

УДК 615.214.24:543.544.5:543.544.054.9:543.422.3/7:543.054

С. Н. Трут¹, Л. Ю. Клименко¹, Е. Е. Микитенко¹, Ю. А. Мирошніченко²¹Национальный фармацевтический университет, г. Харьков²Запорожский государственный медицинский университет, г. Запорожье

ПРИМЕНЕНИЕ ДЕРИВАТИВНОЙ ТСХ-ОЧИСТКИ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДОКСИЛАМИНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

Разработан способ деривативной ТСХ-очистки извлечений из крови и мочи, содержащих доксиламин, что позволило увеличить степень элюирования доксиламина и уменьшить количество соэкстрактивных веществ в полученных элюатах. Разработан набор методик определения доксиламина в биологических жидкостях с использованием деривативной ТСХ-очистки и проведена их валидация в варианте метода калибровочного графика. Показаны возможности применения предложенного способа деривативной ТСХ-очистки по отношению к биологическим жидкостям, подвергшимся процессам гниения.

Ключевые слова: валидация, биоаналитические методики, доксиламин, метод калибровочного графика, деривативная тонкослойная хроматография.

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМЫ

Одной из насущных проблем в процессе разработки аналитических методик для применения в химико-токсикологическом анализе является обеспечение необходимой степени специфичности по отношению к компонентам биологической матрицы. Особую важность данный вопрос приобретает в контексте анализа биологических объектов, подвергшихся процессам гниения, горения, хранения в различных условиях в течение длительного времени, многократной заморозки/разморозки и т. д. [9, 10, 17].

Решение данной проблемы лежит в плоскости разработки эффективных методов очистки извлечений из биологического материала.

АНАЛИЗ ПОСЛЕДНИХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ПУБЛИКАЦИЙ

Авторами [1] разработан способ очистки извлечений из крови и мочи, содержащих доксиламин, методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) путем их нанесения на линию старта хроматографической пластины (параллельно на пластину наносят «свидетель»), проведения элюирования хроматографической пластины с использованием подвижных фаз: 1) хлороформ; 2) хлороформ – метанол (9:1), проявления пятна

«свидетеля» реактивом Драгендорфа и элюирования доксиламина 0,1 или 0,01 моль/л раствором кислоты хлористоводородной из зоны хроматографической пластины, которая соответствует пятну «свидетеля».

ВЫДЕЛЕНИЕ НЕРЕШЕННЫХ РАНЕЕ ЧАСТЕЙ ОБЩЕЙ ПРОБЛЕМЫ

Недостатком разработанного ранее [1] способа ТСХ-очистки является относительно низкая степень элюирования доксиламина с хроматографической пластины и относительно большое количество соэкстрактивных веществ в полученных элюатах.

ФОРМУЛИРОВКА ЦЕЛЕЙ СТАТЬИ

Цель данной работы:

- разработка способа очистки извлечений из крови и мочи, содержащих доксиламин, с помощью метода деривативной ТСХ, который позволит увеличить степень элюирования доксиламина с хроматографической пластины и уменьшить количество соэкстрактивных веществ в полученных элюатах;
- разработка набора методик количественного определения доксиламина в биологических жидкостях с использованием деривативной ТСХ-очистки на базе предло-

женных ранее экстракционно-фотометрической [4], УФ-спектрофотометрической [2, 11, 14, 19] и ВЭЖХ-методик [12];

- проведение валидации предложенных методик в соответствии с [5, 6, 11, 15, 16, 19] в варианте метода калибровочного графика (МКГ);
- оценка возможностей применения предложенного способа деривативной ТСХ-очистки по отношению к биологическим жидкостям, подвергшимся процессам гниения.

ИЗЛОЖЕНИЕ ОСНОВНОГО МАТЕРИАЛА ИССЛЕДОВАНИЙ

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 (см. рис. 1), а также *blank*-образцы (5 образцов (20,00 мл) соответствующей матрицы, полученной от различных источников, в которые введено по 1,00 мл воды дистиллированной).

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

Хроматографирование каждого анализируемого раствора проводили три раза либо, при

необходимости, больше, руководствуясь предложенными нами требованиями к сходимости площадей пиков S для повторных инъекций – относительное стандартное отклонение среднего результата RSD_{nom} , определенное по отношению к номинальному значению площади пика S_{nom} , не должно превышать:

$$RSD_{nom} = \frac{s}{S_{nom}} \cdot 100\% \leq \max RSD_{nom} =$$

$$= \frac{0,1 \cdot \max \Delta_{AS} \cdot \sqrt{n}}{t(95\%; n-1)} = \begin{cases} 1,21\%; n=3 \\ 1,74\%; n=4 \\ 2,15\%; n=5 \\ 2,49\%; n=6 \end{cases},$$

$$* S_{nom} = S_{25\%}^{model}$$

где $\max \Delta_{AS}$ – максимально допустимая относительная неопределенность методики анализа, $\max \Delta_{AS} = 20\%$ [13]; $\bar{S}_{8\%}^{sample}$ – среднее значение площади пика, полученное при анализе модельных образцов с концентрацией аналита, соответствующей точке 25 % в нормализованных координатах.

