

УДК 340.67:543:615.214

## ВАЛИДАЦИОННАЯ ОЦЕНКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДОКСИЦИКЛИНА В МОЧЕ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ ПОСЛЕ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО ВЫДЕЛЕНИЯ

Фомин А. Н., Хомов Ю. А.

*ГБОУ ВПО Ярославская государственная медицинская академия, Ярославль*

*Ярославль, Россия (150000, г. Ярославль, ул. Революционная, 5)*

*ГБОУ ВПО Пермская государственная фармацевтическая академия, Пермь*

*Пермь, Россия (614000, г. Пермь, ул. Полевая, 2), [homov@pfa.ru](mailto:homov@pfa.ru)*

---

**В статье представлены результаты экспериментальных исследований по установлению валидационных параметров методики количественного определения доксициклина УФ-спектрофотометрией в моче после электрофоретического выделения.**

**Изолирование проведено прямой дробной жидкостно-жидкостной экстракцией хлороформом при pH 7. Устранения фонового влияния соэкстрактивных балластных веществ мочи удалось добиться с помощью электрофоретической методики на приборе ПВЭФ-1 (хроматографическая бумага марки «С», напряжение 400В, электролит-буферный раствор Бриттона-Робинсона pH 2,3). Детектирование доксициклина в УФ-свете при длине волны 365 нм. С электрофореграммы доксициклин элюировали 0,01М раствором хлористоводородной кислоты и элюат подвергали УФ-анализу.**

**Методика охарактеризована по показателям валидации: линейность, селективность, правильность, сходимости результатов, предел обнаружения, предел определения доксициклина.**

**При статистической обработке полученные результаты находятся в пределах критериев приемлемости.**

---

**Ключевые слова:** доксициклин, моча, экстракция, электрофорез, УФ-спектрофотометрия, валидация.

## VALIDATIONAL ESTIMATE OF THE PROCEDURE OF DETERMINATION OF DOXYCYCLINE IN URINE BY SPECTROPHOTOMETRIC METHOD AFTER ELECTROPHORETICAL ISOLATION

Phomin A. N., Khomov Y. A.

*Yaroslavl State Medical Academy, Yaroslavl*

*Yaroslavl, Russia (150000, Yaroslavl, Revolyutsionnaya st 5)*

*Perm State Pharmaceutical Academy, Perm,*

*Perm, Russia (614081, Polevaya st 2), [homov@pfa.ru](mailto:homov@pfa.ru)*

---

**The results of experimental investigations on establishment of validation parameters of procedure of quantitative determination of doxycycline in urine by UV-spectrophotometry after electrophoretical isolation are given.**

**The isolation was carried out by direct fractional liquid- liquid extraction with chloroform at pH 7. We succeeded in obtaining the elimination of the influence of ballastic extractive substances from urine with the help of electrophoretical procedure on apparatus PVAF-1 (chromatographic paper grade “C”, voltage 400V, electrolyte – Britton-Robinson buffer solution pH 2,3). Detection of doxycycline was done in UV-light at 365 nm. Doxycycline was eluted from electrophoregram with 0,01M solution of hydrochloric acid. The eluate was undergone by UV-analysis**

**The procedure was characterized on following indices: linearity, selectivity, accuracy, precision, limit of detection, limit of quantification of doxycycline.**

**The received results are in the range of the limits of criteria of acceptability in statistic process.**

---

**Key words:** doxycycline, urine, extraction, electrophoresis, UV-spectrophotometry, validation.

Среди инструментальных методов наиболее широко распространённым всё ещё остаётся метод УФ-спектрофотометрии как наиболее доступный из спектральных методов, но, в то же время, достаточно чувствительный и информативный.

Метод является фармакопейным для проверки чистоты препарата, качественного и количественного определения субстанций и готовых лекарственных форм [2, 3]. Широко

используется при изучении биодоступности, фармако- и токсикокинетики, изучения стабильности и установления сроков годности лекарственных средств.

Достоинством метода является его универсальность, возможность сочетания с другими методами, невысокая ошибка аналитических измерений, экономичность.

Метод спектрометрии весьма полезен для проведения терапевтического мониторинга, основанного на количественном определении лекарственного вещества в моче, так как, только количественное содержание позволяет оценить роль лекарства в организме.

