

Л. Ю. Клименко, С. М. Трут, Т. А. Костіна, С. М. Полуян

Національний фармацевтичний університет

61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53. E-mail: lina_klimenko@nuph.edu.ua

Розробка та валідація ГРХ/МС-методики кількісного визначення доксиламіну

Доксиламін – снодійний лікарський засіб, що застосовується для лікування легких незначних розладів сну та є частою причиною отруєнь.

Мета. Розробити ГРХ/МС-методику кількісного визначення доксиламіну та провести поетапну валідацію розробленої методики у варіантах методу калібрувального графіка, методу стандарту та методу добавок.

Результати. Для визначення доксиламіну методом ГРХ з використанням мас-спектрометричного детектування були підібрані хроматографічні умови з програмованою зміною температури від 70 °С до 320 °С в процесі аналізу. Час утримування для доксиламіну становить 14,53 хв. Для доведення можливості застосування запропонованих методик у подальшому аналізі було проведено їх валідацію у варіантах методу калібрувального графіка, методу стандарту та методу добавок. Такі валідаційні параметри, як стабільність, лінійність, правильність, прецизійність і межа кількісного визначення було оцінено за допомогою модельних розчинів.

Експериментальна частина. Умови хроматографування: Agilent 6890N/5973N/7683; HP-5MS Ø0,25 мм × 30 м, 0,25 мкм; DB-17MS Ø0,25 мм × 30 м, 0,15 мкм; колонки підключено послідовно через перемикач Діна; термостат – 70 °С (2 хв), 45 °С/хв до 210 °С, 6 °С/хв до 320 °С (12,56 хв); інтерфейс мас-спектрометра – 280 °С; джерело іонів – 230 °С; квадруполь – 150 °С; електронний удар, 70 еВ; 40 – 750 m/z; інжектор – 250 °С; без розділення потоку; тиск газу-носія (гелію) на вході: 1-а колонка – 26,06 psi, 2-а колонка – 19,30 psi.

Висновки. Розроблено нову методику кількісного визначення доксиламіну методом ГРХ/МС. Проведено її валідацію і показано прийнятність для застосування.

Ключові слова: доксиламін; газорідинна хроматографія; валідація

L. Yu. Klimenko, S. M. Trut, T. A. Kostina, S. M. Poluyan

National University of Pharmacy

Development and validation of GLC/MS-procedure of doxylamine quantitative determination

Doxylamine is a hypnotic medicine used for treatment of minor sleep disorders and is a frequent cause of poisoning.

Aim. To develop GLC/MS-procedure of doxylamine quantification and carry out step-by-step validation of the developed procedure in the variants of the method of calibration curve, method of standard and method of additions.

Results. The chromatographic conditions have been chosen for doxylamine determination by the method of GLC with mass-spectrometry detection with temperature program changing during the analysis from 70 °С to 320 °С. Retention time for doxylamine is 14.53 min. To prove the possibility of the proposed procedure application in further analysis its validation has been carried out in the variants of the method of calibration curve, method of standard and method of additions. Such validation parameters as in process stability, linearity, accuracy, precision and limit of determination have been estimated by model solutions.

Experimental part. Conditions of chromatographic analysis: Agilent 6890N/5973N/7683; HP-5MS Ø0.25 mm × 30 m, 0.25 μm; DB-17MS Ø0.25 mm × 30 m, 0.15 μm; columns are connected sequentially through Deans switch; thermostat – 70 °С (2 min), 45 °С/min to 210 °С, 6 °С/min to 320 °С (12.56 min); transfer line – 280 °С; ion source – 230 °С; quadrupole – 150 °С; electron impact, 70eV; 40 – 750 m/z; injector – 250 °С; splitless mode; inlet carrier gas (helium) pressure: 1st column – 26.06 psi, 2nd column – 19.30 psi.

Conclusions. New procedure of doxylamine quantitative determination by the method of GLC/MS has been developed. Its validation has been carried out and acceptability for application has been shown.

Key words: doxylamine; gas-liquid chromatography; validation

Л. Ю. Клименко, С. М. Трут, Т. А. Костіна, С. М. Полуян

Національний фармацевтичний університет

Разработка и валидация ГЖХ/МС-методики количественного определения доксиламина

Доксиламин – снотворный препарат, который применяется для лечения легких незначительных расстройств сна и является частой причиной отравлений.

Цель. Разработать ГЖХ/МС-методику количественного определения доксиламина и провести поэтапную валидацию разработанной методики в вариантах метода калибровочного графика, метода стандарта и метода добавок.

Результаты. Для определения доксиламина методом ГЖХ с использованием масс-спектрометрической детекции были подобраны хроматографические условия с программируемым изменением температуры от 70 °С до 320 °С в процессе анализа. Время удерживания для секнидазола составляет 14,53 мин. Для доказательства возможности применения предлагаемых методик в дальнейшем анализе была проведена их валидация в вариантах метода калибровочного графика, метода стандарта и метода добавок. Такие валидационные параметры, как стабильность, линейность, правильность, прецизионность и предел количественного определения были оценены с помощью модельных растворов.

Експериментальна частина. Умовля хроматографування: Agilent 6890N/5973N/7683; HP-5MS \varnothing 0,25 мм \times 30 м, 0,25 мкм; DB-17MS \varnothing 0,25 мм \times 30 м, 0,15 мкм; колонки підключені послідовально через переключач Дина; термостат – 70 °С (2 мин), 45 °С/мин. до 210 °С, 6 °С/мин до 320 °С (12,56 мин); інтерфейс мас-спектрометра – 280 °С; джерело іонів – 230 °С; квадруполь – 150 °С; електронний удар, 70 eV; 40 – 750 m/z; інжектор – 250 °С; без розділення потоку; тиск газу-носія (гелія) на вході: 1-я колонка – 26,06 psi, 2-я колонка – 19,30 psi.

Висновки. Розроблена нова методика кількісного визначення доксиламіну методом ГЖХ/МС. Проведена її валідація і показана прийнятність для застосування.

Ключові слова: доксиламін; газожидкостна хроматографія; валідація

Доксиламін (N,N-диметил-2-[1-феніл-1-(2-піридиніл)-етокси]етанамін) – рис. 1 – снодійний лікарський засіб [1]; в Україні застосовується для лікування легких незначних розладів сну і, що важливо, відпускається з аптек без рецепта.

