ISSN 2074-1847

ДОНИШГОҲИ МИЛЛИИ ТОҶИКИСТОН
ТАДЖИКСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

П А Ё М И
ДОНИШГОҲИ МИЛЛИИ ТОҶИКИСТОН

(маҷаллаи илмӣ)

БАХШИ ИЛМҲОИ ТАБИӢ

1/3(134)

В Е С Т Н И К
ТАДЖИКСКОГО НАЦИОНАЛЬНОГО УНИВЕРСИТЕТА

(научный журнал)

СЕРИЯ ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК

ДУШАНБЕ: «СИНО»
2014

ДОНИШГОҲИ МИЛЛИИ ТОҶИКИСТОН
ТАДЖИКСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

МАҶАЛЛАИ ИЛМӢ СОЛИ 1990 ТАЪСИС ЁФТААСТ.
НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ ОСНОВАН В 1990 ГОДУ.

Ҳайати таҳририя:
Редакционная коллегия:

Имомов М.С. - гл. редактор, доктор филологических наук, профессор
Сафаров Б.А. – зам. гл. редактора, кандидат юридических наук, доцент
Абдулазизов В. – зам.гл.редактора, кандидат филологических наук, доцент

Аъзои ҳайати таҳририя:
Члены редколлегии:

Бобоев Т.Б. - доктор физико-математических наук, профессор
Георгиянц В.А. - доктор фармацевтических наук, профессор
Котвицкая А.А. - доктор фармацевтических наук, профессор
Раджабов Н.Р. - доктор физико-математических наук, профессор
Саидов Н.Б. - кандидат фармацевтических наук, профессор
Суяров К.Дж. - кандидат химических наук, доцент
Таджибеков М. - доктор геолого-минералогических наук, профессор
Тихонов А.И. – доктор фармацевтических наук, профессор
Устоев М.Б. - доктор биологических наук, профессор
Шерматов Н. – доктор технических наук, профессор

Маҷалла бо забонҳои тоҷикӣ, русӣ ва англисӣ нашр мешавад.
Журнал печатается на таджикском, русском и английском языках.

Паёми Донишгоҳи миллии Тоҷикистон, 2014
Вестник Таджикского национального университета, 2014

THE STUDY OF THE POLYSACCHARIDES OF COMMON TOADFLAX HERB

The polysaccharides complex on fraction were obtained and studied for complex research of medicinal plant materials by paper chromatography. Amount of polysaccharides were determined.

Key words: polysaccharides complexes, of common toadflax herba, water soluble polysaccharides, pectin substances, and gemmicelluloses.

Сведения об авторах: ***В.С. Кисличенко*** - доктор фармацевтических наук, профессор, заведующая кафедрой химии природных соединений. Национальный фармацевтический университет, г. Харьков, Украина
З.И. Омельченко - кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры химии природных соединений
А.А. Крутских - аспирант кафедры химии природных соединений

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВАЛИДАЦИОННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДОКСИЛАМИНА В КРОВИ В ВАРИАНТЕ МЕТОДА ДОБАВОК

Л.Ю. Клименко, С.Н. Трут, В.И. Степаненко
Национальный фармацевтический университет, г. Харьков, Украина

Введение. В настоящее время существует ряд международных руководств, дающих направленные рекомендации по проведению валидации биоаналитических методик – «Guidance for Industry: Bioanalytical method validation» (U.S. FDA, 2001) [1], «Guideline on validation of bioanalytical methods» (EMA, 2011) [2], «Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens» (UNODC, 2009) [3] и «Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology» (SWGTOX, 2012) [4].

Указанные документы ориентированы на разработку методик количественного определения аналитов в биологических жидкостях в варианте метода калибровочного графика. Метод калибровочного графика, безусловно, позволяет учесть и частично нивелировать влияние фонового поглощения матрицы на результаты определения, но оправдывает себя лишь при выполнении рутинных анализов. В судебно-токсикологическом анализе мы часто сталкиваемся с разовыми экспертизами, на которые направляются разнообразные биологические жидкости, органы и ткани, т. е. необходимо количественно определять аналит в нескольких различных биологических объектах, состояние которых может быть самым разнообразным; при этом необходимость выполнения такого определения может возникать достаточно редко. В такой ситуации значительно более эффективно применение метода стандарта или метода добавок.

Представляет интерес изучение возможности использования метода добавок при проведении УФ-спектрофотометрического определения аналитов в биологических жидкостях, в связи с чем нами была предложена процедура определения и оценки приемлемости линейности, правильности и прецизионности для валидации таких методик в варианте метода добавок [5], разработанная с учетом [6]. В настоящей работе приведены результаты апробации предложенных подходов на примере УФ-спектрофотометрической методики количественного определения доксиламина в крови.

Материалы и методы. *Валидируемая методика*: 20,00 мл крови заливают 10,00 мл 10% водного раствора кислоты трихлоруксусной, перемешивают и оставляют на 1 час при постоянном перемешивании. Смесь центрифугируют (в течение 5 мин. при 5000 об./мин.), сливают надосадочную жидкость, доводят ее объем до 30 мл водой очищенной, проверяют pH (должно равняться 2) и трижды экстрагируют хлороформом порциями по 10,00 мл. Полученные хлороформные извлечения отделяют и в дальнейшем не исследуют. Водный слой подщелачивают 50% раствором натрия гидроксида до pH = 11 и трижды экстрагируют хлороформом порциями по 10,00 мл (при образовании стойких эмульсий применяют центрифугирование (в течение 5 мин. при 5000 об./мин.)). «Щелочные» хлороформные извлечения объединяют и фильтруют через бумажный фильтр («красная лента») с 1 г натрия сульфата безводного в мерную колбу емкостью 50,0 мл, доводят объем хлороформом до метки. 2/5 части полученного хлороформного извлечения (20,00 мл) упаривают на водяной бане при температуре 80°С до полного удаления органического слоя. Сухой остаток растворяют в 10,00 мл (×0,5 по отношению к взятому на анализ объему крови) 0,1 моль/л раствора кислоты хлористоводородной.

Дизайн эксперимента по изучению валидационных характеристик данной методики

в варианте метода добавок представлен на рис. 1 – 4.

В эксперименте использовали доксиламина сукцинат фармакопейной чистоты.

Оптическую плотность растворов измеряли по 3 раза с рандомизацией положения кюветы при длине волны 262 нм на спектрофотометре СФ-46 в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве компенсационного раствора использовали 0,1 моль/л раствор кислоты хлористоводородной.