УФ-спектрофотометрический метод применяется при исследовании лекарственных веществ в биологических жидкостях и субстратах; используется и для скрининга, чаще на этапе подтверждающего анализа, после ТСХ выделения исследуемого вещества [5].

Целью исследования явилась валидационная оценка методики количественного определения доксициклина в моче с использованием УФ-спектрофотометрии после электрофоретического выделения.

Доксициклина гидрохлорид (6-Дезокси-5-окситетрациклина гидрохлорид) относится к полусинтетическим производным окситетрациклина [4], в основе химического строения которого лежит конденсированная четырёхциклическая система, содержащая в своём составе группы основного и кислотного характера.

Для количественного определения доксициклина как соединения, имеющего в своей структуре системы сопряжённых связей, использовали вариант УФ-спектрофотометрии (анализ по электронным спектрам вещества). Анализ электронных спектров в различных растворителях показал, что доксициклин имеет УФ-спектры, характеризующиеся одной полосой поглощения с двумя максимумами. Наличие ярко выраженного максимума абсорбции доксициклина в 0,01М растворе хлористоводородной кислоты, в доступной области измерений, при длине волны 268 нм (а также в связи с тем, что раствор хлористоводородной кислоты предполагалось применять в качестве элюента доксициклина с электрофореграммы); позволило нам использовать собственное поглощение вещества в разработке спектрофотометрической методики его количественного определения.

При валидации для подтверждения фактора линейности, которая устанавливается на основании результатов испытаний, пропорциональных концентрации анализируемого вещества в образце в пределах аналитической методики, строили градуировочный график зависимости оптической плотности от концентрации доксициклина на 5 уровнях концентраций его стандартных растворов [1]. Для чего точную навеску доксициклина растворяли в 0,01М растворе хлористоводородной кислоты, готовили серию разведений и абсорбцию полученных стандартных растворов измеряли при 268 нм (аналитическая длина волны) на спектрофотометре СФ-46 в 1 см кюветах относительно чистого растворителя.

Зависимость оптической плотности от концентрации доксициклина была аппроксимирована линейным уравнением с помощью метода наименьших квадратов. Коэффициент корреляции составил 0,9998. Полученное уравнение имеет вид:

$$A = 0,00713C + 0,00825.$$

Линейная зависимость наблюдалась в интервале от 2 до 18 мкг/мл. Результаты зависимости аналитического сигнала от концентрации доксициклина, представленные графически, показали, что регрессия строго линейна. Критерием приемлемости линейности явился и коэффициент корреляции, его расчетная величина близка к единице. Таким образом, в данных интервалах концентраций методика обеспечивает определение доксициклина с требуемой линейностью.

Используя результаты построения градуировочного графика, рассчитывали молярный и удельный показатели поглощения и чувствительность определения доксициклина, приняв за  $A_{\text{мин}} = 0,01$ .

Результаты приведены в таблице 1.

Таблица 1

Параметры доксициклина при УФ-спектрофотометрическом определении

Соединение	Мол. масса	$\epsilon_m$	$A_{1\text{см}}^{1\%}$	Чувствительность	
				М	мкг/мл
Доксициклин гидрохлорид	512,9	18843,9	367,4	$0,52 \cdot 10^{-6}$ моль/л	0,27

Как видно из таблицы 1, УФ-спектрофотометрическое определение доксициклина обладает высокой чувствительностью и позволяет определять 0,27 мкг/мл вещества.

Для определения количественного содержания доксициклина использовали удельный показатель поглощения, который рассчитывали по формуле:

$$A_{1\text{см}}^{1\%} = \frac{A}{b \cdot c};$$

A – абсорбция;

b – толщина поглощающего слоя, см;

c – концентрация раствора, %.

При определении погрешности спектрофотометрического определения доксициклина по удельному показателю поглощения установлено, что результаты не отягощены систематической ошибкой, являются правильными и имеют хорошую воспроизводимость.

Для результатов химико-токсикологического анализа решающее значение имеет способ изолирования анализируемого вещества из объекта исследования. На сегодняшний день большинство методов изолирования лекарственных веществ из биологических жидкостей основано на непосредственной жидкостно-жидкостной экстракции их в органическую фазу при различных значениях pH среды [6, 7].