Изолирование доксиламина из биологических жидкостей предложено проводить с помощью амфифильных растворителей в условиях насыщения водной фазы электролитом – подход, пользующийся широкой популярностью в современном судебно-токсикологическом анализе [3, 7, 9, 10]. В работе использован такой амфифильный растворитель, как ацетонитрил; в ка-

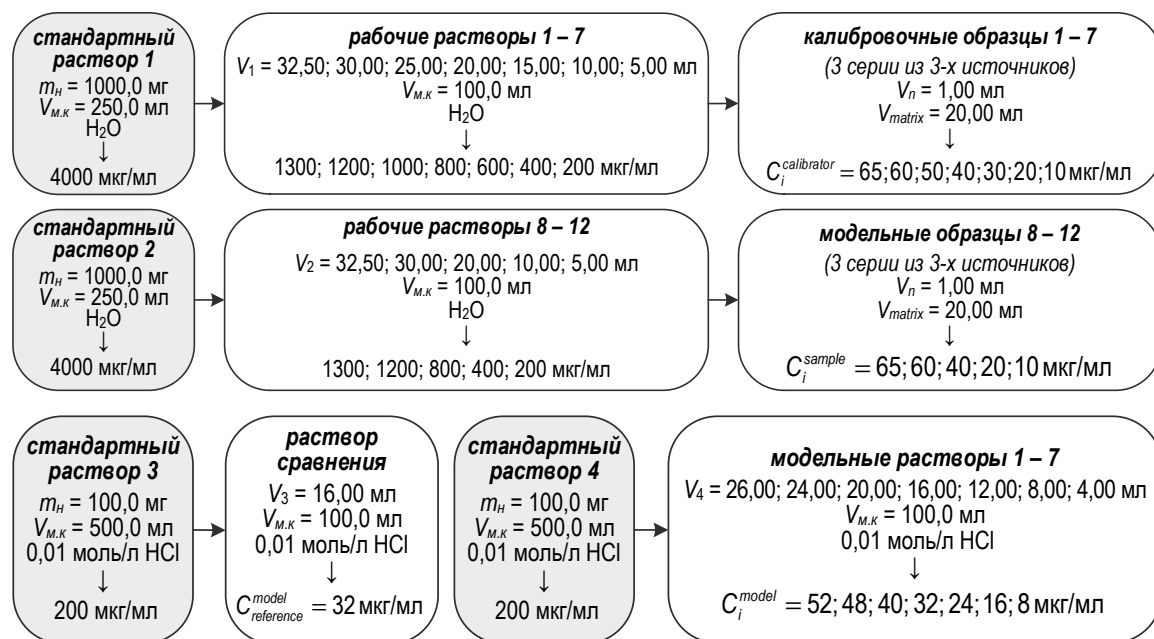


Рис. 1. Процедура приготовления растворов и образцов для валидации методик количественного определения доксиламина в биологических жидкостях

