разі аналізу МС во всіх випадках відзначається збільшення систематичної помилки методик і погіршення збіжності результатів аналізу, в той же час показники внутрілабораторної прецизійності значно краще, ніж в разі МКГ.

Таблиця 1

**СРАВНИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ВАЛИДАЦИИ ЭКСТРАКЦИОННО-ФОТОМЕТРИЧЕСКИХ МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДОКСИЛАМИНА СУКЦИНАТА, ПОЛУЧЕННЫЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОДЕЛЬНЫХ РАСТВОРОВ**

Характеристика	МКГ		МС	
	значение	критерий приемлемости	значение	критерий приемлемости
<i>1) линейность</i>				
$b^{model}$	1,001	–	1,001	–
$s_b^{model}$	0,008	–	0,008	–
$a^{model}$	0,821	–	0,821	$a^{model} \leq 2.015 \cdot s_a^{model}$ $a^{model} \leq 6,03\%$
$s_a^{model}$	0,870	–	0,870	
$RSD_0^{model}$	1,002	$\leq 4,96\%$	1,002	$\leq 7,02\%$
$RSD_C^{model}$	0,9998	$\geq 0,9958$	0,9998	$\geq 0,9915$
<i>2) правильность и сходимость</i>				
$RR^{model} (Z^{model})$	101,41	–	101,54	–
$RSD_{RR}^{model} (RSD_Z^{model})$	2,21	–	2,21	–
$\sigma^{model}$	1,41	$\leq 4,52\%$	1,54	$\leq 4,52\%$
$\Delta_{RR}^{model} (\Delta_Z^{model})$	4,29	$\leq 10,00\%$	4,29	$\leq 14,14\%$