За останні кілька років кількість випадків отруєнь доксиламіном стала значною. Зареєстровані як випадкові летальні випадки в результаті передозування, так і випадки самогубств. Дуже багато фіксується полівалентних отруєнь доксиламіном при його комплексному застосуванні з препаратами групи бензодіазепінів, з димедролом, барбітуратами тощо. Нерідкі випадки зловживань доксиламіном, особливо його прийомом спільно з алкогольними напоями [1-4].

Газорідина хроматографія (ГРХ) з різними типами детектування широко використовується в процесі судово-токсикологічних досліджень для скринінгових та підтверджуючих досліджень з метою виявлення, ідентифікації та визначення аналітів [1, 5], зокрема і в аналізі доксиламіну [6-9].

Метою нашої роботи є розробка ГРХ/МС-методики кількісного визначення доксиламіну та здійснення поетапної валідації розроблених методик у варіантах застосування методу калібрального графіка (МКГ), методу стандарту (МС) та методу добавок (МД) [10-16] для підтвердження їх прийнятності для подальшого застосування в аналітичній токсикології.

Експериментальна частина

В експерименті використовували доксиламіну сукцинат фармакопейної чистоти, всі інші реактиви – кваліфікації «х.ч.» або «ч.д.а.».

Взяття наважок проводили з використанням цифрових аналітичних ваг AN100 (AXIS, Україна) з $d = 0,0001$ г.

Мірний посуд відповідав вимогам ISO 648:2008 «Laboratory glassware – Single-volume pipettes», ISO 1042:1998 «Laboratory glassware – One-mark volumetric flasks», ISO 4788:2005 «Laboratory glassware – Graduated measuring cylinders», ISO 385:2005 «Laboratory glassware – Burettes»; його було відкалібровано відповідно до ISO 4787:2010 «Laboratory glassware – Volumetric instruments – Methods for testing of capacity and for use».

Порядок приготування модельних розчинів, розчину порівняння та розчину добавки доксила-

міну сукцинату для розробки та валідації ГРХ/МС-методики кількісного визначення наведено на схемах 1 і 2.

Стандартні розчини 1 і 2: 125,0 мг доксиламіну сукцинату вносили до мірної колби місткістю 500,0 мл, розчиняли в невеликій кількості 0,01 моль/л розчину хлоридної кислоти і доводили об'єм розчину тим самим розчинником до позначки; розчин перемішували (концентрація – 250 мкг/мл).

Розчин порівняння: в мірну колбу місткістю 50,0 мл вносили піпеткою 4,00 мл відповідного стандартного розчину 1 і доводили об'єм розчину 0,01 моль/л розчином хлоридної кислоти до позначки; розчин перемішували (концентрація – 20 мкг/мл).

Модельні розчини 1 – 7: в ряд мірних колб місткістю 50,0 мл вносили піпеткою 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00 і 7,00 мл відповідного стандартного розчину 2 і доводили об'єми розчинів 0,01 моль/л розчином хлоридної кислоти до позначки; розчини перемішували (концентрація – 5, 10, 15, 20, 25, 30 і 35 мкг/мл відповідно).

Стандартний розчин 3: 125,0 мг доксиламіну сукцинату вносили до мірної колби місткістю 500,0 мл, розчиняли в невеликій кількості 0,01 моль/л розчину хлоридної кислоти і доводили об'єм розчину тим самим розчинником до позначки; розчин перемішували (концентрація – 250 мкг/мл).

Добавка 1: 75,0 мг доксиламіну сукцинату вносили до мірної колби місткістю 100,0 мл, розчиняли в невеликій кількості 0,01 моль/л розчину хлоридної кислоти і доводили об'єм розчину тим самим розчинником до позначки; розчин перемішували (концентрація – 750 мкг/мл).

Модельні розчини 8 – 13: в ряд мірних колб місткістю 50,0 мл вносили піпеткою 5,00; 5,00; 10,00;

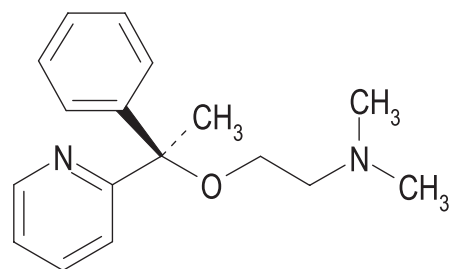


Рис. 1. Хімічна структура доксиламіну

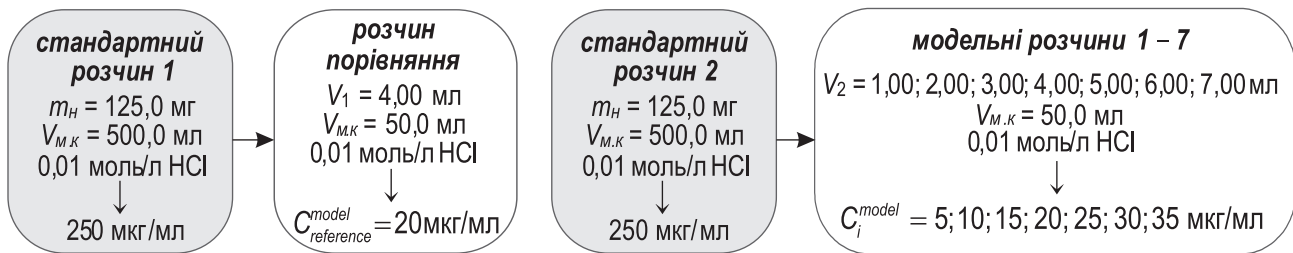


Схема 1. Процедура приготування модельних розчинів і розчину порівняння для розробки та валідації ГРХ/МС-методики кількісного визначення доксиламіну у варіантах МКГ та МС

15,00; 20,00 і 20,00 мл відповідного стандартного розчину 3 і доводили об'єми розчинів 0,01 моль/л розчином хлоридної кислоти до позначки; розчини перемішували (концентрація – 25, 25, 50, 75, 100 і 100 мкг/мл відповідно).

Моделні розчини 8.1 – 13.1: в ряд мірних колб місткістю 50,0 мл вносили піпеткою по 10,00 мл відповідних модельних розчинів 8 – 13 і доводили об'єми розчинів відповідним розчинником до позначки; розчини перемішували (концентрація – 5, 5, 10, 15, 20 і 20 мкг/мл відповідно).

Моделні розчини 8.2 – 13.2: в ряд мірних колб місткістю 50,0 мл вносили піпеткою по 10,00 мл відповідних модельних розчинів 8 – 13, додавали піпеткою по 1,00 мл добавки 1 і доводили об'єми розчинів відповідним розчинником до позначки; розчини перемішували (концентрація – 20, 20, 25, 30, 35 і 35 мкг/мл відповідно).