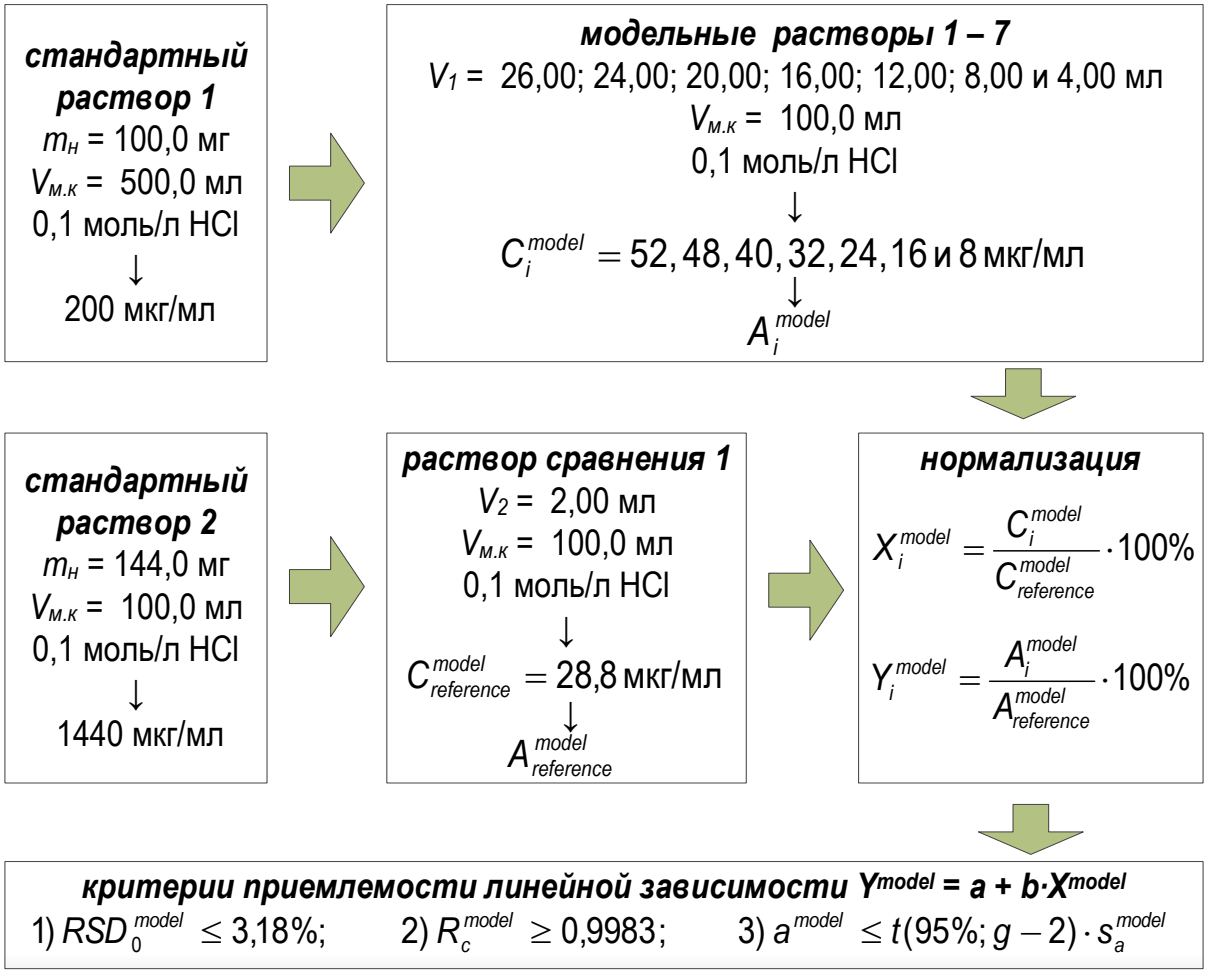


Рис. 1. Определение линейности по модельным растворам

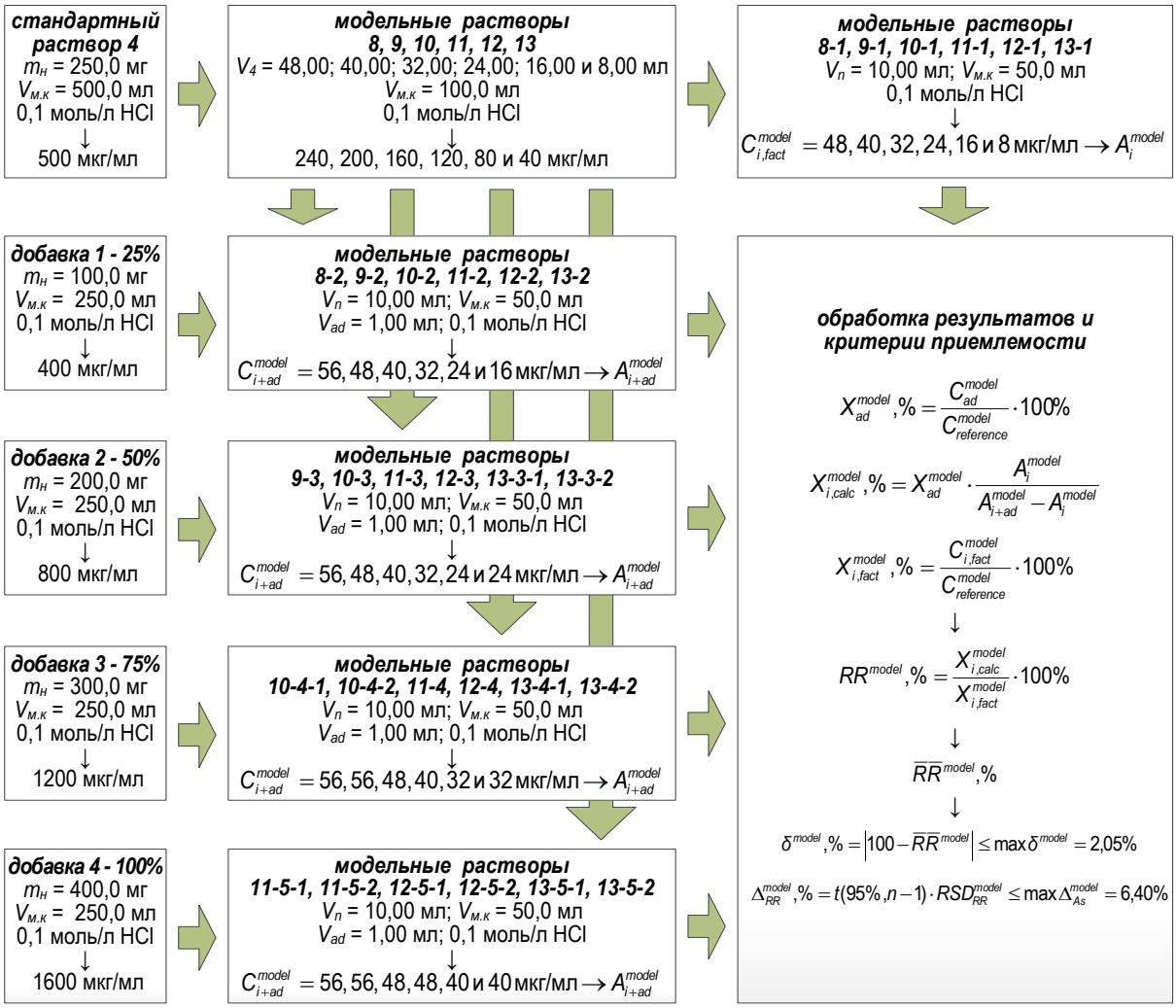
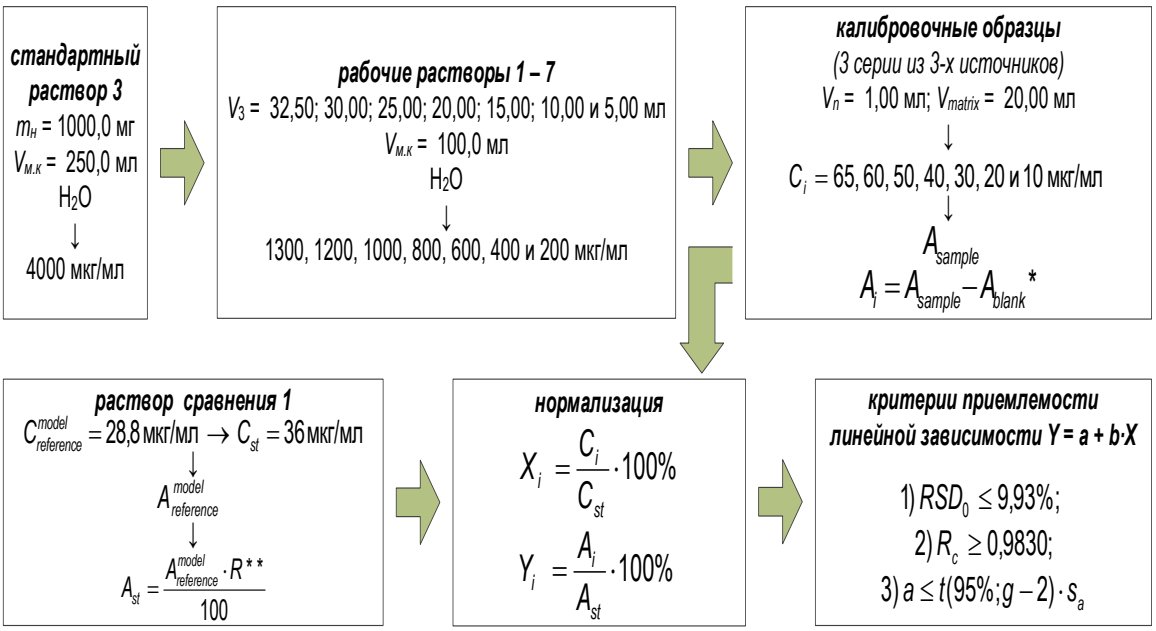
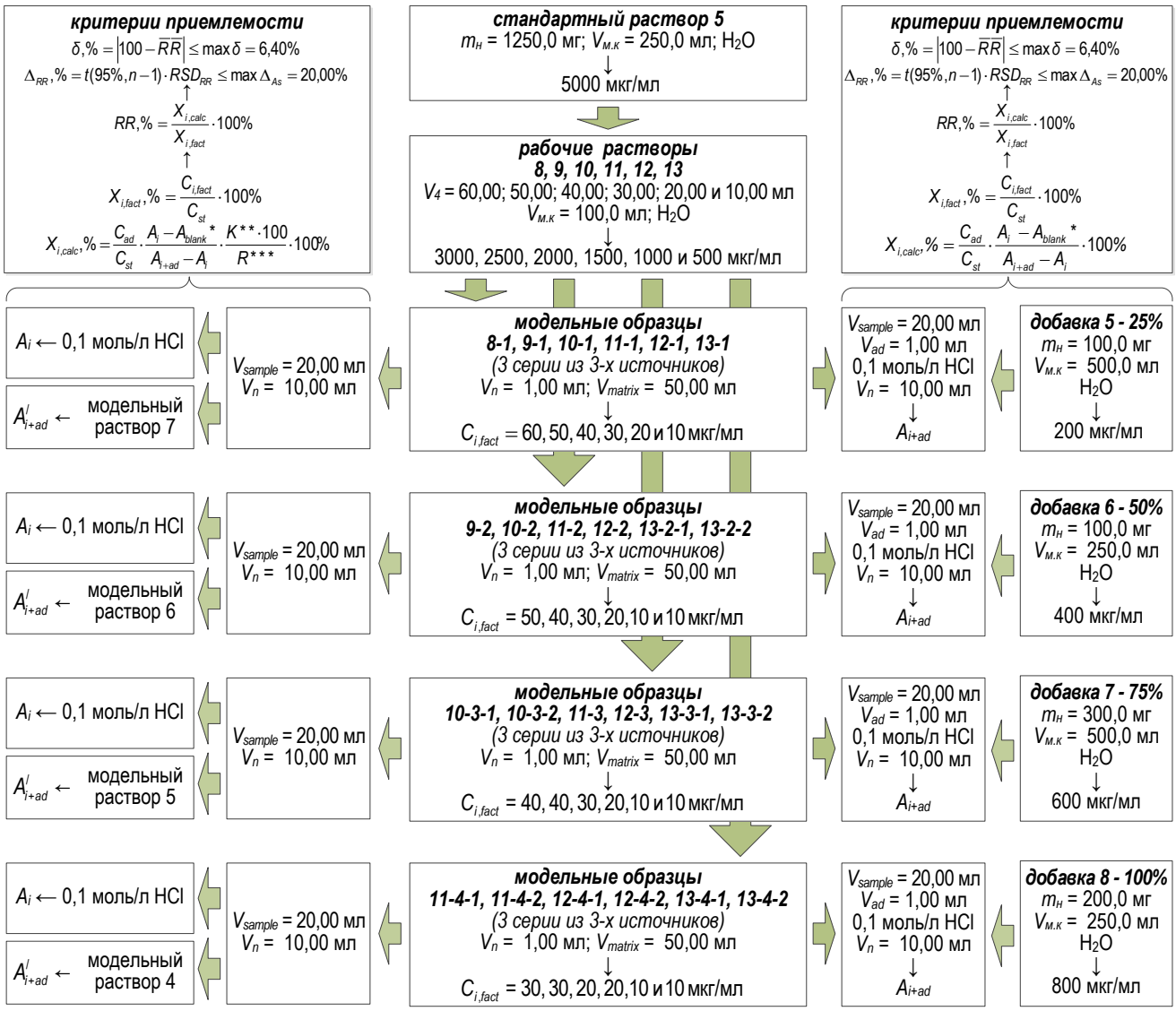


Рис. 2. Определение линейности по калибровочным образцам



*A_{blank} определена на предварительной стадии валидации;
**R определена на предварительной стадии валидации

Рис 3. Определение правильности и сходимости по модельным растворам



*A_{blank} определена на предварительной стадии валидации;
**K – коэффициент разведения;
**R определена на предварительной стадии валидации

Рис. 4. Определение правильности и сходимости по модельным образцам

Результаты и их обсуждение. Использование метода добавок в судебной токсикологии предполагает работу в двух направлениях:

Вариант 1: из поступившего на анализ образца отбирают две пробы одинакового объема; в одну из них вводят определенное количество стандартного раствора-добавки целевого аналита. Затем оба образца подвергают процедуре анализа в соответствии с методикой и получают значения оптических плотностей A_i и A_{i+ad} соответственно. Концентрацию аналита в анализируемом образце C_i рассчитывают из соотношения

