

**РАЗРАБОТКА ТАНДЕМНОЙ УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЙ/  
ЭКСТРАКЦИОННО-ФОТОМЕТРИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ  
КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДОКСИЛАМИНА**

**Трут С. Н., Клименко Л. Ю.**

*Национальный фармацевтический университет,  
кафедра аналитической химии, г. Харьков*

**Ключевые слова:** доксиламин, УФ-спектрофотометрия, экстракционная фотометрия.

**Резюме:** Разработана тандемная методика, позволяющая одновременно определять доксиламин как по его собственному поглощению в УФ-области спектра, так и по поглощению метилового оранжевого в видимой области спектра, что обеспечивает дополнительную надежность анализа.

**Resume:** The procedure allowed to determine doxylamine simultaneously both by its own absorbance in UV-range of spectrum and by absorbance of methyl orange in visible range of spectrum has been developed that provides additional reliability of analysis.

**Актуальность.** Доксиламин (N,N-диметил-2-[1-фенил-1-(2-пиридинил)-этокси]этанамин) – снотворное лекарственное средство; в Украине применяется для лечения легких незначительных расстройств сна и, что важно, отпускается из аптек без рецепта [1].

За последние несколько лет количество случаев отравлений доксиламином стало значительным. Зарегистрированы как случайные летальные исходы в результате передозировки, так и случаи самоубийств. Нередки случаи злоупотреблений доксиламином, особенно его приема совместно с алкогольными напитками [2 – 4].

В химико-токсикологическом анализе хорошо зарекомендовали себя простые и экспрессные методики количественного определения с использованием оптических методов анализа, в частности, УФ-спектрофотометрии и экстракционной фотометрии. Так, для доксиламина разработаны УФ-спектрофотометрическая и экстракционно-фотометрическая методики количественного определения [5].

В то же время процедура проведения токсикологических экспертиз требует приводить результаты определения содержания аналита в пробе, полученные с помощью как минимум двух методик анализа, базирующихся на различных принципах. Поэтому актуальной является разработка так называемых тандемных методик, которые позволяют проводить определение вещества в одной пробе с помощью двух методов анализа одновременно.

**Цель:** разработать тандемную УФ-спектрофотометрическую/экстракционно-фотометрическую методику количественного определения доксиламина для целей химико-токсикологического анализа.

**Задачи:**

1. Обосновать условия тандемного количественного определения доксиламина методами УФ-спектрофотометрии и экстракционной фотометрии.

2. Провести валидацию разработанной методики для оценки пригодности ее использования в химико-токсикологическом анализе.

**Материалы и методы.** В эксперименте использовали доксиламина сукцинат фармакопейной чистоты.

Для регистрации спектров в УФ- и видимой областях спектра готовили растворы доксиламина сукцината, метилового оранжевого и их смесь с концентрацией  $5 \cdot 10^{-3}$  моль/л в отношении каждого из веществ. Регистрировали спектры поглощения данных растворов на спектрофотометре СФ-46 в диапазоне длин волн 220 – 600 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве компенсационного раствора использовали 0,1 моль/л раствор кислоты хлорис.товодородной.

Для валидации разрабатываемой методики использовали серию модельных растворов 1 – 7 ( $C_i^{model} = 52; 48; 40; 32; 24; 16; 8$  мкг/мл) и раствор сравнения ( $C_{reference}^{model} = 32$  мкг/мл).