Умови хроматографування:

- прилад – Agilent 6890N Gas Chromatograph;
- колонка – 1) HP-5MS $\varnothing 0,25$ мм \times 30 м, 0,25 мкм, 5 % дифенілполісилоксан / 95 % диметилполісилоксан; 2) DB-17MS $\varnothing 0,25$ мм \times 30 м, 0,15 мкм, 50 % дифенілполісилоксан / 50 % диметилполісилоксан; колонки підключені послідовно через перемикач Діна;
- температура термостату колонки – 70 °C (2 хв), підвищення температури зі швидкістю 45 °C/хв до 210 °C, підвищення температури зі швидкістю 6 °C/хв до 320 °C (витримують 12,56 хв);

- інжектор – Agilent 7683 Injector/Autosampler;
- температура інжектора – 250 °C;
- детектор – мас-спектрометр Agilent 5973N MSD с турбонасосом;
- режим іонізації – електронний удар, енергія електрона – 70 eV;
- діапазон сканування – 40-750 m/z; поріг – 110;
- температура інтерфейсу мас-спектрометра – 280 °C;
- температура джерела іонів – 230 °C;
- температура квадруполя – 150 °C;
- газ-носіє – гелій;
- тиск газу-носія на вході – 1-а колонка – 26,06 psi, 2-а колонка – 19,30 psi;
- режим без розділення потоку;
- об'єм проби – 1 мкл.

Хроматографування кожного розчину (за виключенням перевірки стабільності) проводили 3 рази і використовували для розрахунків середні значення.

Результати та їх обговорення

Для визначення доксиламіну методом газорідинної хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням було використано режим з програмованою зміною температури від 70 °C до 320 °C в процесі аналізу, що не вимагає проведення дериватизації аналізованої речовини.

Типову хроматограму доксиламіну за зазначених умов наведено на рис. 2. Мас-спектр доксил-

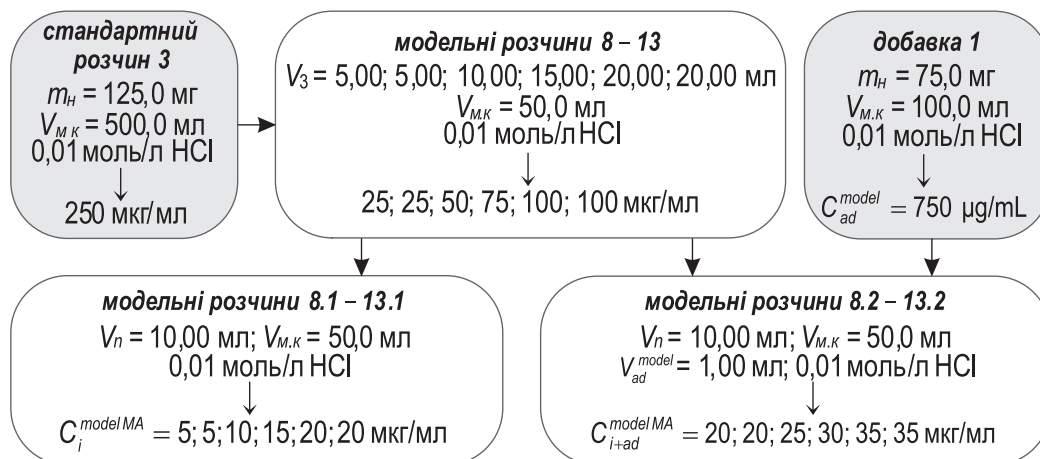


Схема 2. Процедура приготування модельних розчинів і розчину добавки для розробки та валідації ГРХ/МС-методики кількісного визначення доксиламіну у варіанті МД

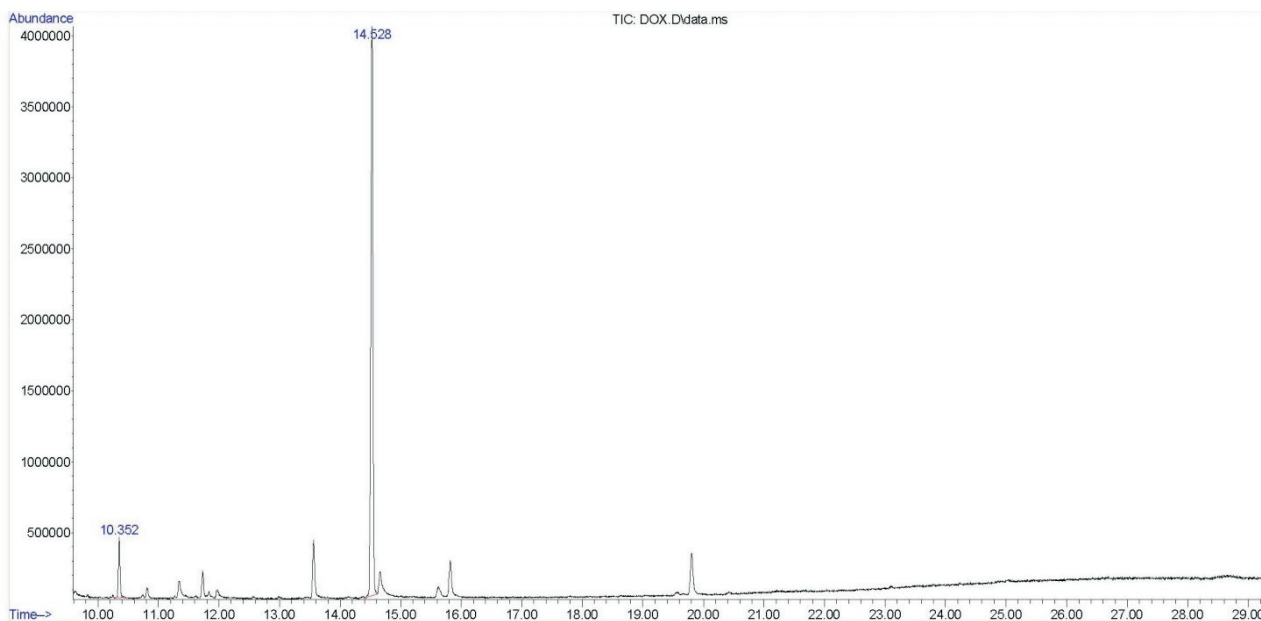


Рис. 2. Типова ГРХ/МС-хроматограма доксиламіну за підібраних умов

аміну за умов хроматографування наведено на рис. 3.