$$\frac{\boldsymbol{A_i}}{\boldsymbol{A_{i+ad}}} = \frac{\boldsymbol{C_i}}{\boldsymbol{C_i + C_{ad}}} \Rightarrow \boldsymbol{C_i = C_{ad}\cdot\frac{A_i}{A_{i+ad} - A_i}}. \quad (1)$$

Вариант 2: из поступившего на анализ образца отбирают одну пробу фиксированного объема и подвергают процедуре анализа в соответствии с методикой. На последней стадии приготовление спектрофотометрируемого раствора выполняют дважды – с использованием растворителя и стандартного раствора-добавки целевого аналита – и получают значения оптических плотностей A_i и A'_{i+ad} соответственно. Концентрацию аналита в конечном спектрофотометрируемом растворе C'_i рассчитывают из соотношения

$$\frac{\boldsymbol{A_i}}{\boldsymbol{A^{/}_{i+ad}}} = \frac{\boldsymbol{C^{/}_i}}{(\boldsymbol{C_i} + \boldsymbol{C_{ad}})^{/}} \Rightarrow \boldsymbol{C^{/}_i} = \boldsymbol{C^{/}_{ad}} \cdot \frac{\boldsymbol{A_i}}{\boldsymbol{A^{/}_{i+ad}} - \boldsymbol{A_i}}. \quad (2)$$

Для расчета содержания аналита в анализируемом образце необходимо выполнить перерасчет с учетом разведения *K* и степени извлечения аналита из данной биологической матрицы *R* [7].