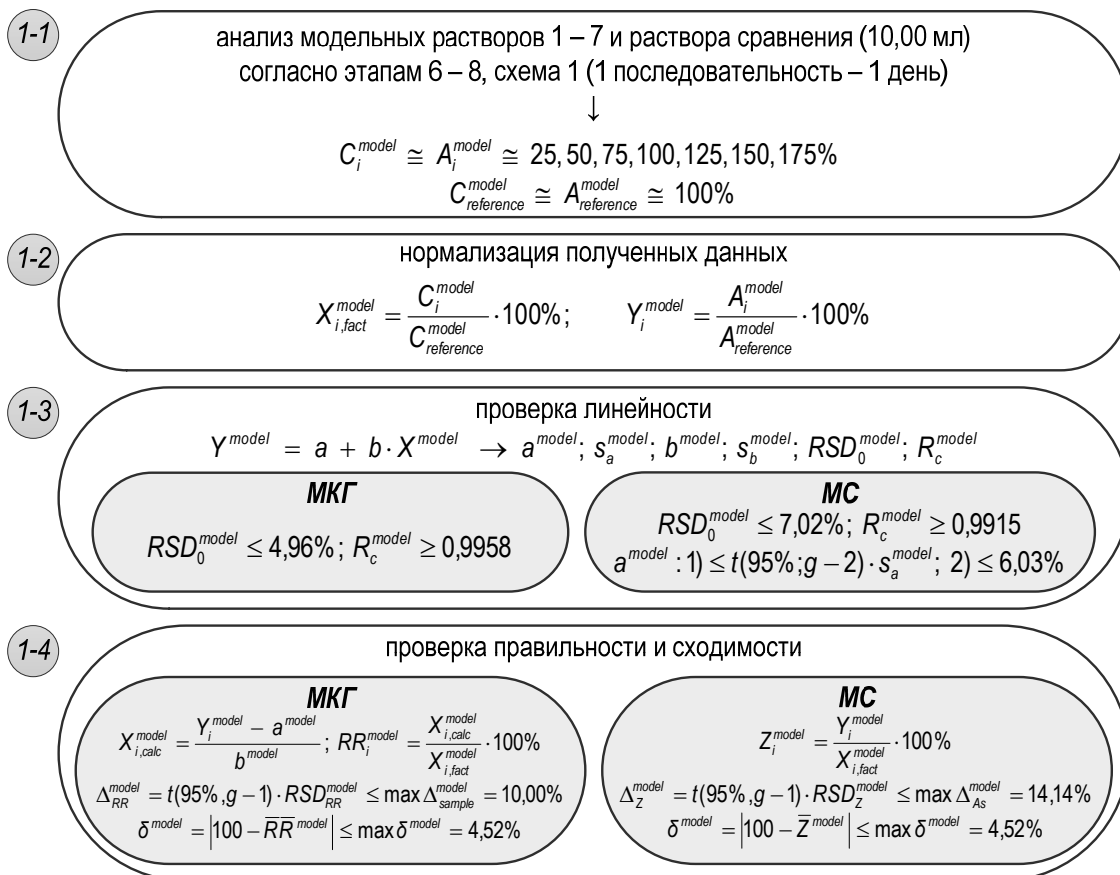


Рис. 3. Схема этапов валидации экстракционно-фотометрических методик определения доксиламина сукцината с использованием модельных растворов

Таблица 2

**РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧНОСТИ И СТЕПЕНИ ИЗВЛЕЧЕНИЯ  
 ЭКСТРАКЦИОННО-ФОТОМЕТРИЧЕСКИХ МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО  
 ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДОКСИЛАМИНА В МОЧЕ**

Характеристика pH = 5	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHOH		CH <sub>3</sub> CN		CH <sub>3</sub> OH		критерий приемлемости	
	pH = 11	pH = 5	pH = 11	pH = 5	pH = 11	pH = 5		
специфичность	$\bar{A}_{blank}$	0,024	0,035	0,022	0,034	0,028	0,032	–
	RSD <sub>nom</sub> (blank)	3,58	6,56	5,08	6,43	6,22	5,54	≤ 6,71%
	$\delta_{blank} (25\%)$	18,70	27,73	14,04	27,25	20,56	25,19	≤ 8,00%
	$\delta_{blank} (50\%)$	9,96	14,77	8,05	14,52	10,45	13,42	≤ 6,40%
	$\bar{A}_{procedure}$	0,005	0,006	0,006	0,008	0,006	0,007	–
степень извлечения	$\delta_{procedure(25\%)}$	4,23	4,75	3,90	6,07	4,44	5,81	≤ 0,32 $\delta_{blank}$
	$\bar{R}$	79,34	84,00	93,72	94,60	87,25	86,19	–
	$\Delta_{R, r}$	8,91	8,81	5,98	7,77	9,02	8,53	≤ 20,00%
	$b^R$	0,03	0,02	0,03	0,03	-0,01	0,00	$b^R \leq 1.812 \cdot s_b^R$
	$s_b^R$	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	
	$a^R$	76,30	82,63	91,39	91,99	88,09	85,77	$a^R \leq 1.812 \cdot s_a^R$
	$s_a^R$	1,79	2,34	1,59	1,87	2,26	2,09	
$ 100 - \bar{R} $	20,66	16,00	6,28	5,40	12,75	13,81	≤ 6,40%	