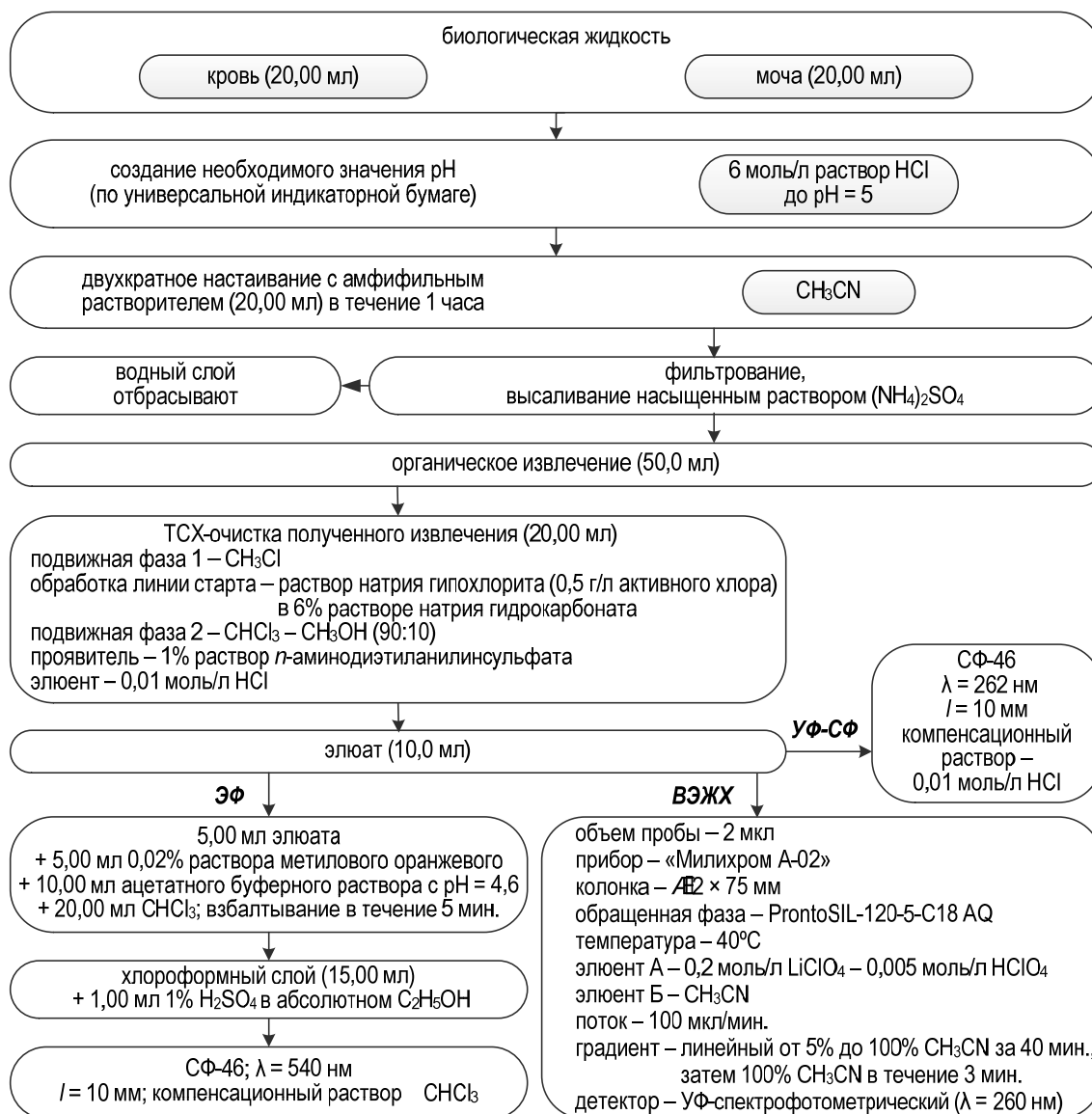


Рис. 2. Основные этапы методик количественного определения доксиламина в биологических жидкостях

честве электролита для насыщения водной фазы использовали аммония сульфат.

Изолирование проводили в слабокислой среде – pH = 5. Выполнение изолирования аналитов из биологических объектов в слабокислой среде в ряде случаев приводит к уменьшению процессов соэкстракции компонентов биологической матрицы [3, 7, 9, 10]. 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 [8].

Очистку извлечений из крови и мочи, содержащих доксиламин, проводили с помощью метода деривативной ТСХ. Метод тонкослойной деривативной (реакционной) хроматографии в общем случае предусматривает получение производного (деривата) исследуемого вещества при помощи какой-либо химической реакции, элюирование его в соответствующей системе растворителей, проявление соответствующим проявителем и установление значения R_f . Такой подход позволяет в ряде случаев улучшить разделение исследуемого вещества с веществами-аналогами,

а также подобрать для него селективный либо даже специфичный проявитель. Кроме того, соотношение значений R_f для исходного вещества и его деривата может быть дополнительным фактором в процессе идентификации вещества [18].

Деривативная ТСХ-очистка извлечений из биологических жидкостей, содержащих доксиламин, заключается в их нанесении на линию старта хроматографической пластины (параллельно на пластину наносят «свидетель»), элюировании хроматографической пластины последовательно с использованием двух подвижных фаз и элюировании доксиламина 0,01 моль/л раствором кислоты хлористоводородной с зоны хроматографической пластины, соответствующей пятну «свидетеля». При этом предусмотрено получение четвертичного N-хлораммониевого основания доксиламина путем обработки исследуемой пробы и пробы «свидетеля» на линии старта хроматографической пластины избытком раствора натрия гипохлорита в растворе натрия гидрокарбоната после элюирования пластины в хлороформе (подвижная фаза 1) (рис. 3.).

В качестве подвижной фазы 2 предложено использовать смесь гексан – диэтиловый эфир (2:1), а проявление пятна «свидетеля» проводить 1 % раствором п-аминодиэтиланилинсульфата.

Экспериментальным путем установлено, что избыток раствора натрия гипохлорита (0,5 г/л активного хлора) в 6 % растворе натрия гидрокарбоната в условиях проведения эксперимента не мешает проведению очистки извлечений из крови и мочи, содержащих доксиламин, и проявлению пятен «свидетеля», поскольку 1 % раствором п-аминодиэтиланилинсульфата он проявляется на пластинах медленно (в течение 10 минут), имеет бледно-фиолетовую окраску (в отличие от ярко-розового для целевого вещества)

и после элюирования его пятна всегда находятся на линии старта хроматографической пластины.