Определение валидационных параметров УФ-спектрофотометрической методики количественного определения доксиламина в крови для обоих вышеизложенных вариантов метода добавок проводили в соответствии со следующей процедурой – рис. 1 – 4 [5]:

1) применение нормализованных координат;

2) *диапазон* – 25 – 175%; за 100% принимали среднюю летальную концентрацию доксиламина в крови [8] – 25 мг/л (что соответствует 36 мг/л доксиламина сукцината); количество концентрационных уровней – g = 7 с постоянным шагом 25%;

3) *линейность* методики определяют в два этапа – на модельных растворах (без матрицы) и калибровочных образцах соответственно:

- определение линейности по модельным растворам проводят в рамках одной последовательности; нормализацию полученных средних значений оптической плотности проводят по раствору сравнения с концентрацией аналита, соответствующей точке 100% в нормализованных координатах;
- в ходе проверки линейности по калибровочным образцам их количество для каждого концентрационного уровня составляет не менее трех и определяется на основании результатов расчета величины $s_{nom,r}$, оценка приемлемости которой проводится по следующему критерию:

$$s_{nom,r}(sample) \leq \max s_{nom,r} = 0{,}707 \cdot \max\Delta_{As} \cdot \sqrt{n}/t(95\%, n-1); \quad (3)$$

каждый параллельный эксперимент выполняют в рамках отдельной последовательности/дня на образцах биологической матрицы, полученной из одного источника; расчет параметров линейной зависимости проводится для каждой последовательности (within-run линейность) и по средним значениям параллельных опытов (between-run линейность);

для нормализации полученных экспериментальных данных используют раствор сравнения с концентрацией аналита, соответствующей его концентрации в конечном спектрофотометрируемом растворе при условии нулевых потерь для точки 100% в нормализованных координатах; оптическая плотность такого раствора сравнения корректируется на величину recovery *R*, полученную на предварительном этапе валидации [7];

- критерии приемлемости – см. рис. 1 – 2.

4) *правильность и прецизионность:*

- определение правильности и сходимости методик на первом этапе выполняют с использованием серии модельных растворов (n = 6):

–при X_{ad} = 25% – 25%, 50%, 75%, 100%, 125%, 150%;
–при X_{ad} = 50% – 25%, 25%, 50%, 75%, 100%, 125%;
–при X_{ad} = 75% – 25%, 25%, 50%, 75%, 100%, 100%;
–при X_{ad} = 100% – 25%, 25%, 50%, 50%, 75%, 75%;

каждый из которых анализируют дважды – без и с введением добавки соответственно. На основании полученных данных рассчитывают X^{model}_{calc}, %, RR^{model}, % и $\overline{RR}^{model}$, %, δ^{model}, % *и* Δ^{model}_{As}, % ;

- на втором этапе определяют правильность и сходимость методик на модельных образцах для трех параллельных последовательностей /run, каждая из которых состоит из 6 (концентрации см. выше) затравленных аналитом образцов биологической матрицы, полученной из одного источника (один источник матрицы – одна последовательность);

каждый образец анализируют дважды – без и с введением добавки соответственно – и с использованием *Варианта 1* и *Варианта 2* выполнения эксперимента. На основании полученных данных рассчитывают X_{calc}, %, *RR*, % и $\overline{RR}$, %, δ, % *и* Δ_{As}, %;

- критерии приемлемости – см. рис. 3 – 4.
- для проверки внутрилабораторной (between-run) прецизионности для трех

последовательностей, полученных в ходе проверки сходимости, рассчитывают объединенное среднее значение $\overline{RR}^{intra}$, стандартное отклонение RSD_{RR}^{intra},% и относительный доверительный интервал Δ_{RR}^{intra},%. Величина Δ_{RR}^{intra} не должна превышать максимальную неопределенность анализа maxΔ_{As}:

$$\Delta_{RR}^{intra} = t(95\%, 3n-1) \cdot RSD_{RR}^{intra} \leq \max \Delta_{As}. \quad (4)$$

Результаты определения линейности, правильности и сходимости УФ-спектрофотометрической методики количественного определения доксиламина с использованием модельных растворов приведены в табл. 1 – 2 и свидетельствует о том, что для УФ-спектрофотометрического определения доксиламина в исследуемом диапазоне применения можно применять метод добавок только в случае введения добавки, соответствующей точке 50, 75 или 100% в нормализованных координатах.

В случае введения добавки, соответствующей точке 25% в нормализованных координатах, требования к сходимости и правильности методики не соблюдаются.

Результаты определения линейности, правильности, сходимости и внутрилабораторной прецизионности УФ-спектрофотометрической методики количественного определения доксиламина в крови с использованием модельных образцов приведены в табл. 3–5 – требования к линейности методики выполняются в полном объеме, что же касается правильности и прецизионности, то они находятся в рамках критериев приемлемости только для *Варианта 2* выполнения эксперимента.

Использование *Варианта 1* методики возможно лишь в случае введения добавки, соответствующей точке 50, 75 или 100% в нормализованных координатах. При этом необходимо отметить, что применение *Варианта 1* обеспечивает более низкую величину систематической погрешности, чем *Вариант 2*, но в то же время приводит к худшим показателям прецизионности.

Оптимальные показатели правильности и прецизионности методики наблюдаются в случае введения добавки, соответствующей точке 75% в нормализованных координатах.

В обоих вариантах применения метода добавок фоновое поглощение, обусловленное матрицей, будет одинаковым для обоих спектрофотометрируемых растворов, чего невозможно достичь в методе стандарта. Таким образом, проводя корректировку оптической плотности A_i на величину A_{blank}, мы значительно уменьшаем систематическую ошибку методики, что и подтверждают полученные результаты эксперимента в сравнении с данными, полученными нами ранее для метода стандарта [9].

Преимущество же использования именно *Варианта 1* состоит в том, что он позволяет нивелировать ошибку, связанную с различиями во влиянии биологической матрицы на аналит (в частности на степень извлечения аналита из матрицы) в зависимости от ее состояния (гнилостные изменения, время, прошедшее после наступления смерти, термическое воздействие и т. д.) и источника происхождения (возраст пациента, наличие у него хронических заболеваний и др.), что, как уже обсуждалось ранее [7], в наибольшей степени искажает результаты анализа.

Тем не менее, *Вариант 2* выполнения эксперимента также имеет право на существование, особенно в тех случаях, когда количество анализируемого образца, поступившее в лабораторию, является недостаточным для отбора двух параллельных проб.