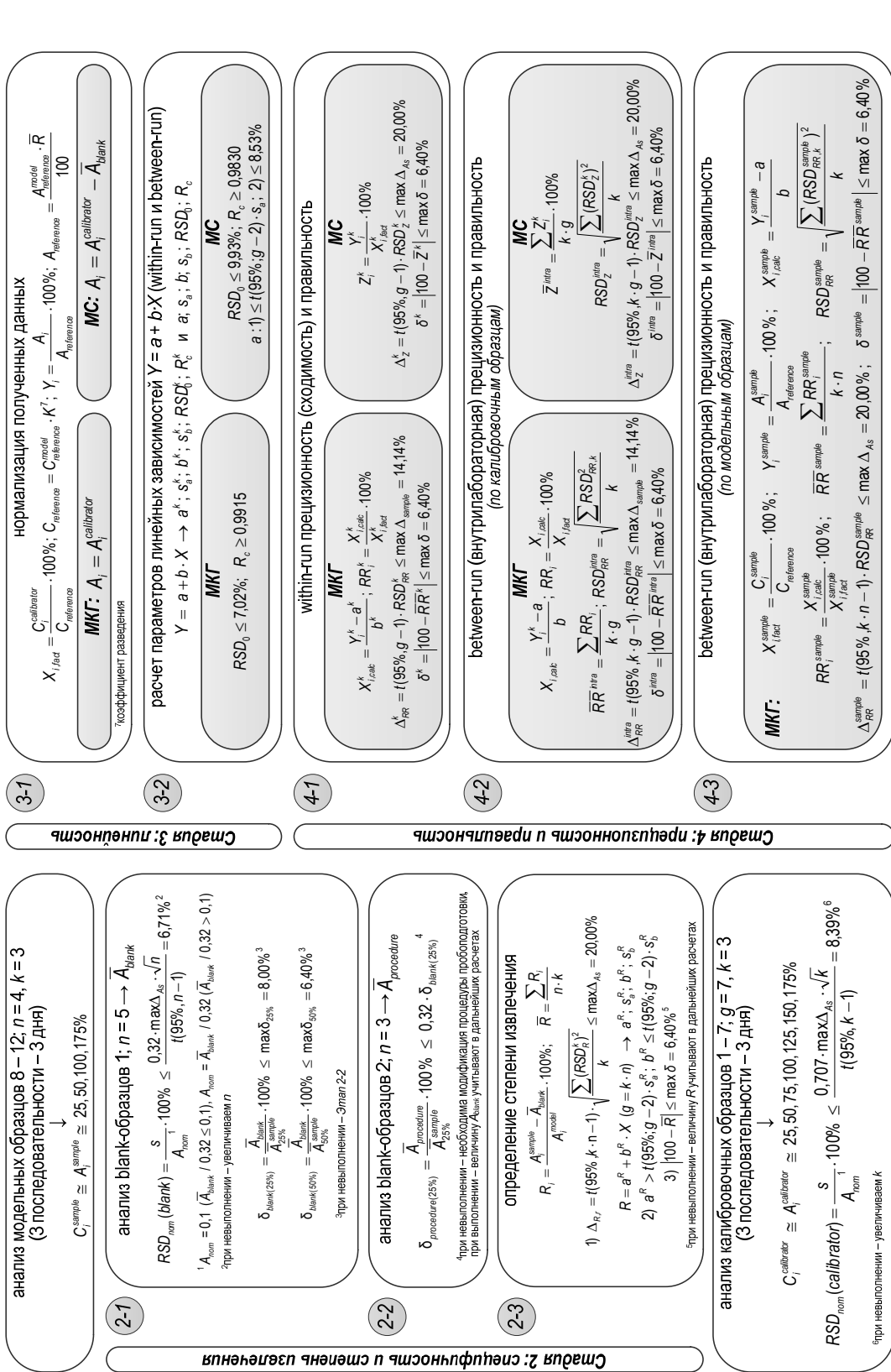


Рис. 4. Схема этапов валидации экстракционно-фотометрических методов определения доксиламина в моче с использованием модельных и калибровочных образцов

**РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛИНЕЙНОСТИ, ПРАВИЛЬНОСТИ И ПРЕЦИЗИОННОСТИ  
ЭКСТРАКЦИОННО-ФОТОМЕТРИЧЕСКИХ МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО  
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДОКСИЛАМИНА В МОЧЕ (PH = 5)**