Час утримування доксиламіну за підібраних умов становить 14,53 хв.

Розробку методик кількісного визначення проводили паралельно з їх валідацією одночасно в трьох варіантах – МКГ, МС та МД [10-16] за такими валідаційними параметрами: стабільність,

діапазон застосування, лінійність/калібрувальна модель, правильність, прецизійність, межа кількісного визначення (схеми 3-4).

Валідацію виконували з використанням модельних розчинів для оцінки придатності аналітичних процедур до подальшого застосування в різних сферах аналізу, зокрема, в аналітичній токсикології [16].

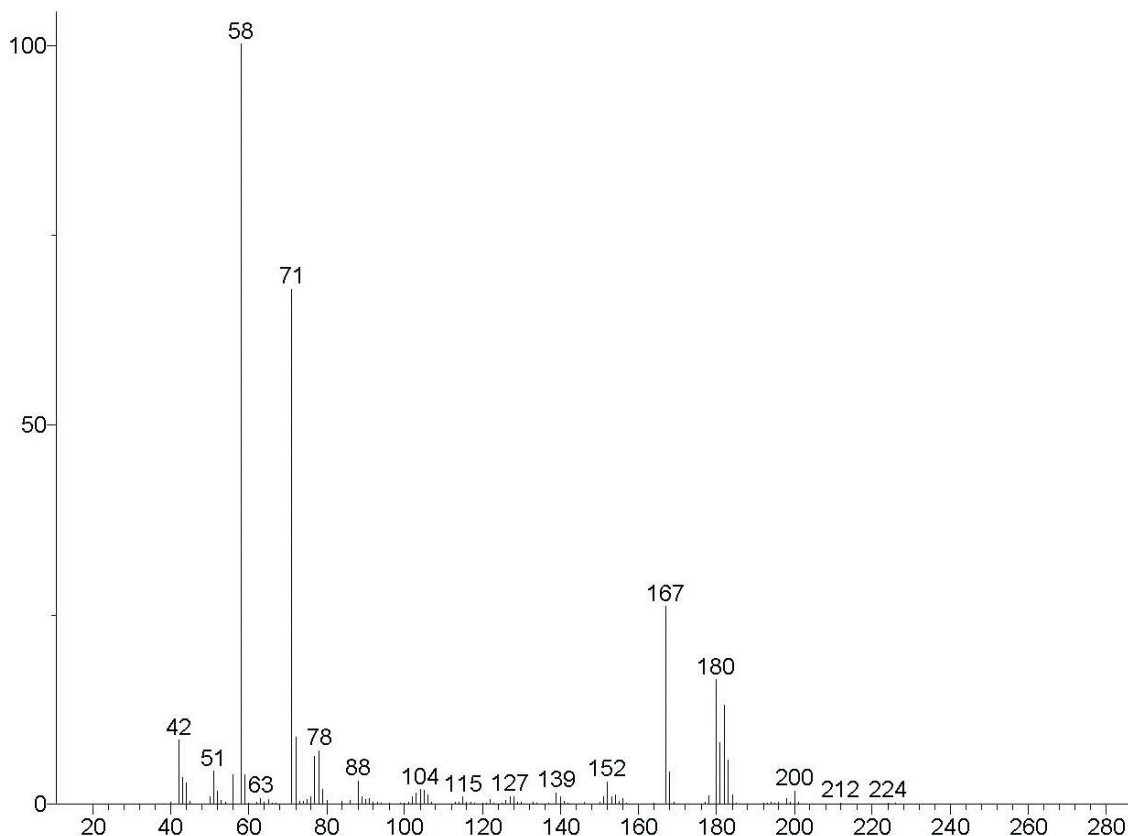


Рис. 3. Мас-спектр доксиламіну за умов ГРХ/МС-хроматографування

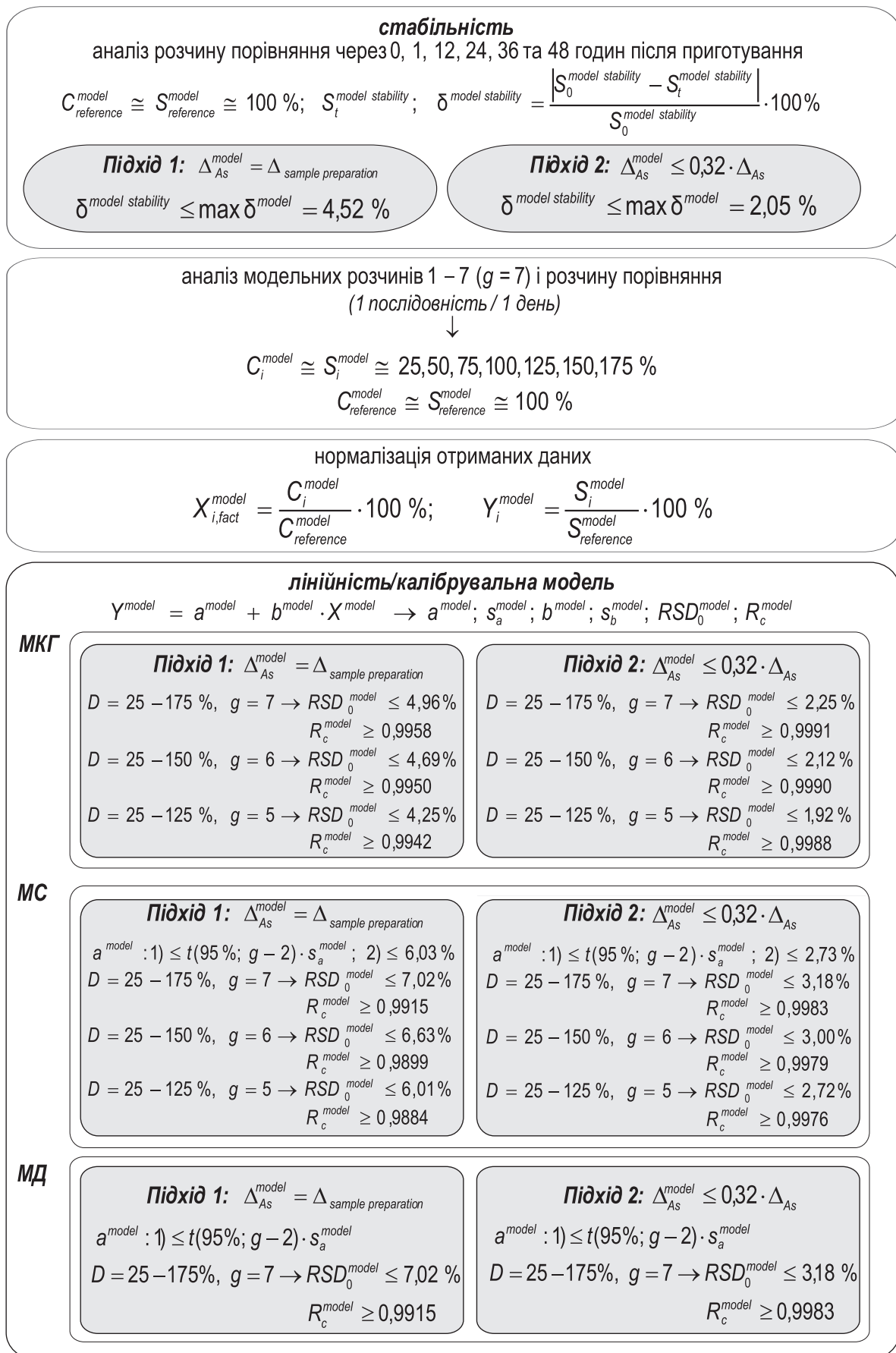


Схема 3. Процедура підтвердження стабільності та перевірки лінійності ГРХ/МС-методики кількісного визначення доксиламіну

