

УДК 615.214.24:543.422.3/7:543.054

Л. Ю. КЛИМЕНКО¹, С. Н. ТРУТ¹, И. М. ИВАНЧУК²¹Национальный фармацевтический университет, г. Харьков²ГВУЗ «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 схеме 1.

Дизайн эксперимента представлен на схеме 2.

Для каждой из разработанных методик анализировали калибровочные и модельные образцы (см. схему 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 (pH = 11) и слабокислой – pH = 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 pH 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 (см. схему 2).

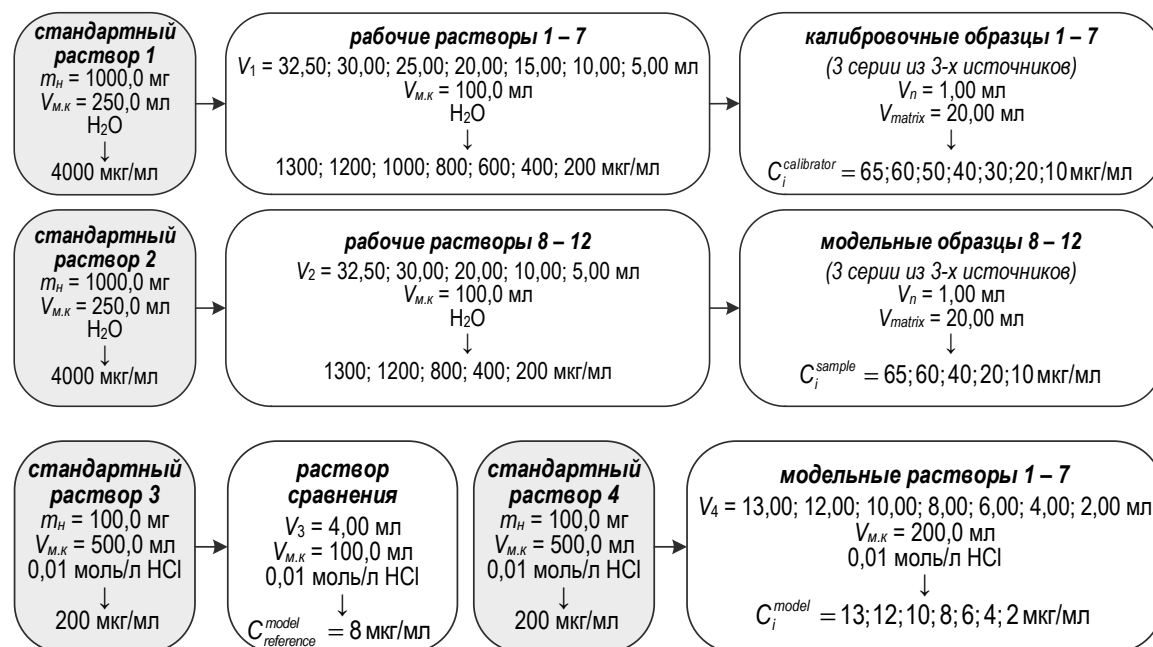


Схема 1. Процедура приготовления растворов и образцов для валидации экстракционно-спектрофотометрических методик определения доксиламина в моче