Таким образом, итогом данного этапа работы стала разработка экстракционно-фотометрической, УФ-спектрофотометрической и ВЭЖХ-методик количественного определения доксиламина в крови и моче (см. схему 2).

Валидацию разработанных методик проводили по таким параметрам, как специфичность, степень извлечения, линейность, правильность, сходимост и внутрилабораторная прецизионность в соответствии с предложенными нами подходами в варианте МКГ [5, 6, 11, 15, 16, 19] – рис. 4.

Процедура валидации предусматривает использование нормализованных координат. Для нормализации полученных экспериментальных данных использовали раствор сравнения с концентрацией аналита $C_{reference}^{model}$, соответствующей его концентрации в конечном анализируемом растворе при условии нулевых потерь для точки 100 % в нормализованных координатах. Для нормализации значений откликов модельных образцов отклик раствора сравнения корректируется с учетом степени извлечения \bar{R} , 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 токсическую концентрацию доксиламина в крови [10].

Суммарные результаты валидации приведены в табл. 1–4 и позволяют говорить о приемлемых показателях специфичности, степени извлечения, линейности, правильности, сходимости и внутрилабораторной прецизионности всей серии разработанных методик количественного определения доксиламина в биологических жидкостях.

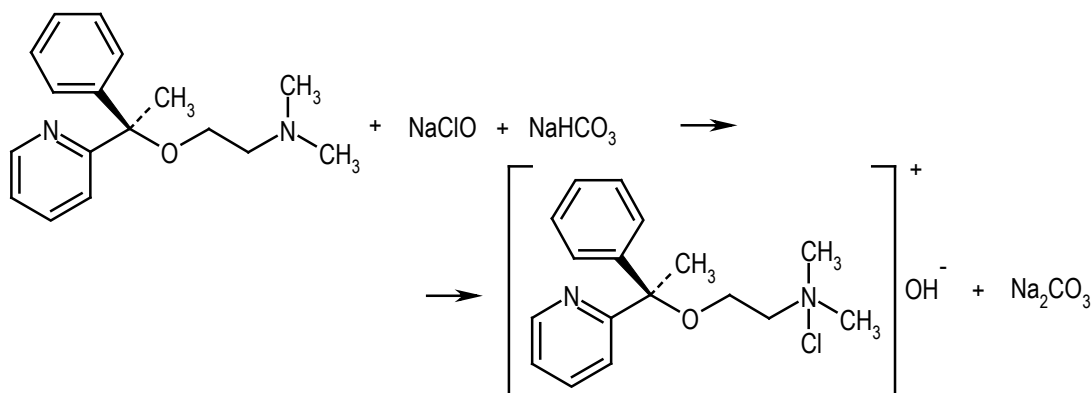


Рис. 3. Получение четвертичного N-хлораммониевого основания доксиламина

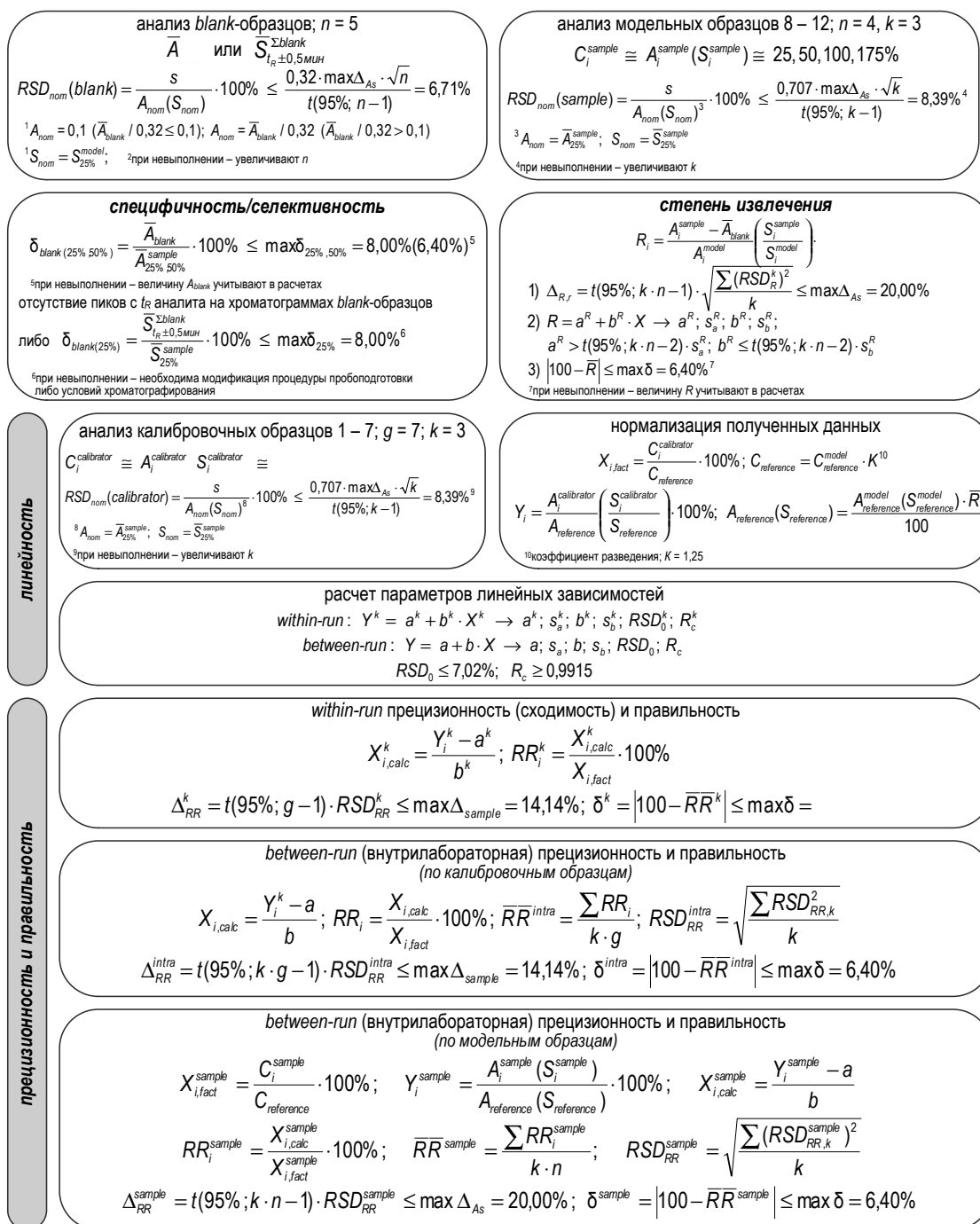


Рис. 4. Этапы валидации методик количественного определения доксиламина в биологических жидкостях

Для оценки возможностей применения предложенного способа деривативной ТСХ-очистки по отношению к биологическим жидкостям, подвергшимся процессам гниения, готовили 4 серии по 6 blank-образцов биологических жидкостей и подвергали их хранению при 25 °C в течение 1, 2, 3 и 4 недель соответственно. В каждой серии 3 blank-