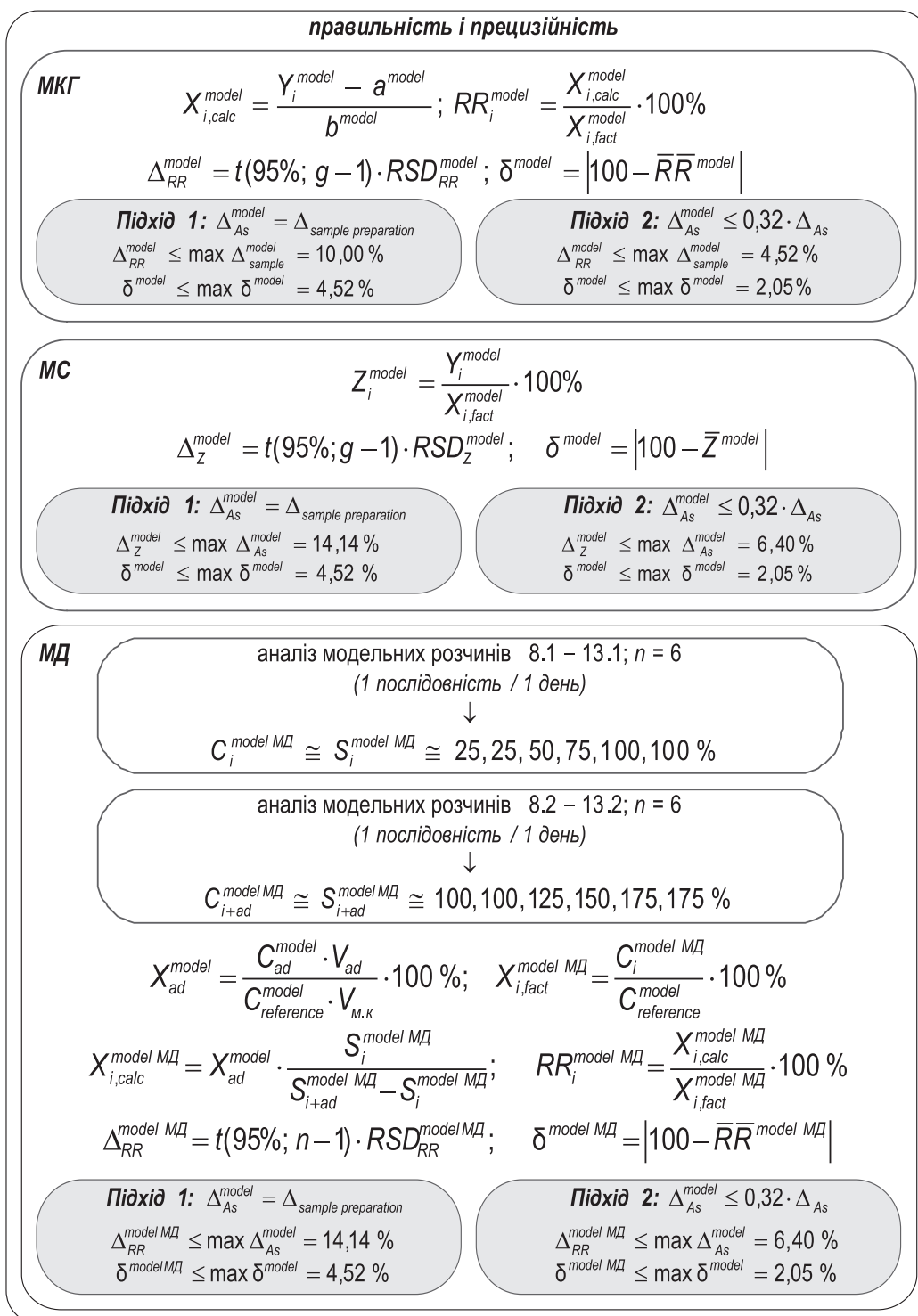


Схема 4. Процедура підтвердження правильності та прецизійності ГРХ/МС-методику кількісного визначення доксиламіну

Валідація методики передбачає застосування нормалізованих координат

$$X_i = \frac{C_i}{C_{st}} \cdot 100\%; Y_i = \frac{A_i}{A_{st}} \cdot 100\%, \quad (1)$$

тобто перехід від рівняння виду $S_i = b_1 \cdot C_i + a_1$ до рівняння виду $Y_i = b_2 \cdot X_i + a_2$.

Концентрацію доксиламіну сукцинату в модельному розчині, що відповідає точці 100 % в

нормалізованих координатах, обирали згідно з рекомендаціями [16] як таку, що забезпечує співвідношення «сигнал/шум» не менше 40.

Для нормалізації отриманих експериментальних даних використовували розчин порівняння з концентрацією аналіту $C_{reference}^{model} = C_{100\%}^{model}$.