Параметр		МКГ			МС			критерий приемлемости
		(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHOH	CH <sub>3</sub> CN	CH <sub>3</sub> OH	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHOH	CH <sub>3</sub> CN	CH <sub>3</sub> OH	
линейность	max a <sup>k</sup>	3,079	3,459	6,302	-3,739	-2,639	-2,131	МКГ: –
	a	2,567	2,568	4,738	–	–	–	МС: ≤ 8,53%
	maxRSD <sub>0</sub> <sup>k</sup>	3,128	3,512	4,750	3,130	3,509	4,752	МКГ: ≤ 7,02%
	RSD <sub>0</sub>	1,161	2,768	3,394	–	–	–	МС: ≤ 9,93%
	minR <sub>C</sub> <sup>k</sup>	0,9986	0,9982	0,9964	0,9986	0,9982	0,9964	МКГ: ≥ 0,9915
R <sub>c</sub>	0,9998	0,9989	0,9982	–	–	–	МС: ≥ 0,9830	
правильность	max δ <sup>k</sup>	0,91	0,93	0,74	1,58	1,33	3,18	≤ 6,40%
	$\overline{RR}^{intra} (\overline{Z}^{intra})$	99,88	100,44	99,62	100,98	100,77	97,73	–
	δ <sup>intra</sup>	0,12	0,44	0,38	0,98	0,77	2,27	≤ 6,40%
	$\overline{RR}^{sample}$	101,88	102,21	104,42	–	–	–	–
δ <sup>sample</sup>	1,88	2,21	4,42	–	–	–	≤ 6,40%	
прецизионность	max Δ <sub>RR</sub> <sup>k</sup>	8,71	13,25	8,43	–	–	–	≤ 14,14%
	max Δ <sub>Z</sub> <sup>k</sup>	–	–	–	14,30	11,60	12,53	≤ 20,00%
	Δ <sub>RR}^{intra}</sub>	6,31	8,31	7,17	–	–	–	≤ 14,14%
	Δ <sub>Z}^{intra}</sub>	–	–	–	9,33	7,76	8,45	≤ 20,00%
	Δ <sub>RR}^{sample}</sub>	11,21	7,63	12,46	–	–	–	≤ 20,00%

**ВЫВОДЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ  
ДАЛЬНЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Разработана серия экстракционно-фотометрических методик количественного определения доксиламина в моче с использованием амфифильных растворителей (изопропанола, ацетонитрила, метанола) для выделения аналита из матрицы в условиях насыщения водной фазы аммония сульфатом.

Оптимальным является использование ацетонитрила в слабокислой среде (pH = 5) – вклад компонентов матрицы в поглощение анализируемого образца не превышает 10 %, эффективность извлечения составляет 90 %.

Проведена валидация разработанных методик и показана возможность использования для определения как МКГ, так и МС – выполнение анализа МС характеризуется худшей правильностью, что компенсируется высокой прецизионностью и значительной экономией времени проведения эксперимента

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ  
ИСТОЧНИКОВ ИНФОРМАЦИИ**

1. Болотов В. В. Спектрофотометричне та екстракційно-фотометричне визначення донамілу / В. В. Болотов, І. М. Іванчук // Вісник фармації. – 2005. – №4 (44). – С. 16 – 19.
2. Герасимов, Д. А. Химико-токсикологическое исследование нимесулида и близких по струк-

туре соединений: дис. ... канд. фарм. наук / Д. А. Герасимов. – Курск, 2014. – 326 с.

3. Клименко, Л. Ю. Разработка подходов к определению линейности, правильности и прецизионности УФ-спектрофотометрических методик количественного определения методом стандарта в судебно-токсикологическом анализе / Л. Ю. Клименко // Фармация Казахстана. – 2014. – №4. – С. 31 – 35.
4. Клименко, Л. Ю. Подходы к определению специфичности / селективности при валидации УФ-спектрофотометрических методик количественного определения в судебно-токсикологическом анализе / Л. Ю. Клименко, Г. П. Петюнин, Т. А. Костина // Фармация Казахстана. – 2013. – №8. – С. 53 – 56.
5. Критерии приемлемости линейной зависимости при проведении валидации УФ-спектрофотометрических методик количественного определения в судебно-токсикологическом анализе / Л. Ю. Клименко, Г. П. Петюнин, С. Н. Трут, В. П. Мороз // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2014. – №2 (15). – С. 15 – 22.
6. Маміна, О. О. Розробка та удосконалення методів аналізу органічних лікарських речовин загального дослідження при проведенні судово-медичних експертиз: дис. ... д-ра фарм. наук / О. О. Маміна. – Х., 2008. – 294 с.