Выводы. Таким образом, предложенная ранее [5] процедура определения и оценки приемлемости линейности, правильности и прецизионности для валидации УФ-спектрофотометрических методик количественного определения аналитов в биологических жидкостях, применяемых в судебно-токсикологическом анализе, в варианте метода добавок апробирована на примере УФ-спектрофотометрической методики количественного определения доксиламина в крови. Показано, что в исследуемом диапазоне применения можно применять метод добавок только в случае введения добавки, соответствующей точке 50, 75 или 100% в нормализованных координатах, оптимальным же является использование добавки, соответствующей точке 75%.

Таблица 1. Метрологические характеристики калибровочных прямых *Y = b·X + a*, полученных с использованием модельных растворов доксиламина сукцината

Аналитический диапазон применения методики	Характеристика					
	b^{model}	s_b^{model}	a^{model}	s_a^{model}	RSD_0^{model}	R_c^{model}
D = 25 – 175% (g = 7)	0,995	0,012	0,321	1,498	1,724	0,9996
Критерий приемлемости	–	–	$a^{model} \le 2{,}015 \cdot s_a^{model}$	–	≤ 3,18%	≥ 0,9983
			соотв.		соотв.	соотв.

Таблица 2. Результаты определения правильности и сходимости УФ-спектрофотометрической методики количественного определения доксиламина сукцината по модельным растворам в варианте метода добавок

X_{ad}^{model} = 25%						X_{ad}^{model} = 50%					
Концентрация доксиламина сукцината в модельном растворе ($C_{reference}^{model}$ = 28,8 мкг/мл)		Оптическая плотность		Рассчитанная концентрация доксиламина сукцината в модельном растворе $X_{i,calc}^{model}$, %	RR^{model}, %	Концентрация доксиламина сукцината в модельном растворе ($C_{reference}^{model}$ = 28,8 мкг/мл)		Оптическая плотность		Рассчитанная концентрация доксиламина сукцината в модельном растворе $X_{i,calc}^{model}$, %	RR^{model}, %
$C_{i,fact}^{model}$, мкг/мл	$X_{i,fact}^{model}$, %	A_i^{model}	A_{i+ad}^{model}			$C_{i,fact}^{model}$, мкг/мл	$X_{i,fact}^{model}$, %	A_i^{model}	A_{i+ad}^{model}		
8,00	27,78	0,227	0,443	29,19	105,08	8,00	27,78	0,227	0,667	28,66	103,17
16,00	55,56	0,442	0,657	57,11	102,79	8,00	27,78	0,225	0,664	28,48	102,52
24,00	83,33	0,656	0,891	77,55	93,06	16,00	55,56	0,442	0,891	54,69	98,43
32,00	111,11	0,889	1,121	106,45	95,81	24,00	83,33	0,656	1,112	79,93	95,92
40,00	138,89	1,120	1,348	136,46	98,25	32,00	111,11	0,889	1,338	110,01	99,01
48,00	166,67	1,347	1,571	167,05	100,23	40,00	138,89	1,120	1,571	137,98	99,34
$\overline{RR}^{model}$, %					99,20	$\overline{RR}^{model}$, %					99,73
RSD_{RR}^{model}, %					4,44	RSD_{RR}^{model}, %					2,70
$\Delta_{RR}^{model}, \% = \Delta_{As}^{model} = 1{,}943 \cdot RSD_{RR}^{model} \le 6{,}40\%$					8,95	$\Delta_{RR}^{model}, \% = \Delta_{As}^{model} = 1{,}943 \cdot RSD_{RR}^{model} \le 6{,}40\%$					5,44
					нет						соотв.
$\delta^{model}, \% = \lvert 100 - \overline{RR}^{model} \rvert \le 2{,}05\%$					0,80	$\delta^{model}, \% = \lvert 100 - \overline{RR}^{model} \rvert \le 2{,}05\%$					0,27
					соотв.						соотв.
X_{ad}^{model} = 75%						X_{ad}^{model} = 100%					
Концентрация доксиламина сукцината в модельном растворе ($C_{reference}^{model}$ = 28,8 мкг/мл)		Оптическая плотность		Рассчитанная концентрация доксиламина сукцината в модельном растворе $X_{i,calc}^{model}$, %	RR^{model}, %	Концентрация доксиламина сукцината в модельном растворе ($C_{reference}^{model}$ = 28,8 мкг/мл)		Оптическая плотность		Рассчитанная концентрация доксиламина сукцината в модельном растворе $X_{i,calc}^{model}$, %	RR^{model}, %

$C_{i,fact}^{model}$, мкг/мл	$X_{i,fact}^{model}$, %	A_i^{model}	A_{i+ad}^{model}			$C_{i,fact}^{model}$, мкг/мл	$X_{i,fact}^{model}$, %	A_i^{model}	A_{i+ad}^{model}		
8,00	27,78	0,227	0,888	28,62	103,02	8,00	27,78	0,227	1,112	28,50	102,59
8,00	27,78	0,225	0,892	28,11	101,19	8,00	27,78	0,225	1,106	28,38	102,16
16,00	55,56	0,442	1,112	54,97	98,94	16,00	55,56	0,442	1,332	55,18	99,32
24,00	83,33	0,656	1,328	81,35	97,62	16,00	55,56	0,444	1,341	55,00	98,99
32,00	111,11	0,889	1,551	111,90	100,71	24,00	83,33	0,656	1,551	81,44	97,73
32,00	111,11	0,892	1,553	112,45	101,21	24,00	83,33	0,658	1,557	81,32	97,59
$\overline{RR}^{model}$, %					100,45	$\overline{RR}^{model}$, %					99,73
RSD_{RR}^{model}, %					1,90	RSD_{RR}^{model}, %					2,16
$\Delta_{RR}^{model}, \% = \Delta_{As}^{model} = 1{,}943 \cdot RSD_{RR}^{model} \leq 6{,}40\%$					3,83 соотв.	$\Delta_{RR}^{model}, \% = \Delta_{As}^{model} = 1{,}943 \cdot RSD_{RR}^{model} \leq 6{,}40\%$					4,35 соотв.
$\delta^{model}, \% = \left\|100 - \overline{RR}^{model}\right\| \leq 2{,}05\%$					0,45 соотв.	$\delta^{model}, \% = \left\|100 - \overline{RR}^{model}\right\| \leq 2{,}05\%$					0,27 соотв.

Таблица 3. Метрологические характеристики калибровочных прямых *Y = b·X + a* для УФ-спектрофотометрической методики количественного определения доксиламина в крови

Аналитический диапазон применения методики		Характеристика					
		b	s_b	a	s_a	RSD_0	R_c
D = 25 – 175% (g = 7)	1-й день	0,993	0,026	3,825	3,149	3,624	0,9983
	2-й день	1,007	0,026	–1,193	3,130	3,602	0,9984
	3-й день	1,005	0,028	0,533	3,453	3,974	0,9980
	среднее	1,002	0,026	1,028	3,210	3,694	0,9983
Критерий приемлемости		–	–	$a \leq 2{,}015 \cdot s_a$ соотв.	–	≤ 9,93% соотв.	≥ 0,9830 соотв.