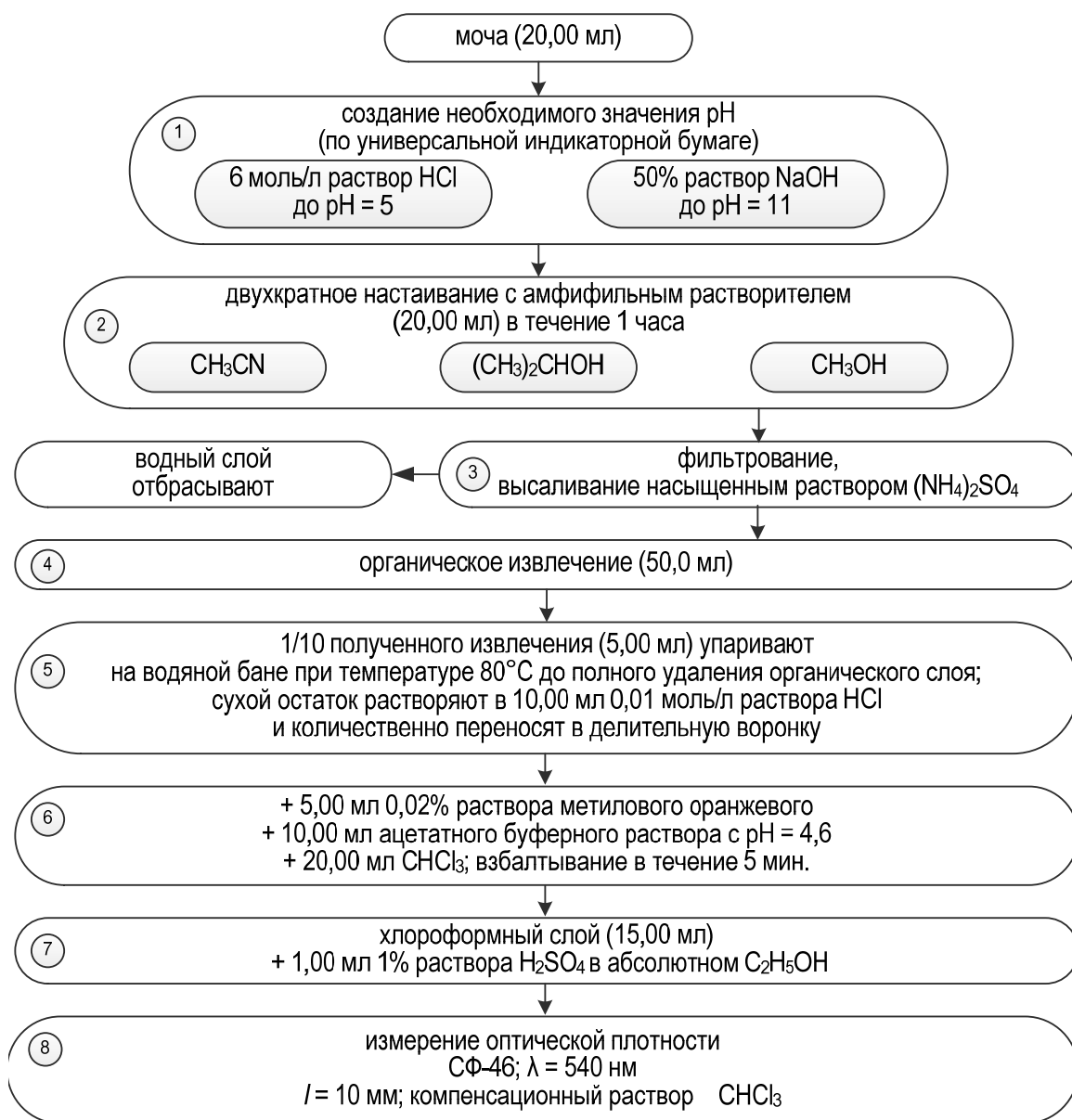


Схема 2. Основные этапы методик экстракционно-фотометрического определения доксиламина в моче

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.

Валидацию методик на первом этапе проводили с использованием модельных растворов (схема 3) исходя из того, что неопределенность количественного определения аналита в модельных растворах Δ_{δ}^{model} равна неопределенности процедуры пробоподготовки анализируемых образцов [3, 5, 10, 14]; суммарные результаты валидации приведены в табл. 1.

Таким образом, модифицированная методика количественного определения доксиламина сукцината методом экстракционной фотометрии характеризуется удовлетворительной линейностью, правильностью и сходимостью, что дает возможность рекомендовать ее к дальнейшему применению в судебной токсикологии с целью разработки методик анализа биологических объектов на содержание в них доксиламина.

Необходимо отметить возможность выполнения анализа как методом калибровочного графика, так и методом стандарта.

На втором этапе проводили валидацию методик с использованием калибровочных и модельных образцов (схема 4). Суммарные результаты валидации приведены в табл. 2 – 3 и позволяют говорить о приемлемых показателях специфичности, степени извлечения, линейности, правильности, сходимости и внутрилабораторной прецизионности всей серии разработанных экстракционно-фотометрических методик количественного определения доксиламина в моче.