7. Смотров М. П. Топологическая трансформация фазовых диаграмм тройных систем соль-бинарный растворитель с всаливанием-высаливанием / М. П. Смотров. – Саратов, 2012. – 281 с.
8. Bioanalytical method development – determination of drugs in biological fluids / Pranay Wal, Brijesh Kumar Dr. Anil Bhandari, A. K. Rai, Ankita Wal // *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. – 2010. – V. 2 (10). – P. 333 – 347.
9. 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. Osseleton, B. Widdop. – London: Pharmaceutical Press, 2011. – 2609 p.
10. Determination of accuracy when validating UV-spectrophotometric methods of quantitative determination in forensic and toxicological analysis / L. Yu. Klimenko, S. M. Trut, G. P. Petyunin, T. A. Kostina // *Український біофармацевтичний журнал*. – 2014. – № 2 (29). – С. 55 – 67.
11. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation / U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). – Washington, DC: U.S. Government Printing Office, 2001. – 22 p.
12. Guideline on bioanalytical method validation / European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). – London, 2009. – 22 p.
13. 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.
14. Klimenko L. Yu. Approaches to determination of precision for UV-spectrophotometric methods of quantitative determination in forensic and toxicological analysis / L. Yu. Klimenko, S. M. Trut, O. Ye. Mykytenko // *Фармація Казахстану*. – 2014. – № 3. – С. 43 – 50.
15. Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology / Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX). – 2013. – 52 p.
16. Tiwari G. Bioanalytical method validation: an updated review / G. Tiwari, R. Tiwari // *Pharm. Methods*. – 2010. – Vol. 1 (1). – P. 25 – 38.
17. Validation of UV-spectrophotometric methods of quantitative determination in forensic and toxicological analysis: recovery / L. Yu. Klimenko, S. M. Trut, G. P. Petyunin, I. M. Ivanchuk // *Фармація Казахстану*. – 2013. – № 12. – С. 42 – 48.



**УДК 615.214.24:543.422.3/7:543.054**

**Л. Ю. Клименко, С. М. Трут, І. М. Іванчук**

**РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИК ЕКСТРАКЦІЙНО-ФОТОМЕТРИЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ДОКСИЛАМІНУ В СЕЧІ**

Розроблено серію екстракційно-фотометричних методик кількісного визначення доксиламіну в сечі з використанням амфіфільних розчинників для виділення аналіту з матриці в умовах насичення водної фази амонію сульфатом – оптимальним є використання ацетонітрилу в слабкокислому середовищі (вклад компонентів матриці в поглинання аналізованого зразка не перевищує 10 %, ефективність ізолювання становить > 90 %). Проведено валідацію розроблених методик та показано можливість використання для визначення як методу калібрувального графіка, так і методу стандарту.

**Ключові слова:** валідація, біоаналітичні методики, екстракційна фотометрія, доксиламін, метод калібрувального графіка, метод стандарту

**UDC 615.214.24:543.422.3/7:543.054**

**L. Yu. Klimenko, S. M. Trut, I. M. Ivanchuk**

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF EXTRACTION-PHOTOMETRIC DETERMINATION METHODS OF DOXYLAMINE IN URINE**

The set of extraction-photometric methods of doxylamine quantitative determination in urine using amphiphilic solvents for analyte isolation from the matrix under the conditions of water phase saturation with ammonium sulphate has been developed – application of acetonitrile in the weak-acid medium is optimal (the contribution of matrix components into the absorbance of the sample to be analysed does not exceed 10%, extraction efficiency is >90 %). Validation of the developed methods has been carried out and possibility of application for determination both of the method of calibration curve and method of standard has been shown.

**Key words:** validation, bioanalytical methods, extraction photometry, doxylamine, method of calibration curve, method of standard

*Адреса для листування:*

61168, м. Харків, вул. Блюхера, 4.

Кафедра аналітичної хімії, НФАУ

Тел.: (0572) 67-94-24, 67-91-93

E-mail: lynnne2@ukr.net

Надійшла до редакції:

14.12.2014