образца затравляли аналитом на уровне 25 % в нормализованных координатах по окончании срока хранения и затем выполняли анализ всей серии в соответствии с разработанными методиками с использованием деривативной ТСХ-очистки и в соответствии с описанными ранее методиками с использованием стандартной ТСХ-очистки.

Таблиця 1

РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧНОСТИ МЕТОДИК
КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДОКСИЛАМИНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

Характеристика	УФ-СФ		ЭФ		Критерий приемлемости
	кровь	моча	кровь	моча	
\bar{A}_{blank}	0,010	0,009	0,006	0,004	–
$RSD_{nom}(blank)$	1,59	1,60	1,37	1,40	$\leq 6,71\%$
$\delta_{blank}(25\%)$	4,44	4,16	4,29	2,56	$\leq 8,00\%$
$\delta_{blank}(50\%)$	2,15	2,09	2,35	1,38	$\leq 6,40\%$

Таблиця 2

РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕПЕНИ ИЗВЛЕЧЕНИЯ МЕТОДИК
КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДОКСИЛАМИНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

Характеристика	УФ-СФ		ЭФ		ВЭЖХ		Критерий приемлемости
	кровь	моча	кровь	моча	кровь	моча	
R	96,54	98,21	95,44	97,72	95,32	96,57	–
$\Delta_{R,r}$	6,87	7,07	6,46	4,76	5,57	5,67	$\leq 20,00\%$
b^R	–0,03	–0,03	–0,01	–0,01	0,01	0,03	$b^R \leq 1,796 \times s_b^R$
s_b^R	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02	0,01	
a^R	98,75	101,01	96,00	98,78	94,46	94,27	$a^R \leq 1,796 \times s_a^R$
s_a^R	1,90	1,74	1,74	1,30	1,58	1,46	
$ 100 - \bar{R} $	3,46	1,79	4,56	2,28	4,68	3,43	$\leq 6,40\%$

Таблиця 3

РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛИНЕЙНОСТИ МЕТОДИК
КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДОКСИЛАМИНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