Таблица 4. Результаты определения правильности и сходимости УФ-спектрофотометрической методики количественного определения доксиламина в крови в варианте метода добавок

X_{ad} = 25%																							
Концентрация доксиламина сукцината в крови (C_{st} = 36 мкг/мл)		Оптическая плотность A_i (A_{blank} = 0,060)			*Вариант 1*									*Вариант 2*								
					Оптическая плотность A_{i+ad}			Рассчитанная концентрация доксиламина сукцината в модельном растворе $X_{i,calc}$, %			*RR*, %			Оптическая плотность A'_{i+ad}			Рассчитанная концентрация доксиламина сукцината в модельном растворе $X_{i,calc}$, %			*RR*, %		
$C_{i,fact}$, мкг/мл	$X_{i,fact}$, %	день 1	день 2	день 3	день 1	день 2	день 3	день 1	день 2	день 3	день 1	день 2	день 3	день 1	день 2	день 3	день 1	день 2	день 3	день 1	день 2	день 3
10,00	27,78	0,187	0,231	0,235	0,338	0,372	0,382	23,71	33,69	33,07	85,35	121,27	119,04	0,413	0,456	0,462	23,78	31,62	32,22	85,60	113,82	115,98
20,	55,	0,33	0,37	0,36	0,50	0,54	0,54	43,6	53,8	47,8	78,6	96,9	86,0	0,55	0,59	0,59	50,5	60,1	57,2	90,9	108,	102,

00	56	2	7	8	5	1	6	8	7	0	2	6	3	6	9	2	2	4	1	3	24	97
30,00	83,33	0,514	0,546	0,556	0,672	0,681	0,691	80,51	100,21	101,32	96,62	120,26	121,59	0,738	0,772	0,782	85,27	90,46	91,72	102,33	108,56	110,07
40,00	111,11	0,643	0,671	0,675	0,785	0,802	0,816	113,26	130,78	122,23	101,94	117,70	110,01	0,868	0,895	0,903	108,29	114,69	113,41	97,46	103,22	102,07
50,00	138,89	0,768	0,806	0,810	0,966	0,955	0,955	99,33	139,27	142,71	71,52	100,27	102,75	0,994	1,032	1,032	130,35	138,75	141,19	93,85	99,90	101,66
60,00	166,67	0,955	0,979	0,995	1,116	1,140	1,140	153,48	158,57	179,13	92,09	95,14	107,48	1,181	1,202	1,222	164,77	171,46	172,14	98,86	102,87	103,28
$\overline{RR}$, %											87,69	108,60	107,82	$\overline{RR}$, %						94,84	106,10	106,01
RSD_{RR}, %											11,41	12,37	12,81	RSD_{RR}, %						6,01	5,05	5,78
$\Delta_{RR}, \% = \Delta_{As} = 1{,}943 \cdot RSD_{RR} \leq 20{,}0\%$											22,99	24,93	25,81	$\Delta_{RR}, \% = \Delta_{As} = 1{,}943 \cdot RSD_{RR} \leq 20{,}0\%$						12,11	10,18	11,65
											нет	**нет**	**нет**							соотв.	соотв.	соотв.
$\delta, \% = \lvert 100 - \overline{RR} \rvert \leq 6{,}40\%$											12,31	8,60	7,82	$\delta, \% = \lvert 100 - \overline{RR} \rvert \leq 6{,}40\%$						5,16	6,10	6,01
											нет	**нет**	**нет**							соотв.	соотв.	соотв.

X_{ad} = 50%

Концентрация доксиламина сукцината в крови (C_{st} = 36 мкг/мл)		Оптическая плотность A_i (A_{blank} = 0,060)			*Вариант 1*									*Вариант 2*								
					Оптическая плотность A_{i+ad}			Рассчитанная концентрация доксиламина сукцината в модельном растворе $X_{i,calc}$, %			*RR*, %			Оптическая плотность $A^{/}_{i+ad}$			Рассчитанная концентрация доксиламина сукцината в модельном растворе $X_{i,calc}$, %			*RR*, %		
$C_{i,fact}$, мкг/мл	$X_{i,fact}$, %	день 1	день 2	день 3	день 1	день 2	день 3	день 1	день 2	день 3	день 1	день 2	день 3	день 1	день 2	день 3	день 1	день 2	день 3	день 1	день 2	день 3
10,00	27,78	0,191	0,221	0,214	0,486	0,551	0,556	25,22	27,02	25,18	90,78	97,26	90,64	0,630	0,673	0,673	25,38	29,77	28,29	91,36	107,16	101,84
10,00	27,78	0,197	0,214	0,220	0,496	0,526	0,546	25,64	27,42	27,44	92,30	98,70	98,78	0,641	0,656	0,656	25,98	29,12	30,94	93,52	104,82	111,38
20,00	55,56	0,342	0,377	0,368	0,622	0,681	0,691	55,96	58,12	52,82	100,72	104,61	95,07	0,785	0,819	0,819	53,21	60,14	56,96	95,77	108,24	102,52
30,00	83,33	0,514	0,546	0,526	0,795	0,838	0,816	89,96	92,66	89,28	107,96	111,20	107,14	0,956	0,988	0,988	86,24	92,09	84,13	103,49	110,51	100,96
40,00	111,11	0,643	0,671	0,675	0,946	0,955	0,979	106,9	119,73	112,95	96,21	107,76	101,66	1,086	1,113	1,113	110,00	115,73	117,55	99,00	104,16	105,80
50,00	138,89	0,768	0,806	0,810	1,085	1,126	1,140	124,09	129,70	126,27	89,34	93,38	90,91	1,211	1,248	1,248	133,58	141,26	142,80	96,18	101,71	102,82
$\overline{RR}$, %											96,22	102,15	97,37	$\overline{RR}$, %						96,55	106,10	104,22
RSD_{RR}, %											7,08	6,81	6,45	RSD_{RR}, %						4,27	3,16	3,87
$\Delta_{RR}, \% = \Delta_{As} = 1{,}943 \cdot RSD_{RR} \leq 20{,}0\%$											14,27	13,72	13,00	$\Delta_{RR}, \% = \Delta_{As} = 1{,}943 \cdot RSD_{RR} \leq 20{,}0\%$						8,60	6,37	7,80
											соотв.	соотв.	соотв.							соотв.	соотв.	соотв.
$\delta, \% = \lvert 100 - \overline{RR} \rvert \leq 6{,}40\%$											3,78	2,15	2,63	$\delta, \% = \lvert 100 - \overline{RR} \rvert \leq 6{,}40\%$						3,45	6,10	4,22
											соотв.	соотв.	соотв.							соотв.	соотв.	соотв.