Результаты изучения специфичности показывают, что во всех случаях проведение изолирования доксиламина из моче при pH = 5

обеспечивает более низкий вклад компонентов биологической матрицы в поглощение основного опыта, чем в случае использования щелочного значения pH; в то же время, по результатам изучения степени извлечения, в данных условиях отмечается небольшое снижение эффективности выделения доксиламина из мочи – на 3–5 %. Наибольшей эффективностью извлечения характеризуются методики с использованием ацетонитрила.

Воспроизводимость значений степени извлечения и оптической плотности blank-образцов соответствует критериям приемлемости для всех вариантов методик.

Значения оптических плотностей, полученные для blank-образцов 2, свидетельствуют о корректном выборе процедуры пробоподготовки для всех рассмотренных случаев.

С учетом данных относительно A_{blank} и R исследования линейности, правильности и прецизионности проводились только для серии методик с использованием слабокислой среды для выделения доксиламина из мочи.

В целом, все изученные методики характеризуются удовлетворительными параметрами линейности, правильности и прецизионности как в варианте МКГ, так и МС.

В случае анализа МС во всех случаях отмечается увеличение систематической ошибки методик и ухудшение сходимости результатов анализа, в то же время показатели внутрилабораторной прецизионности значительно лучше, чем в случае МКГ.

Таблица 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
1) линейность				
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	$\geq 0,9915$
2) правильность и сходимость				
$RR^{model}(\bar{z}^{model})$	101,41	–	101,54	–
$RSD_{RR}^{model}(RSD_z^{model})$	2,21	–	2,21	–
σ^{model}	1,41	$\leq 4,52\%$	1,54	$\leq 4,52\%$
$\Delta_{RR}^{model}(\Delta_z^{model})$	4,29	$\leq 10,00\%$	4,29	$\leq 14,14\%$