Параметр день 1		Кровь				Моча				Критерий приемлемости
		день 2	день 3	среднее	день 1	день 2	день 3	среднее		
1		2	3	4	5	6	7	8	9	10
УФ-СФ	<i>b</i>	0,966	0,952	0,962	0,960	0,949	0,947	0,932	0,942	–
	<i>S_b</i>	0,018	0,019	0,022	0,017	0,022	0,021	0,026	0,020	–
	<i>a</i>	1,404	4,334	3,302	3,065	3,164	4,961	4,851	4,382	–
	<i>S_a</i>	1,989	2,071	2,355	1,803	2,436	2,244	2,816	2,201	–
	<i>RSD₀</i>	2,289	2,384	2,711	2,075	2,803	2,583	3,241	2,534	≤ 7,02 %
	<i>R_c</i>	0,9991	0,9990	0,9987	0,9993	0,9986	0,9988	0,9981	0,9989	≥ 0,9915
ЭФ	<i>b</i>	1,022	1,027	1,015	1,021	1,006	0,984	0,991	0,993	–
	<i>S_b</i>	0,029	0,037	0,044	0,035	0,026	0,040	0,024	0,024	–
	<i>a</i>	–0,296	–1,319	0,273	–0,417	–1,155	3,169	0,811	0,986	–
	<i>S_a</i>	3,173	4,040	4,756	3,780	2,824	4,383	2,583	2,617	–
	<i>RSD₀</i>	3,651	4,650	5,473	4,351	3,250	5,045	2,973	3,012	≤ 7,02 %
	<i>R_c</i>	0,9980	0,9968	0,9954	0,9971	0,9983	0,9959	0,9986	0,9985	≥ 0,9915
ВЭРХ	<i>b</i>	0,982	0,983	0,980	0,982	0,991	1,002	1,012	1,002	–
	<i>S_b</i>	0,023	0,019	0,017	0,017	0,025	0,027	0,029	0,026	–
	<i>a</i>	–1,252	0,832	–0,913	–0,444	–2,492	–1,166	–3,580	–2,413	–
	<i>S_a</i>	2,493	2,032	1,875	1,856	2,698	2,978	3,215	2,858	–
	<i>RSD₀</i>	2,869	2,339	2,158	2,136	3,106	3,427	3,700	3,289	≤ 7,02 %
	<i>R_c</i>	0,9986	0,9991	0,9992	0,9992	0,9984	0,9981	0,9979	0,9983	≥ 0,9915

Таблиця 4

РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРАВИЛЬНОСТИ И ПРЕЦИЗИОННОСТИ МЕТОДИК
КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДОКСИЛАМИНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

Параметр день 1		Кровь			Моча			Критерій прийнятності
		день 2	день 3	день 1	день 2	день 3		
1		2	3	4	5	6	7	8
УФ-СФ	\overline{RR}^k	99,46	99,10	100,06	99,98	99,62	99,31	–
	Δ^k	0,54	0,90	0,06	0,02	0,38	0,69	$\leq 6,40 \%$
	RSD^k_{RR}	2,87	4,34	3,46	3,18	2,96	4,10	–
	Δ^k_{RR}	5,58	8,43	6,72	6,18	5,75	7,97	$\leq 14,14 \%$
	\overline{RR}^{intra}	99,47			99,60			–
	Δ^{intra}	0,53			0,40			$\leq 6,40 \%$
	RSD^{intra}_{RR}	3,83			3,30			–
	Δ^{intra}_{RR}	6,61			5,69			$\leq 14,14 \%$
	\overline{RR}^{sample}	98,51			97,68			–
	Δ^{sample}	1,49			2,32			$\leq 6,40 \%$
	RSD^{sample}_{RR}	5,15			5,83			–
	Δ^{sample}_{RR}	9,25			10,47			$\leq 20,00 \%$
ЭФ	\overline{RR}^k	100,08	99,68	100,19	100,12	99,80	100,81	–
	Δ^k	0,08	0,32	0,19	0,12	0,20	0,81	$\leq 6,40 \%$
	RSD^k_{RR}	3,65	5,01	7,30	2,55	6,00	6,41	–
	Δ^k_{RR}	7,09	9,74	14,19	4,96	11,66	12,46	$\leq 14,14 \%$
	\overline{RR}^{intra}	99,97			100,20			–
	Δ^{intra}	0,03			0,20			$\leq 6,40 \%$
	RSD^{intra}_{RR}	5,73			5,50			–
	Δ^{intra}_{RR}	9,88			9,49			$\leq 14,14 \%$
	\overline{RR}^{sample}	101,69			101,93			–
	Δ^{sample}	1,69			1,93			$\leq 6,40 \%$
	RSD^{sample}_{RR}	5,98			3,80			–
	Δ^{sample}_{RR}	10,74			6,82			$\leq 20,00 \%$
БЕРХ	\overline{RR}^k	100,55	100,56	100,54	100,69	100,96	100,95	–
	Δ^k	0,55	0,56	0,54	0,69	0,96	0,95	$\leq 6,40 \%$
	RSD^k_{RR}	3,13	2,81	2,67	3,51	4,64	4,53	–
	Δ^k_{RR}	6,08	5,46	5,19	6,82	9,02	8,80	$\leq 14,14 \%$
	\overline{RR}^{intra}	100,55			100,87			–
	Δ^{intra}	0,55			0,87			$\leq 6,40 \%$
	RSD^{intra}_{RR}	3,08			4,44			–
	Δ^{intra}_{RR}	5,31			7,65			$\leq 14,14 \%$
	\overline{RR}^{sample}	104,23			106,25			–
	Δ^{sample}	4,23			6,25			$\leq 6,40 \%$
	RSD^{sample}_{RR}	3,84			4,80			–
	Δ^{sample}_{RR}	6,90			8,63			$\leq 20,00 \%$

Результаты определения специфичности разработанных методик количественного определения доксиламина в биологических жидкостях применительно к анализу биологических объектов, подвергшихся процессам гниения, приведены в табл. 5.