X_{ad} = 75%

Концентрация доксиламина сукцината в крови (C_{st} = 36 мкг/мл)	Оптическая плотность A_i (A_{blank} = 0,060)	*Вариант 1*			*Вариант 2*		
		Оптическая плотность A_{i+ad}	Рассчитанная концентрация доксиламина сукцината в модельном	*RR*, %	Оптическая плотность $A^{/}_{i+ad}$	Рассчитанная концентрация доксиламина сукцината в модельном	*RR*, %

								растворе $X_{i,calc}$, %									растворе $X_{i,calc}$, %					
$C_{i,fact}$, мкг/мл	$X_{i,fact}$, %	день 1	день 2	день 3	день 1	день 2	день 3	день 1	день 2	день 3	день 1	день 2	день 3	день 1	день 2	день 3	день 1	день 2	день 3	день 1	день 2	день 3
10,00	27,78	0,191	0,221	0,214	0,632	0,681	0,662	25,19	29,10	28,90	90,68	104,75	104,03	0,840	0,887	0,882	25,74	30,31	29,14	92,66	109,11	104,90
10,00	27,78	0,197	0,214	0,220	0,643	0,676	0,691	25,84	27,72	28,48	93,02	99,78	102,52	0,854	0,890	0,887	26,34	28,57	30,27	94,82	102,84	108,96
20,00	55,56	0,342	0,377	0,368	0,768	0,842	0,783	55,16	57,11	61,84	99,28	102,79	111,30	0,991	1,044	1,035	54,40	59,78	57,90	97,91	107,60	104,21
30,00	83,33	0,514	0,546	0,526	0,946	0,979	0,955	87,97	93,94	90,31	105,57	112,73	108,38	1,171	1,223	1,183	86,84	90,20	88,94	104,21	108,24	106,73
40,00	111,11	0,643	0,671	0,675	1,085	1,126	1,137	109,91	112,08	111,35	98,92	100,87	100,22	1,300	1,338	1,332	111,27	115,06	117,57	100,14	103,56	105,81
40,00	111,11	0,653	0,683	0,671	1,085	1,132	1,118	114,39	115,37	114,35	102,95	103,83	102,92	1,310	1,350	1,328	113,18	117,12	116,81	101,86	105,41	105,13
$\overline{RR}$, %											98,40	104,13	104,90	$\overline{RR}$, %						98,60	106,13	105,96
RSD_{RR}, %											5,69	4,60	4,13	RSD_{RR}, %						4,35	2,59	1,70
$\Delta_{RR}, \% = \Delta_{As} = 1{,}943 \cdot RSD_{RR} \leq 20{,}0\%$											11,47 соотв.	9,27 соотв.	8,32 соотв.	$\Delta_{RR}, \% = \Delta_{As} = 1{,}943 \cdot RSD_{RR} \leq 20{,}0\%$						8,77 соотв.	5,22 соотв.	3,43 соотв.
$\delta, \% = \lvert 100 - \overline{RR} \rvert \leq 6{,}40\%$											1,60 соотв.	4,13 соотв.	4,90 соотв.	$\delta, \% = \lvert 100 - \overline{RR} \rvert \leq 6{,}40\%$						1,40 соотв.	6,13 соотв.	5,96 соотв.

X_{ad} = 100%

Концентрация доксиламина сукцината в крови (C_{st} = 36 мкг/мл)		Оптическая плотность A_i (A_{blank} = 0,060)			*Вариант 1*									*Вариант 2*								
					Оптическая плотность A_{i+ad}			Рассчитанная концентрация доксиламина сукцината в модельном растворе $X_{i,calc}$, %			*RR*, %			Оптическая плотность A'_{i+ad}			Рассчитанная концентрация доксиламина сукцината в модельном растворе $X_{i,calc}$, %			*RR*, %		
$C_{i,fact}$, мкг/мл	$X_{i,fact}$, %	день 1	день 2	день 3	день 1	день 2	день 3	день 1	день 2	день 3	день 1	день 2	день 3	день 1	день 2	день 3	день 1	день 2	день 3	день 1	день 2	день 3
10,00	27,78	0,191	0,221	0,214	0,768	0,842	0,795	25,70	28,81	29,64	92,51	103,71	106,7	1,071	1,12	1,104	25,30	29,94	29,15	91,07	107,78	104,93
10,00	27,78	0,197	0,214	0,220	0,768	0,832	0,810	26,90	27,69	30,37	96,83	99,68	109,32	1,086	1,113	1,119	25,95	28,64	29,94	93,41	103,10	107,78
20,00	55,56	0,342	0,377	0,368	0,931	0,979	0,955	53,20	58,79	58,20	95,75	105,81	104,75	1,231	1,276	1,257	53,03	59,14	57,92	95,45	106,44	104,25
20,00	55,56	0,354	0,368	0,377	0,946	0,986	0,979	55,46	55,38	58,79	99,82	99,68	105,81	1,243	1,257	1,266	55,48	57,92	59,80	99,86	104,25	107,63
30,00	83,33	0,514	0,546	0,526	1,095	1,126	1,137	87,16	93,29	84,74	104,60	111,95	101,69	1,403	1,445	1,415	85,57	90,57	87,64	102,69	108,69	105,17
30,00	83,33	0,534	0,537	0,537	1,115	1,132	1,128	90,65	88,93	89,68	108,78	106,72	107,62	1,442	1,436	1,426	87,18	88,71	89,71	104,62	106,46	107,66
$\overline{RR}$, %											99,72	104,59	105,98	$\overline{RR}$, %						97,85	106,12	106,24
RSD_{RR}, %											6,03	4,67	2,62	RSD_{RR}, %						5,38	2,11	1,62
$\Delta_{RR}, \% = \Delta_{As} = 1{,}943 \cdot RSD_{RR} \leq 20{,}0\%$											12,15 соотв.	9,41 соотв.	5,28 соотв.	$\Delta_{RR}, \% = \Delta_{As} = 1{,}943 \cdot RSD_{RR} \leq 20{,}0\%$						10,84 соотв.	4,25 соотв.	3,26 соотв.
$\delta, \% = \lvert 100 - \overline{RR} \rvert \leq 6{,}40\%$											0,28 соотв.	4,59 соотв.	5,98 соотв.	$\delta, \% = \lvert 100 - \overline{RR} \rvert \leq 6{,}40\%$						2,15 соотв.	6,12 соотв.	6,24 соотв.

Таблица 5. Результаты определения внутрилабораторной прецизионности УФ-спектрофотометрической методики количественного определения доксиламина в крови в варианте метода добавок

Характеристика	*Вариант 1*				*Вариант 2*			
	X_{ad} = 25%	X_{ad} = 50%	X_{ad} = 75%	X_{ad} = 100%	X_{ad} = 25%	X_{ad} = 50%	X_{ad} = 75%	X_{ad} = 100%
$\overline{RR}^{intra}$, %	101,37	98,58	102,47	103,43	102,32	102,29	103,56	103,40
RSD_{RR}^{intra}, %	12,21	6,79	4,85	4,66	5,63	3,79	3,08	3,46
$\Delta_{RR}^{intra}, \% = 1{,}740 \cdot RSD_{RR}^{intra} \leq 20{,}0\%$	21,24	11,81	8,44	8,11	9,79	6,59	5,36	6,02
	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.
$\delta^{intra}, \% = \left\|100 - \overline{RR}^{intra}\right\| \leq 6{,}40\%$	1,37	1,42	2,47	3,43	2,32	2,29	3,56	3,40
	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.