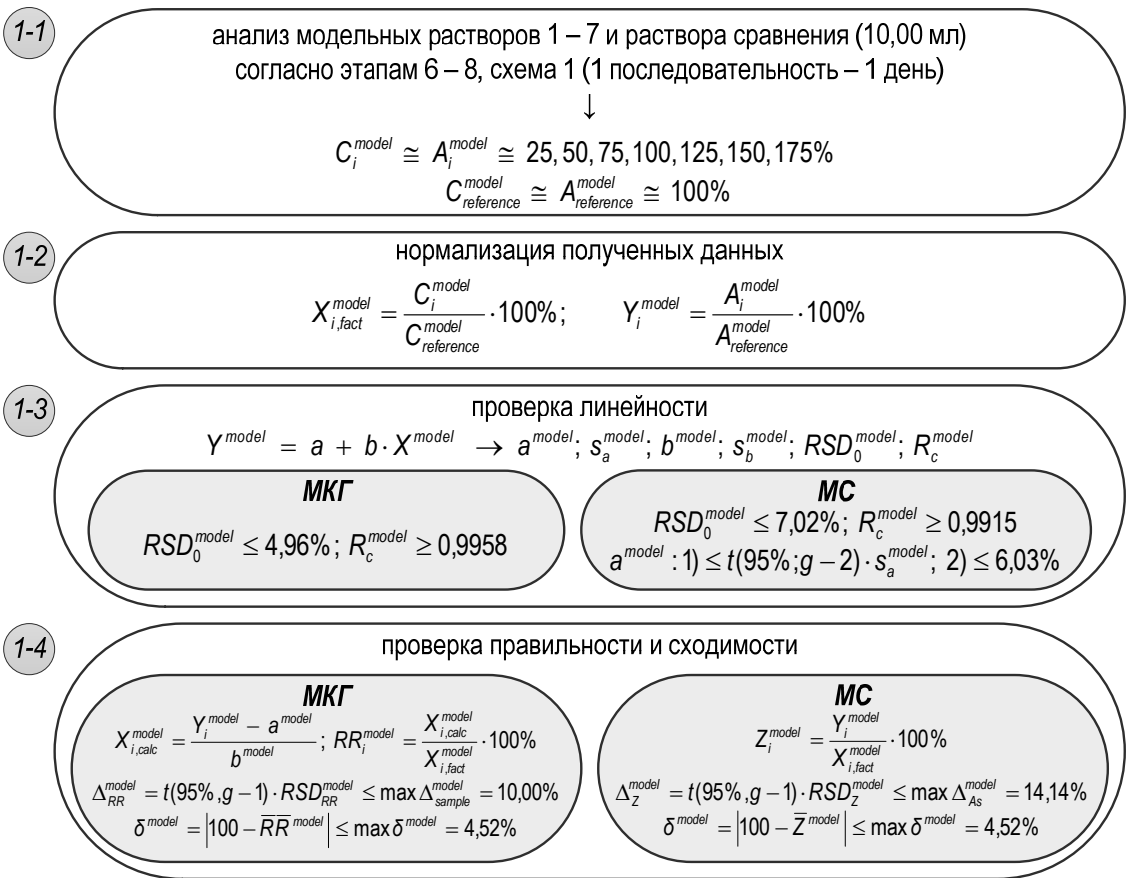


Схема 3. Этапы валидации экстракционно-фотометрических методик определения доксиламина сульфата с использованием модельных растворов

Таблица 2

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

Характеристика pH = 5		(CH ₃) ₂ CHOH		CH ₃ CN		CH ₃ OH		критерий приемлемости
		pH = 11	pH = 5	pH = 11	pH = 5	pH = 11		
специфичность	$\bar{A}_{blank}$	0,024	0,035	0,022	0,034	0,028	0,032	–
	RSD _{nom} (blank)	3,58	6,56	5,08	6,43	6,22	5,54	≤ 6,71%
	δ_{blank} (25 %)	18,70	27,73	14,04	27,25	20,56	25,19	≤ 8,00%
	δ_{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	–
	$\delta_{procedure}(25\%)$	4,23	4,75	3,90	6,07	4,44	5,81	≤ 0,32 δ_{blank}
степень извлечения	$\bar{R}$	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	

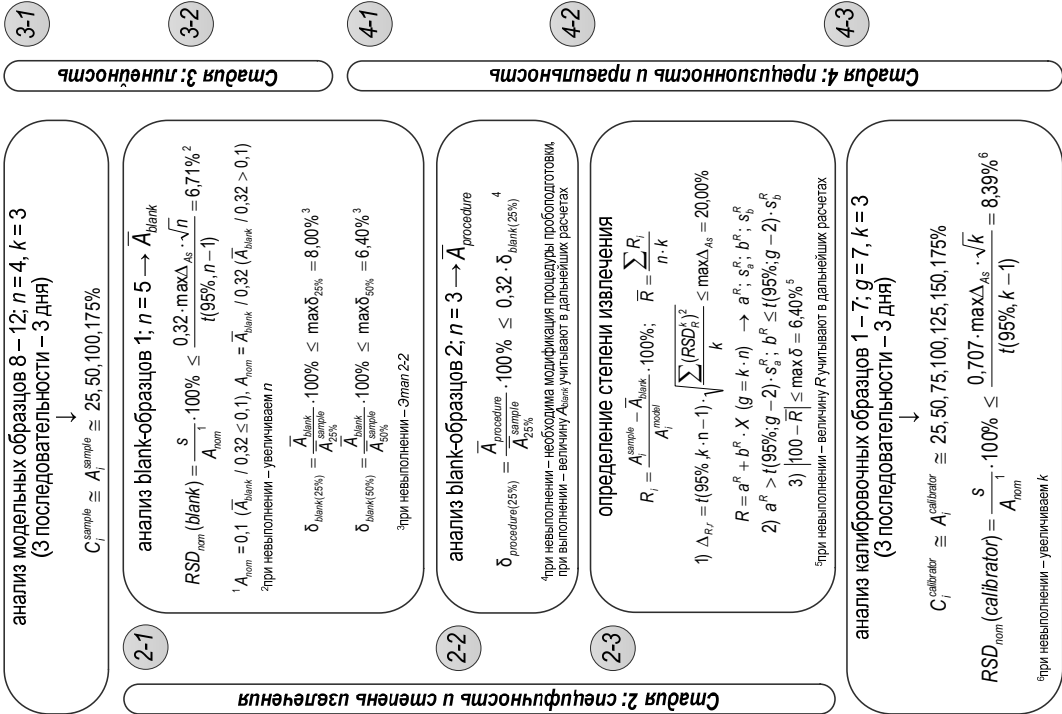
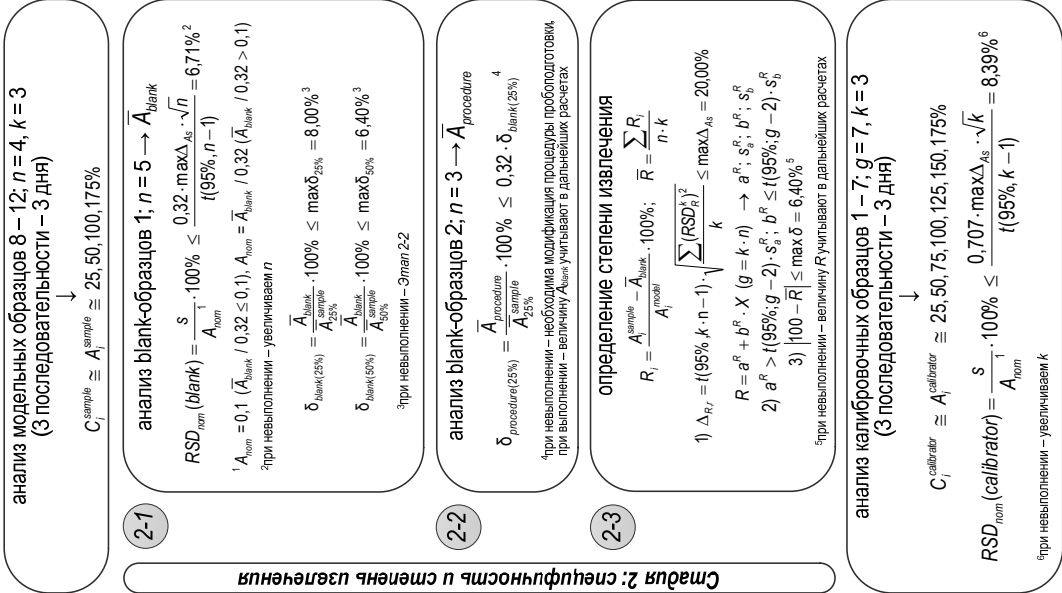