Таким образом, в случае анализа свежих биологических жидкостей с помощью разработанных методик количественного анализа с использованием деривативной ТСХ-очистки отсутствуют преимущества в отношении специфичности методик по отношению к компонентам матрицы. В то же время, в случае анализа биологических жидкостей, подвергшихся гниению, использование стандартной ТСХ-очистки не позволяет выполнить требования к специфичности методики; деривативная ТСХ-очистка позволяет достичь поглощения blank-пробы, вклад которого в поглощение основного опыта является незначимым.

**ВЫВОДЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ
ДАЛЬНЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

1. Разработан способ деривативной ТСХ-очистки извлечений из крови и мочи, содер-

жащих доксиламин, который позволил увеличить степень элюирования доксиламина с хроматографической пластины и уменьшить количество соэкстрактивных веществ в полученных элюатах.

2. Разработана серия методик количественного определения доксиламина в биологических жидкостях с использованием деривативной ТСХ-очистки на базе предложенных ранее экстракционно-фотометрической, УФ-спектрофотометрической и ВЭЖХ-методик.

3. Подтверждены возможности применения предложенного способа деривативной ТСХ-очистки по отношению к биологическим жидкостям, подвергшимся процессам гниения.

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ
ИСТОЧНИКОВ ИНФОРМАЦИИ**

1. Болотов В. В. Вивчення методів ізолювання донормілу з об'єктів біологічного походження / В. В. Болотов, І. М. Іванчук, Л. Ю. Клименко // Вісн. фармації. – 2008. – №3 (55). – С. 20–22.
2. Валидация УФ-спектрофотометрической методики количественного определения докси-

Таблица 5

**РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧНОСТИ
МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДОКСИЛАМИНА
В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ, ПОДВЕРГШИХСЯ ГНИЕНИЮ**

Характеристика	УФ-СФ				ЭФ				Критерий приемлемости
	деривативная ТСХ-очистка		стандартная ТСХ-очистка		деривативная ТСХ-очистка		стандартная ТСХ-очистка		
	кровь	моча	кровь	моча	кровь	моча	кровь	моча	
1 неделя									
\bar{A}_{blank}	0,011	0,008	0,015	0,016	0,005	0,004	0,014	0,014	–
$RSD_{nom}(blank)$	1,68	1,45	10,25	8,68	1,02	1,09	6,98	7,54	≤ 6,71 %
$\delta_{blank}(50\%)$	4,98	3,67	6,67	7,08	2,33	1,87	6,25	6,25	≤ 8,00 %
2 недели									
\bar{A}_{blank}	0,012	0,011	0,023	0,019	0,004	0,005	0,019	0,018	–
$RSD_{nom}(blank)$	2,13	1,89	24,14	18,54	1,15	1,45	16,58	14,52	≤ 6,71 %
$\delta_{blank}(50\%)$	5,41	4,98	9,87	8,30	1,87	2,33	8,30	7,89	≤ 8,00 %
3 недели									
\bar{A}_{blank}	0,011	0,012	0,058	0,041	0,005	0,005	0,035	0,036	–
$RSD_{nom}(blank)$	2,01	1,97	26,25	24,89	1,02	0,68	18,94	15,48	≤ 6,71 %
$\delta_{blank}(50\%)$	4,98	5,41	21,64	16,33	2,33	2,33	14,29	14,63	≤ 8,00 %
4 недели									
\bar{A}_{blank}	0,015	0,011	0,141	0,087	0,004	0,005	0,041	0,035	–
$RSD_{nom}(blank)$	1,87	1,52	32,15	26,58	0,98	1,56	15,17	25,45	≤ 6,71 %
$\delta_{blank}(50\%)$	6,67	4,98	40,17	29,29	1,87	2,33	16,33	14,29	≤ 8,00 %