Аналітичний діапазон застосування методики $D = 25-125\%$, $25-150\%$ або $25-175\%$ (для МД – лише $25-175\%$) [16]; кількість концентрацій-

Таблиця 1

Результати перевірки стабільності доксиламіну сукцинату в модельних розчинах

Параметр		Величини					
		0 год	1 год	12 год	24 год	36 год	48 год
$S^{model\ stability}$		394205	395602	395812	394712	395045	395016
$S_0^{model\ stability} - S_t^{model\ stability}$		–	1397	1607	507	840	811
$\delta^{model\ stability}, \% \leq \max \delta^{model}$		–	0,35	0,41	0,13	0,21	0,21
Підхід 1	$\leq 4,52\%$ [16]	–	відп.	відп.	відп.	відп.	відп.
Підхід 2	$\leq 2,05\%$ [16]	–	відп.	відп.	відп.	відп.	відп.

них рівнів $g = 5, 6$ або 7 (в залежності від обраного діапазону застосування, для МД – лише 7) з постійним кроком 25% [16].

Критерії прийнятності валідаційних параметрів сформовані на підставі систематичного застосування принципу незначущості [17] і виходячи з величини максимально допустимої невизначеності методики в аналітичній токсикології, яка становить 20% [1].

При застосуванні МКГ критерії прийнятності лінійної залежності і прецизійності встановлювали, виходячи з положення про рівність невизначеності побудови калібрувального графі-

ка Δ_{cal} і невизначеності аналізу досліджуваного зразка Δ_{sample} [16].

Критерії прийнятності розраховували в межах двох підходів [16]:

Підхід 1: невизначеність процедури пробопідготовки дорівнює невизначеності кількісного визначення аналіту в модельних розчинах Δ_{As}^{model} .

Підхід 2: невизначеність кількісного визначення аналіту в модельних розчинах Δ_{As}^{model} незначуща в порівнянні з повною невизначеністю результатів аналізу Δ_{As} .

Комплексні результати валідації ГРХ/МС-методики у варіантах МКГ, МС та МД наведені в табл. 1-5.

Таблиця 2

Результати перевірки лінійності ГРХ/МС-методики кількісного визначення доксиламіну

Параметр	Значення	Критерії прийнятності [16]					
		МКГ		МС		МД	
		підхід 1	підхід 2	підхід 1	підхід 2	підхід 1	підхід 2
1	2	3	4	5	6	7	8
$D = 25-175\%$ ($g = 7$)							
b^{model}	0,994	–	–	–	–	–	–
s_b^{model}	0,020	–	–	–	–	–	–
a^{model}	2,039	–	–	$\leq 6,03\%$	$\leq 2,73\%$	–	–
				відп.	відп.	–	–
s_a^{model}	2,272	–	–	$a^{model} \leq 2,015 \cdot s_a^{model}$		$a^{model} \leq 2,015 \cdot s_a^{model}$	
				відп.		відп.	
RSD_0^{model}	2,688	$\leq 4,96\%$	$\leq 2,25\%$	$\leq 7,02\%$	$\leq 3,18\%$	$\leq 7,02\%$	$\leq 3,18\%$
		відп.	не відп.	відп.	відп.	відп.	відп.
R_c^{model}	0,9990	$\geq 0,9958$	$\geq 0,9991$	$\geq 0,9915$	$\geq 0,9983$	$\geq 0,9915$	$\geq 0,9983$
		відп.	не відп.	відп.	відп.	відп.	відп.
$D = 25-150\%$ ($g = 6$)							
b^{model}	1,017	–	–	–	–	–	–
s_b^{model}	0,021	–	–	–	–	–	–
a^{model}	0,465	–	–	$\leq 6,03\%$	$\leq 2,73\%$	–	–
				відп.	відп.	–	–

Продовження табл. 2

1	2	3	4	5	6	7	8
S_a^{model}	2,075	–	–	$a^{model} \leq 2,132 \cdot S_a^{model}$		–	–
				відп.			
RSD_0^{model}	2,229	$\leq 4,69\%$	$\leq 2,12\%$	$\leq 6,63\%$	$\leq 3,00\%$	–	–
		відп.	не відп.	відп.	відп.		
R_c^{model}	0,9991	$\geq 0,9950$	$\geq 0,9990$	$\geq 0,9899$	$\geq 0,9979$	–	–
		відп.	відп.	відп.	відп.		
$D = 25-125\% (g = 5)$							
b^{model}	0,990	–	–	–	–	–	–
S_b^{model}	0,021	–	–	–	–	–	–
a^{model}	2,086	–	–	$\leq 6,03\%$	$\leq 2,73\%$	–	–
				відп.	відп.		
S_a^{model}	1,778	–	–	$a^{model} \leq 2,353 \cdot S_a^{model}$		–	–
				відп.			
RSD_0^{model}	1,695	$\leq 4,25\%$	$\leq 1,92\%$	$\leq 6,01\%$	$\leq 2,72\%$	–	–
		відп.	відп.	відп.	відп.		
R_c^{model}	0,9993	$\geq 0,9942$	$\geq 0,9988$	$\geq 0,9884$	$\geq 0,9976$	–	–
		відп.	відп.	відп.	відп.		

Таблиця 3

Результати перевірки правильності та прецизійності у варіанті
МКГ ГРХ/МС-методики кількісного визначення доксиламіну

Фактична концентрація доксиламіну сукцинату в модельному розчині ($C_{reference}^{model} = 20$ мкг/мл)		Площа піку S_i^{model}	Знайдено в % до стандартної площі піку $\gamma_i^{model}, \%$	Розрахована концентрація доксиламіну сукцинату в модельному розчині $X_{i,calc}^{model}, \%$			$RR_{i,calc}^{model}, \%$			
$C_{i,fact}^{model}$, мкг/мл	$X_{i,fact}^{model}, \%$			25-175 %	25-150 %	25-125 %	25-175 %	25-150 %	25-125 %	
5	25,0	104084	26,35	24,46	25,44	24,51	97,83	101,75	98,06	
10	50,0	210902	53,38	51,67	52,01	51,84	103,33	104,03	103,67	
15	75,0	297698	75,35	73,77	73,61	74,04	98,36	98,14	98,72	
20	100,0	392788	99,42	97,99	97,27	98,36	97,99	97,27	98,36	
25	125,0	501845	127,03	125,77	124,40	126,25	100,62	99,52	101,00	
30	150,0	613891	155,39	154,31	152,28	–	102,87	101,52	–	
35	175,0	683470	173,00	172,03	–	–	98,30	–	–	
$S_{reference}^{model} = 395074$					$\overline{RR}^{model}, \%$			99,90	100,37	99,96
$\delta^{model}, \% = 100 - \overline{RR}^{model} \leq \max \delta^{model}$							0,10	0,37	0,04	
				Підхід 1	$\leq 4,52\% [16]$		відп.	відп.	відп.	
				Підхід 2	$\leq 2,05\% [16]$		відп.	відп.	відп.	
							RSD_{RR}^{model}			
							2,38	2,53	2,38	
$\Delta_{RR}^{model}, \% = RSD_{RR}^{model} \cdot t(95\%; g - 1) \leq \max \Delta_{sample}^{model}$							4,62	5,09	5,07	
				Підхід 1	$\leq 10,00\% [16]$		відп.	відп.	відп.	
				Підхід 2	$\leq 4,52\% [16]$		не відп.	не відп.	не відп.	