*Методика выполнения тандемного УФ-спектрофотометрического/экстракционно-фотометрического определения доксиламина сукцината:* в делительную воронку вносили 10,00 мл ацетатного буферного раствора с pH = 4,6, 5,00 мл 0,02% раствора метилового оранжевого и 10,00 мл анализируемого раствора доксиламина сукцината. К полученной смеси добавляли 20,00 мл хлороформа. Смесь в делительной воронке встряхивали в течение 5 мин. с помощью механического встряхивателя и оставляли на 10 мин. для разделения слоев. Собирали хлороформный слой через бумажный фильтр («красная лента») с 1 г натрия сульфата безводного в делительную воронку и добавляли к нему 10,00 мл 0,1 моль/л раствора кислоты хлорис.товодородной. Смесь в делительной воронке встряхивали в течение 5 мин. с помощью механического встряхивателя и оставляли на 10 мин. для разделения слоев. Хлороформный слой отделяли и в дальнейшем не исследовали; водный слой фильтровали через бумажный фильтр («красная лента») и определяли его оптическую плотность на спектрофотометре СФ-46 ( $\lambda_1 = 262$  нм,  $\lambda_2 = 540$  нм) в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве компенсационного раствора использовали 0,1 моль/л раствор кислоты хлорис.товодородной.

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

**Результаты и их обсуждение.** Пригодность аналитической методики для дальнейшего применения в химико-токсикологическом анализе предложено оценивать путем проведения ее валидации в соответствии с описанной процедурой [6 – 8].

Процедура валидации предусматривает использование нормализованных координат. Для нормализации полученных экспериментальных данных используют раствор сравнения с концентрацией аналита, соответствующей его концентрации в точке 100% в нормализованных координатах. Диапазон применения методики  $D = 25 - 175\%$ ; количество концентрационных уровней  $g = 7$  с постоянным шагом 25%.

На первом этапе исследований нами проведена валидация описанной ранее [5] экстракционно-фотометрической методики определения доксиламина сукцината, основанной на образовании ионных ассоциатов с метиловым оранжевым при  $pH = 4,6$ , в варианте метода калибровочного графика (МКГ) [6 – 8].

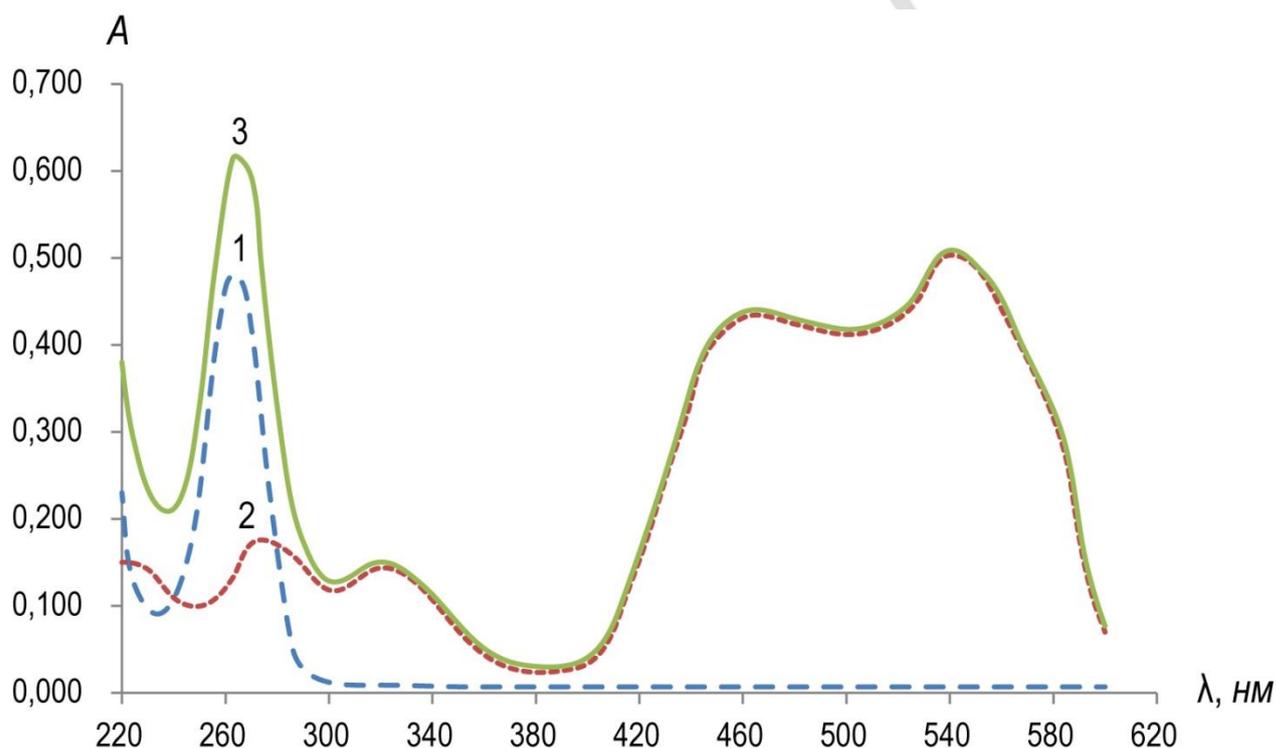
Суммарные результаты валидации приведены в Таблица 1 – описанная в [5] методика количественного определения доксиламина сукцината методом экстракционной фотометрии характеризуется неудовлетворительными валидационными параметрами.