- ламина в крови: прецизионность / Л. Ю. Клименко, С. Н. Трут, Т. А. Костина, И. М. Иванчук // Вестн. КазНМУ. – 2014. – № 4. – С. 301–308.
3. Герасимов, Д. А. Химико-токсикологическое исследование нимесулида и близких по структуре соединений: дис. канд. фарм. наук / Д. А. Герасимов. – Курск, 2014. – 326 с.
 4. Клименко Л. Ю. Разработка и валидация методик экстракционно-фотометрического определения доксиламина в моче / Л. Ю. Клименко, С. Н. Трут, И. М. Иванчук // Управління економіка та забезпечення якості в фармації. – 2015. – №1 (39). – С. 26–33.
 5. 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 (147). – С. 53 – 56.
 6. 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 фармації і медичної науки та практики. – 2014. – №2 (15). – С. 15–22.
 7. 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.
 8. Смотров М. П. Топологическая трансформация фазовых диаграмм тройных систем соль-бинарный растворитель с всаливанием-высаливанием / М. П. Смотров. – Саратов, 2012. – 281 с.
 9. Clarke's Analytical Forensic Toxicology / ed. by S. Jickells, A. Negrusz. – London: Chicago: Pharmaceutical Press, 2008. – 648 p.
 10. Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material / edited by A. C. Moffat, M. D. Osselton, B. Widdop. – 4th ed. – London : Pharmaceutical Press, 2011. – 2609 p.
 11. Determining accuracy in validation of UV-spectrophotometric methods of quantitative measurement in forensic toxicological analysis / L. Yu. Klimenko, S. M. Trut, G. P. Petyunin, T. A. Kostina // Український біофармацевтичний журн. – 2014. – № 2 (31). – С. 55–67.
 12. Development and validation of the HPLC-procedures of doxylamine determination in blood in the variant of the method of standard / L. Yu. Klimenko, S. M. Trut, V. P. Moroz, O. O. Erlich // Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. – 2015. – Vol. 7 (1). – P. 527–534.
 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. Validation of UV-spectrophotometric method of doxylamine quantitative determination in blood: linearity / L. Yu. Klimenko, S. M. Trut, E. Yu. Akhmedov // Фармац. часоп. – 2014. – №3 (31). – С. 56 – 60.
 15. Klimenko, L. Yu. Development of approaches to validation of UV-spectrophotometric methods of quantitative determination in forensic and toxicological analysis: linearity and application range / L. Yu. Klimenko, G. P. Petyunin // Фармац. часоп. – 2014. – №2 (30). – С. 46–51.
 16. 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 // Фармация Казахстана. – 2014. – №3 (154). – С. 44 – 48.
 17. Postmortem Toxicology of Abused Drugs / ed. by S. B. Karch. – CRC Press: Taylor & Francis Group, 2008. – 214 p.
 18. Thin-layer chromatography / H. Jork, W. Funk, W. Fischer, H. Wimmer. – Weinheim, 1990. – 496 p.
 19. Validation of UV-spectrophotometric methods of quantitative determination in forensic and toxicological analysis: recovery / L. Yu. Klimenko, S. N. Trut, G. P. Petyunin, I. M. Ivanchuk // Фармация Казахстана. – 2013. – №12 (151). – С. 42 – 48.

УДК 615.214.24:543.544.5:543.544.054.9:543.422.3/7:543.054**С. М. Трут, Л. Ю. Клименко, О. Є. Микитенко, Ю. О. Мирошніченко****ЗАСТОСУВАННЯ ДЕРИВАТИВНОЇ ТШХ-ОЧИСТКИ ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО
ВИЗНАЧЕННЯ ДОКСИЛАМІНУ У БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ**

Розроблено спосіб деривативної ТШХ-очистки витягів з крові та сечі, які містять доксиламін, що дозволило збільшити ступінь елюювання доксиламіну та зменшити кількість співекстрактивних речовин в отриманих елюатах. Розроблено набір методик визначення доксиламіну в біологічних рідинах з використанням деривативної ТШХ-очистки і проведено їх валідацію у варіанті методу калібрувального графіку. Показано можливості застосування запропонованого способу деривативної ТШХ-очистки по відношенню до біологічних рідин, що піддано процесам гниття.

Ключові слова: валідація, біоаналітичні методики, доксиламін, метод калібрувального графіка, деривативна тонкошарова хроматографія

UDC 615.214.24:543.544.5:543.544.054.9:543.422.3/7:543.054**S. M. Trut, L. Yu. Klimenko, O. Ye. Mykytenko, Yu. O. Miroshnichenko****APPLICATION OF DERIVATIVE TLC-PURIFICATION FOR QUANTITATIVE
DETERMINATION OF DOXYLAMINE IN BIOLOGICAL FLUIDS**

The method of derivative TLC-purification of extracts from blood and urine containing doxylamine has been developed that allowed to increase the elution degree of doxylamine and decrease the amount of co-extractive substances in the obtained eluates. The set of methods of doxylamine determination in biological fluids using derivative TLC-purification has been developed and their validation has been carried out in the variant of the method of calibration curve. The possibilities of application of the offered method of derivative TLC-purification have been demonstrated in relation to the biological fluids exposed to processes of putrefaction.

Key words: validation, bioanalytical methods, doxylamine, method of calibration curve, derivative TLC

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:

10.11.2015 р.