Таблиця 4

Результати перевірки правильності та прецизійності у варіанті МС
ГРХ/МС-методики кількісного визначення доксиламіну

Фактична концентрація доксиламіну сукцинату ($C_{reference}^{model} = 20$ мкг/мл)		Площа піку S_i^{model}	Знайдено в % до стандартної площі піку $\gamma_i^{model}, \%$	$Z_i^{model}, \%$		
$C_i^{model},$ мкг/мл	$X_{i, fact}^{model}, \%$			25-175 %	25-150 %	25-125 %
5	25	104084	26,35	105,38	105,38	105,38
10	50	210902	53,38	106,77	106,77	106,77
15	75	297698	75,35	100,47	100,47	100,47
20	100	392788	99,42	99,42	99,42	99,42
25	125	501845	127,03	101,62	101,62	101,62
30	150	613891	155,39	103,59	103,59	–
35	175	683470	173,00	98,86	–	–
$S_{reference}^{model} = 395074$		$\bar{Z}^{model}, \%$		102,30	102,87	102,73
$\delta^{model}, \% = 100 - \bar{Z}^{model} \leq \max \delta^{model}$				2,30	2,87	2,73
		Підхід 1	$\leq 4,52 \% [16]$	відп.	відп.	відп.
		Підхід 2	$\leq 2,05 \% [16]$	не відп.	не відп.	не відп.
RSD_Z^{model}				3,03	2,87	3,19
$\Delta_Z^{model}, \% = RSD_Z^{model} \cdot t(95\%; g - 1) \leq \max \Delta_{As}^{model}$				5,89	5,79	6,79
		Підхід 1	$\leq 14,14 \% [16]$	відп.	відп.	відп.
		Підхід 2	$\leq 6,40 \% [16]$	відп.	відп.	не відп.

Таблиця 5

Результати перевірки правильності та прецизійності у варіанті МД
ГРХ/МС-методики кількісного визначення доксиламіну

Фактична концентрація доксиламіну сукцинату в модельному розчині ($C_{reference}^{model} = 20$ мкг/мл)		Площа піку		Розрахована концентрація доксиламіну сукцинату в модельному розчині $X_{i, calc}^{model}, \%$	$RR_i^{model}, \%$
$C_i^{model},$ мкг/мл	$X_{i, fact}^{model}, \%$	$S_i^{model, MD}$	$S_{i+ad}^{model, MD}$		
5	25	107735	424729	25,49	101,96
5	25	108545	431705	25,19	100,77
10	50	202210	500096	50,91	101,82
15	75	284832	572661	74,22	98,96
20	100	388738	685425	98,27	98,27
20	100	410669	719283	99,80	99,80
				$\overline{RR}^{model, MD}, \%$	100,26
$\delta^{model, MD}, \% = 100 - \overline{RR}^{model, MD} \leq \max \delta^{model}$					0,26
		Підхід 1	$\leq 4,52 \% [16]$		відп.
		Підхід 2	$\leq 2,05 \% [16]$		відп.
$RSD_{RR}^{model, MD}$					1,51
$\Delta_{RR}^{model, MD}, \% = RSD_{RR}^{model, MD} \cdot t(95\%; n - 1) \leq \max \Delta_{As}^{model}$					3,05
		Підхід 1	$\leq 14,14 \% [16]$		відп.
		Підхід 2	$\leq 6,40 \% [16]$		відп.

Стабільність доксиламіну сукцинату в модельних розчинах задовольняє критеріям прийнятності [16] для всіх періодів часу як для Підходу 1, так і для Підходу 2.

Отримані дані свідчать про задовільні параметри лінійності, правильності та прецизійності розробленої методики для всіх варіантів діапазонів застосування лише в рамках менш жорсткого Підходу 1 для МКГ і МС та в рамках обох підходів для МД.

Межу кількісного визначення [16] для розробленої методики кількісного визначення доксиламіну встановлено як концентрацію аналіту в модельному розчині 1 ($\approx 25\%$) – 5 мкг/мл.

Перелік використаних джерел інформації

1. Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material / ed. by A. C. Moffat, M. D. Osselton, B. Widdop: 4th ed. – London : Pharmaceutical Press, 2011. – 2609 p.
2. Toxicological screening of medicines and drugs of abuse in emergency cases / A. Helland, K. A. Espnes, A. Reimers et al. // Tidsskr. Nor. Laegeforen. – 2008. – Vol. 128, Issue 1. – P. 42–45.
3. Robertson, H. T. Drugs associated with more suicidal ideations are also associated with more suicide attempts / H. T. Robertson, D. B. Allison // PLoS One. – 2009. – Vol. 4, Issue 10. – P. 7312. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007312>
4. Jones, A. W. Concentration distributions of the drugs most frequently identified in post-mortem femoral blood representing all causes of death / A. W. Jones, A. Holmgren // Med. Sci. Law. – 2009. – Vol. 49, Issue 4. – P. 257–273. <https://doi.org/10.1258/rsmmsl.49.4.257>
5. Clarke's analytical forensic toxicology / ed. by S. Jickells, A. Negrusz. – London : Chicago: Pharmaceutical Press, 2008. – 648 p.
6. Determination of diphenylmethane antihistaminic drugs and their analogues in body fluids by gas chromatography with surface ionization detection / H. Hattori, S. Yamamoto, M. Iwata et al. // J. Chromatogr. – 1992. – Vol. 581, Issue 2. – P. 213–218. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(92\)80274-t](https://doi.org/10.1016/0378-4347(92)80274-t)
7. Maurer, H. Screening procedure for the detection of alkanolamine antihistamines and their metabolites in urine using computerized gas chromatography-mass spectrometry / H. Maurer, K. Pflieger // J. Chromatogr. – 1988. – Vol. 428, Issue 1. – P. 43–60. [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(00\)83889-x](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(00)83889-x)
8. Friedman, H. The pharmacokinetics of doxylamine : use of automated gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection / H. Friedman, D. J. Greenblatt // J. Clin. Pharmacol. – 1985. – Vol. 25, Issue 6. – P. 448–451. <https://doi.org/10.1002/j.1552-4604.1985.tb02875.x>
9. Siek, T. J. Documentation of a doxylamine overdose death: quantitation by standard addition and use of three instrumental techniques / T. J. Siek, W. A. Dunn // J. Forensic Sci. – 1993. – Vol. 38, Issue 3. – P. 713–720. <https://doi.org/10.1520/jfs13460j>
10. 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. часопис. – 2014. – № 2 (30). – С. 46–51.
11. 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 и др. // Актуальні питання фармац. і мед. науки та практики. – 2014. – № 2 (15). – С. 15–22.
12. Determining accuracy in validation of UV-spectrophotometric methods of quantitative measurement in forensic toxicological analysis / L. Yu. Klimenko, S. M. Trut, G. P. Petyunin et al. // Укр. біофармац. журн. – 2014. – № 2 (31). – С. 55–67.
13. 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 Казахстана. – 2014. – № 3 (154). – С. 44–48.
14. 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 // Фармація Казахстана. – 2014. – № 4 (155). – С. 31–35.
15. Klimenko, L. Yu. Determination of linearity, accuracy and precision of UV-spectrophotometric methods of quantitative determination in forensic and toxicological analysis in the variant of the method of additions / L. Yu. Klimenko // Фармація Казахстана. – 2014. – № 7 (158). – С. 51–58.
16. Клименко, Л. Ю. Комплексний підхід до розробки та валидації методик кількісного визначення аналітів у біологічних рідинах в хіміко-токсикологічному аналізі: дис. ... докт. фармац. наук / Л. Ю. Клименко. – Х., 2015. – 816 с.
17. Гризодуб, А. И. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств / А. И. Гризодуб. – Х. : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2016. – 396 с.