ЛИТЕРАТУРА

1. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation / U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evolution and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). – Washington, DC: U.S. Government Printing Office, 2001. – 22 p.
2. Guideline on bioanalytical method validation / European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). – London, 2009. – 22 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 (draft) / Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX), 2012. – 52 p.
5. Klimenko L.Yu. Determination of linearity, accuracy and precision of UV-spectrophotometric methods of quantification in forensic and toxicological analysis in the variant of the method of additions / L.Yu. Klimenko // Фармация Казахстана, 2014. – №7. – С. 51 – 58.
6. Гризодуб А.И. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств / А.И. Гризодуб // Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств: в 3 т. / под редакцией чл.-кор. НАН Украины В. П. Георгиевского. – Харьков: НТМТ, 2011. – Т. 3. – 520 с.
7. Validation of UV-spectrophotometric methods of quantitative determination in forensic and toxicological analysis: recovery / L.Yu. Klimenko, S.M. Trut, G.P. Petyunin [et al] // Фармация Казахстана, 2013. – №12. – С. 42 – 48.
8. Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material: 4th ed. / edited by A.C. Moffat, M.D. Osselton, B.Widdop. – London: Pharmaceutical Press, 2011. – 2609 p.
9. Klimenko L.Yu. Determination of validation characteristics of UV-spectrophotometric method of doxylamine quantitative determination in blood in the variant of the method of standard / L.Yu. Klimenko, S.M. Trut, S.M. Poluyan // Вісник фармації. -2014. – №2. – С. 53 – 58.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВАЛИДАЦИОННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДОКСИЛАМИНА В КРОВИ В ВАРИАНТЕ МЕТОДА ДОБАВОК

Проведено определение и оценка приемлемости линейности, правильности и прецизионности УФ-спектрофотометрической методики количественного определения доксиламина в крови в варианте метода добавок и показано, что в исследуемом диапазоне применения можно применять метод добавок только в случае введения добавки, соответствующей точке 50, 75 или 100% в нормализованных координатах, оптимальным же является использование добавки, соответствующей точке 75%.

Ключевые слова: валидация, биоаналитические методики, УФ-спектрофотометрия, доксиламин, метод добавок.

DETERMINATION OF VALIDATION CHARACTERISTICS OF UV-SPECTROPHOTOMETRIC METHOD OF DOXYLAMINE QUANTIFICATION IN BLOOD IN THE VARIANT OF THE METHOD OF ADDITIONS

Determination and acceptability estimation of linearity, accuracy and precision of UV-spectrophotometric method of doxylamine quantitative determination in blood in the variant of the method of additions have been carried out. It has been shown that the method of additions can be applied only in the case of addition introduction corresponded to the point of 50, 75 or 100% in the normalized coordinates for researched range of application; application of addition corresponded to the point of 75% is optimal.

Key words: validation, bioanalytical methods, UV-spectrophotometry, doxylamine, method of additions.

Сведения об авторах: ***Клименко Л.Ю.*** - кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры аналитической химии, Национальный фармацевтический университет. Телефон: +**38 (050) 401-37-62. lynnne2@ukr.net**

Трут С. Н. - заместитель генерального директора Государственного предприятия «Укрвакцина» Министерства здравоохранения Украины

Степаненко В.И. - кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры токсикологической химии, Национальный фармацевтический университет

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВНЕШНИХ ПРИЗНАКОВ ИМАГИОНАЛЬНОЙ И ПРЕИМАГИОНАЛЬНОЙ ФАЗЫ ЯБЛОННОЙ ПЛОДОЖОРКИ *(Laspeyresia pomonella L.)* В ХОЗЯЙСТВАХ ГАНЧИНСКОГО РАЙОНА СОГДИЙСКОЙ ОБЛАСТИ
Ф.С. Абдунабиев, М.Х. Амонов, А.К. Асоев*…….. *146

ЭФИРОМАСЛИЧНЫЕ РАСТЕНИЯ И ЭФИРНЫЕ МАСЛА -ИСТОЧНИКИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)
А.К. Холов, Д.А. Азонов*…… *153

ПОКАЗАТЕЛИ ВОДНОГО РЕЖИМА И ЗАСУХОУСТОИЧИВОСТЬ ГЕНОТИПОВ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ (*Solanum tuberosum L.*)
Н.Х. Норкулов, З.Б. Давлятназарова, С.Х. Ашуров, Н.Н. Назарова, М.Л. Азимов, М.М. Масаидова, И.С. Каспарова, К.А. Алиев*…… *160

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ВОДЫ В РЕКЕ КАФИРНИГАН И ЕЁ ОСНОВНЫХ ПРИТОКАХ
Д.А. Абдушукуров, Х. Пасселл, З.Н. Салибаева*…… *164

РЕГУЛИРУЮЩИЕ ВЛИЯНИЯ НЕЙРОПЕПТИДА ВАЗОПРЕССИНА НА ПОВЕДЕНИЕ РЕПТИЛИЙ
М.Б. Устоев, С.С. Саидова*…….. *171

ХАТАРОТИ ЗИСТМУҲИТИ (ЭКОЛОГӢ)-И ХАЛИҶИ ФОРС МУТААССИР АЗ ОЛУДАГИҲОИ НАФТӢ
Абдуллоҳ Раисии Саросиёб, Б. Мирзоев, М.Саидов*……. *174

ВРЕДИТЕЛИ ЕСТЕСТВЕННЫХ НАСАЖДЕНИИ ШИПОВНИКА ВОСТОЧНОЙ ЧАСТИ ХАТЛОНСКОЙ ОБЛАСТИ РЕСПУБЛИКИ ТАДЖИКИСТАН
И.Х. Раджабов*……. *178

МЕДИЦИНА - ФАРМАЦИЯ

ИЗУЧЕНИЕ ТЕНДЕНЦИИ РАЗВИТИЯ РЫНКА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНИ ЖЕЛУДКА В УКРАИНЕ
А.А. Котвицкая, В.П. Ходаковская*……. *181

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИСАХАРИДОВ ТРАВЫ ЛЬНЯНКИ ОБЫКНОВЕННОЙ
А. А. Крутских, В. С. Кисличенко, З. И. Омельченко*…….. *187

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВАЛИДАЦИОННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДОКСИЛАМИНА В КРОВИ В ВАРИАНТЕ МЕТОДА ДОБАВОК
Л.Ю. Клименко, С.Н. Трут, В.И. Степаненко*……. *189

НОВЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ 3-МЕРКАПТО-4-АМИНО-5-АРИЛ-1,2,4-ТРИАЗОЛА-4Н. СИНТЕЗ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ПРОГНОЗ АКТИВНОСТИ
Н.Б. Саидов, В.А. Георгиянц*…… *200

НАУЧНО-МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЮ ВНЕШНЕЙ ТЕРАПИИ БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ
А.А. Котвицкая, В.В. Карло*……. *204

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ СОДЕРЖАНИЕ ФЛАВОНОИДОВ В ПРЕПАРАТАХ СЕДАТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ
П.С. Омельченко, Е.В. Гладух, И.С. Бурлака*…….. *209

ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ СЕМЯН ОМЕЛЫ БЕЛОЙ
Д.В. Упыр, А.В. Мартынов, В.С. Кисличенко*…… *211

ИЗУЧЕНИЕ ХИМИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ СУСПЕНЗИИ АЗИТРОМИЦИНА АПТЕЧНОГО ИЗГОТОВЛЕНИЯ
А. Х. Валиев, А. А. Здорик, В. А. Георгиянц*……... *214

ИЗУЧЕНИЕ НЕДОЕДАНИЯ СРЕДИ ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА В РЕСПУБЛИКЕ ТАДЖИКИСТАН
Х.С. Хайров, К. Исмонов, А.Р. Ахмедова, Ф.М. Ходжаев, Ф.Дж. Хасанов*…… *218