Схема 4. Этапы валидации экстракционно-фотометрических методов определения доксиламина в моче с использованием модельных и калибровочных образцов



Таблиця 3

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

Параметр		МКГ			МС			критерий приемлемости
		$(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$	CH_3CN	CH_3OH	$(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$	CH_3CN	CH_3OH	
линейность	max a^k	3,079	3,459	6,302	-3,739	-2,639	-2,131	МКГ: –
	a	2,567	2,568	4,738	–	–	–	МС: $\leq 8,53\%$
	max RSD_0^k	3,128	3,512	4,750	3,130	3,509	4,752	МКГ: $\leq 7,02\%$
	RSD_0	1,161	2,768	3,394	–	–	–	МС: $\leq 9,93\%$
	min R_c^k	0,9986	0,9982	0,9964	0,9986	0,9982	0,9964	МКГ: $\geq 0,9915$
	R_c	0,9998	0,9989	0,9982	–	–	–	МС: $\geq 0,9830$
правильность	max δ^k	0,91	0,93	0,74	1,58	1,33	3,18	$\leq 6,40\%$
	$\overline{RR}^{intra} (\overline{Z}^{intra})$	99,88	100,44	99,62	100,98	100,77	97,73	–
	δ^{intra}	0,12	0,44	0,38	0,98	0,77	2,27	$\leq 6,40\%$
	$\overline{RR}^{sample}$	101,88	102,21	104,42	–	–	–	–
	δ^{sample}	1,88	2,21	4,42	–	–	–	$\leq 6,40\%$
прецизионность	max Δ_{RR}^k	8,71	13,25	8,43	–	–	–	$\leq 14,14\%$
	max Δ_Z^k	–	–	–	14,30	11,60	12,53	$\leq 20,00\%$
	Δ_{RR}^{intra}	6,31	8,31	7,17	–	–	–	$\leq 14,14\%$
	Δ_Z^{intra}	–	–	–	9,33	7,76	8,45	$\leq 20,00\%$
	Δ_{RR}^{sample}	11,21	7,63	12,46	–	–	–	$\leq 20,00\%$

**ВЫВОДЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ
ДАЛЬНЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Разработана серия экстракционно-фотометрических методик количественного определения док-силамина 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**

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

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

- 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.
- 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.
- 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.
- 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: 4th 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