References

1. Moffat, A. C., Osselton, M. D., Widdop, B. (Eds.). (2011). *Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material*. Pharmaceutical Press, London, 4th ed.
2. Helland, A., Espnes, K. A., Reimers, A., Aamo, T., Zahlens, K., Rygnestad, T., Spigset, O. (2008). Toxicological screening of medicines and drugs of abuse in emergency cases. *Tidsskrift for Den norske legeforening*, 128 (1), 42–45.
3. Robertson, H. T. (2009). Drugs associated with more suicidal ideations are also associated with more suicide attempts. *PLoS One*, 4 (10), 7312. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007312>
4. Jones, A. W. (2009). Concentration distributions of the drugs most frequently identified in post-mortem femoral blood representing all causes of death. *Medicine, Science and the Law*, 49 (4), 257–273. <https://doi.org/10.1258/rsmmsl.49.4.257>
5. Jickells, S., Negrusz, A. (Eds.). (2008). *Clarke's analytical forensic toxicology*. Pharmaceutical Press, London, Chicago.
6. Hattori, H., Yamamoto, S., Iwata, M., Takashima, E., Yamada, T., & Suzuki, O. (1992). Determination of diphenylmethane antihistaminic drugs and their analogues in body fluids by gas chromatography with surface ionization detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 581(2), 213–218. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(92\)80274-t](https://doi.org/10.1016/0378-4347(92)80274-t)
7. Maurer, H., & Pflieger, K. (1988). Screening procedure for the detection of alkanolamine antihistamines and their metabolites in urine using computerized gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 428, 43–60. [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(00\)83889-x](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(00)83889-x)

Висновки

Розроблено нову методику кількісного визначення доксиламіну методом газорідинної хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням. Виконано валидацію розробленої методики у варіантах застосування методу калібрувального графіка, методу стандарту та методу добавок за такими валидаційними параметрами як стабільність, діапазон застосування, лінійність/калібрувальна модель, правильність, прецизійність, межа кількісного визначення та підтверджено її прийнятність для застосування.

Конфлікт інтересів: відсутній.

8. Friedman, H., & Greenblatt, D. J. (1985). The Pharmacokinetics of Doxylamine: Use of Automated Gas Chromatography With Nitrogen-Phosphorus Detection. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 25(6), 448–451. <https://doi.org/10.1002/j.1552-4604.1985.tb02875.x>
9. Siek, T. J., & Dunn, W. A. (1993). Documentation of a Doxylamine Overdose Death: Quantitation by Standard Addition and Use of Three Instrumental Techniques. *Journal of Forensic Sciences*, 38(3), 713–720. <https://doi.org/10.1520/jfs13460j>
10. Klimenko, L. Yu., Petyunin, G. P. (2014). Development of approaches to validation of UV-spectrophotometric methods of quantitative determination in forensic and toxicological analysis: linearity and application range. *Farmatsevtichnyi chasopys*, 2 (30), 46–51.
11. Klimenko, L. Yu., Petyunin, G. P., Trut, S. M., Moroz, V. P. (2014). Aktualni pytannia farmatsevtichnoi i medychnoi nauky ta praktyky, 2 (15), 15–22.
12. Klimenko, L. Yu., Trut, S. M., Petyunin, G. P., Kostina, T. A. (2014). Determining accuracy in validation of UV-spectrophotometric methods of quantitative measurement in forensic toxicological analysis. *Ukrains'kij biofarmaceutichnij zhurnal*, 2 (31), 55–67.
13. Klimenko, L. Yu., Trut, S. M., Mykytenko, O. Ye. (2014). Approaches to determination of precision for UV-spectrophotometric methods of quantitative determination in forensic and toxicological analysis. *Farmatsyia Kazakhstana*, 3 (154), 44–48.
14. Klimenko, L. Yu. (2014). *Farmatsyia Kazakhstana*, 4 (155), 31–35.
15. Klimenko, L. Yu. (2014). Determination of linearity, accuracy and precision of UV-spectrophotometric methods of quantitative determination in forensic and toxicological analysis in the variant of the method of additions. *Farmatsyia Kazakhstana*, 7 (158), 51–58.
16. Klimenko, L. Yu. (2015). Kompleksnyi pidkhdid do rozrobky ta validatsii metodyk kilkisnoho vyznachennia analitiv u biolohichnykh ridynakh v khimiko-toksykologichnomu analizi. *Doctor's thesis*. Kharkiv, 816.
17. Grizodub, A. I. (2016). *Standartizovannye protsedury validatsii metodik kontrolya kachestva lekarstvennykh sredstv*. Kharkiv: DP «Ukrainskii naukovi farmakopeinii tcentr yakosti likarskikh zasobiv», 396.

Надійшла до редакції 17.05.2019 р.