На наш взгляд, неудовлетворительные линейность и сходимости методики связаны, во-первых, с использованием фотоэлектроколориметра для измерения оптической плотности, а, во-вторых, с приготовлением растворов с применением летучего растворителя – хлороформа.

С целью нивелирования указанных недостатков мы разработали тандемную УФ-спектрофотометрическую/экстракционно-фотометрическую методику – нами предложено одновременно проводить разрушение и реэкстракцию метилового оранжевого и доксиламина в 0,1 моль/л раствор кислоты хлоритовой водородной и проводить измерение оптической плотности метилового оранжевого и доксиламина в полученном водном растворе с помощью спектрофотометра.

Предпосылкой проведения такой модификации стали данные относительно зависимости степени экстракции доксиламина от  $pH$  среды – при  $pH = 1 - 2$  доксиламин не экстрагируется из водных растворов хлороформом [9], а также превращения метилового оранжевого при изменении  $pH$  среды – в кислой среде метиловый оранжевый существует в виде заряженной частицы, и поэтому должен реэкстрагироваться 0,1 моль/л раствором кислоты хлоритовой водородной из хлороформного раствора.

Для проверки сделанных предположений были получены спектры поглощения растворов доксиламина и метилового оранжевого, а также их смеси в эквимолярном соотношении – результаты приведены на Рис. 1.



**Рис. 1** – Спектры доксиламина ( - - - ) –  $\lambda_{\max} = 262$  нм, метилового оранжевого ( · · · · · ) –  $\lambda_{\max} = 275, 325, 460, 540$  нм, смеси доксиламина и метилового оранжевого 1:1 ( — ) –  $\lambda_{\max} = 262, 325, 460, 540$  нм в 0,1 моль/л растворе кислоты хлорсероводородной (концентрация  $5 \cdot 10^{-5}$  моль/л)

В спектре смеси доксиламина и метилового оранжевого отсутствуют дополнительные пики, не присущие каждому из компонентов отдельно.

Кроме того, для полученных спектров выполняются такие соотношения:

$$262 \text{ нм: } A_{\text{смеси}} = A_{\text{доксиламина}} + A_{\text{метилового оранжевого}}$$

$$540 \text{ нм: } A_{\text{смеси}} = A_{\text{метилового оранжевого}}$$

Таким образом, можно сделать вывод, что в 0,1 моль/л растворе кислоты хлорсероводородной отсутствует взаимодействие между доксиламином и метиловым оранжевым, т. е. можно измерять оптическую плотность каждого из компонентов в такой смеси отдельно.

Результаты валидации разработанной tandemной методики в варианте МКГ приведены в Таблица 1 – полученные данные говорят о том, что предложенная tandemная методика количественного определения доксиламина характеризуется удовлетворительной линейностью, правильностью и сходимостью, что делает ее пригодной для разработки методик количественного определения доксиламина в биологических жидкостях.

**Таблица 1.** Результаты валидации исследуемых методик в варианте МКГ

Параметр	ЭФ [5]	ЭФ/СФ (262/540 нм)
<i>1) линейность</i>		
$b^{model}$	1,007	0,987 / 0,979

$s_b^{model}$	0,019	0,006 / 0,007
$a^{model}$	0,546	0,620 / 0,948
$s_a^{model}$	2,099	0,693 / 0,753
$RSD_0^{model}$	2,484	0,821 / 0,891
Критерий: $RSD_0^{model} \leq \max RSD_0^{model}$		$\leq 2,25$
$R_c^{model}$	0,9991	0,9999 / 0,9999
Критерий: $R_c^{model} \geq \min R_c^{model}$		$\geq 0,9991$
<i>2) правильность и сходимость</i>		
$\overline{RR}^{model}$	99,79	100,06 / 99,98
$\delta^{model} =  100 - \overline{RR}^{model} $	0,21	0,06 / 0,02
Критерий: $\delta^{model} \leq \max \delta^{model}$		$\leq 2,05\%$
$RSD_{RR}^{model}$	2,68	1,51 / 1,25
$\Delta_{RR}^{model} = RSD_{RR}^{model} \cdot t(95\%; g - 1)$	5,21	2,94 / 2,43
Критерий: $\Delta_{sample}^{model} = \Delta_{RR}^{model} \leq \max \Delta_{sample}^{model}$		$\leq 4,52\%$
Общий вывод	<b>не соответствует</b>	<b>соответствует</b>

Предложенная методика позволяет одновременно определять доксиламин как по его собственному поглощению в УФ-области спектра, так и по поглощению метилового оранжевого в видимой области спектра, что обеспечивает дополнительную надежность анализа и отвечает требованиям к выполнению исследований в химико-токсикологическом анализе – определение нужно проводить с помощью как минимум двух методик анализа, которые основаны на разных принципах.

#### **Выводы:**

1. Проведена валидация описанной в литературе экстракционно-фотометрической методики количественного определения доксиламина в варианте МКГ с использованием модельных растворов с целью подтверждения ее пригодности для количественного определения доксиламина в биологических жидкостях – методика характеризуется неудовлетворительной линейностью, правильностью и сходимостью.

2. С целью улучшения правильности и сходимости описанная методика была модифицирована путем введения дополнительной стадии (разрушения и реэкстракции метилового оранжевого и доксиламина в 0,1 моль/л раствор кислоты хлоридной) и проведения измерения оптической плотности метилового оранжевого и доксиламина в полученном водном растворе с помощью спектрофотометра – следствием проведенной модификации стала разработка тандемной УФ-спектрофотометрической/экстракционно-фотометрической методики количественного определения доксиламина.

3. Проведена валидация разработанной тандемной УФ-спектрофотометри-

ческой/экстракционно-фотометрической методики количественного определения доксиламина в варианте МКГ – методика характеризуется удовлетворительной линейностью, правильностью и сходимостью для обоих подходов к оценке ее приемлемости.

### Литература

1. Державний реєстр лікарських засобів України // Державний реєстр лікарських засобів України URL: [http://www.drlz.kiev.ua] (дата обращения: 05.10.2015).
2. Toxicological screening of medicines and drugs of abuse in emergency cases / A. Helland, K. A. Espnes, A. Reimers, T. Aamo, K. Zahlens, T. Rygnestad, O. Spigset // *Tidsskr. Nor. Laegeforen.* – 2008. – V. 128 (1). – 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. – V. 4 (10). – P. 7312.
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. – V. 49 (4). – P. 257 – 273.
5. Болотов, В. В. Спектрофотометричне та екстракційно-фотометричне визначення дономілу / В. В. Болотов, І. М. Іванчук // *Вісник фармації.* – 2005. – №4 (44). – С. 16 – 19.
6. 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 (31). – С. 55 – 67.
7. 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 (154). – С. 44 – 48.
8. 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.
9. Болотов, В. В. Вивчення методів ізолювання дономілу з об'єктів біологічного походження / В. В. Болотов, І. М. Іванчук, Л. Ю. Клименко // *Вісн. фармації.* – 2008. – №3 (55). – С. 20 – 22.