Было проведено исследование по изучению экстрагируемости доксициклина различными органическими растворителями в зависимости от pH среды. Для чего использовали универсальные буферные растворы Бриттона-Робинсона и растворители: хлороформ, этилацетат, эфир, бензол. Значения pH буферного раствора в пределах 2,0–12,0 определяли потенциометрически. Количественное определение доксициклина в экстрактах проводили с помощью спектрофотометрической методики при длине волны 268 нм. Установлено, что наибольшее количество доксициклина экстрагируется хлороформом при pH 7. Таким образом, хлороформ может служить оптимальным экстрагентом для изолирования доксициклина при направленных исследованиях и в общей схеме изолирования при ненаправленных анализах.

Полученные результаты послужили основой для разработки методики определения доксициклина в биопробах (моча).

Однако при анализе мочи неизбежно потенциальное влияние фоновых соединений (биогенные амины, пептиды, продукты метаболизма белков, мочевые пигменты и др.), которые могут влиять на достоверность результатов анализа. Поэтому очистке извлечений придается большое значение, особенно при использовании УФ-спектрофотометрии. Для устранения фонового влияния сопутствующих соэкстрактивных веществ мочи использована электрофоретическая методика. В качестве элюента доксициклина из хроматографической бумаги для последующего спектрофотометрического определения использовали 0,01M раствор хлористоводородной кислоты.

Изолирование доксициклина из мочи (в условиях модельного эксперимента 10 мл) проводили прямой дробной экстракцией хлороформом при pH 7 по универсальному индикатору, трижды по 10 мл. Эмульсию разрушали центрифугированием (6 тыс. об/мин, 10 мин). Органический растворитель испаряли досуха при комнатной температуре в защищенном от света месте. Сухие остатки растворяли в 30 % растворе уксусной кислоты. Для отделения от метаболитов и устранения фонового влияния эндогенных балластных веществ проводили электрофоретическое выделение доксициклина на приборе ПВЭФ-1

(хроматографическая бумага марки «С», напряжение 400 В, время электрофореза 1,5 часа). В качестве электролита использовали буферный раствор Бриттона-Робинсона при рН 2,3.

На линию старта хроматографической бумаги (15x27 см) в 6 см от анодного конца микродозатором наносили 100 мкл полученного уксуснокислого раствора, параллельно метчику – 0,01 % стандартный раствор доксициклина по 25 мкг в пробу, и проводили электрофорез в вышеназванных условиях. Детектировали исследуемое вещество в УФ-свете при длине волны 365 нм. Зоны, соответствующие доксициклину, вырезали, измельчали до размера 0,5x0,5 см, элюировали 5 мл 0,01М раствора хлористоводородной кислоты и элюат подвергали УФ-анализу. Следует отметить, что спектры поглощения доксициклина, выделенного из мочи, полностью совпадали с характером спектра стандартного раствора доксициклина в 0,01 растворе хлористоводородной кислоты, т.е. электрофоретический прием обеспечивает достаточную степень очистки для УФ-спектрофотометрии.

Специфичность методики заключается, в том числе, в ее способности достоверно определять анализируемое вещество в присутствии соэкстрактивных балластных веществ объекта исследования. Для установления специфичности по предлагаемой методике анализировали модельный образец мочи, образец мочи плацебо и стандартный раствор доксициклина. Полученные данные показали отсутствие пятен доксициклина на электрофореграмме образцов плацебо, совпадающих по расположению с пятном доксициклина, и подтверждают, что пятно исследуемого соединения в модельных образцах мочи принадлежит именно ему и совпадает с пятном доксициклина стандартного раствора. Рассматриваемая методика валидна по показателю специфичности.

Результаты определения доксициклина в моче спектрофотометрическим методом после электрофоретического выделения представлены в таблице 2.

Таблица 2

Количественное определение доксициклина в моче

Концентрация доксициклина в модельной смеси, мкг/мл	Найдено доксициклина после изолирования		Метрологические характеристики
	мкг/мл	%	
10	7,9	79,0	$S = 2,08$
	7,6	76,0	$S_{\bar{x}} = 1,20$
	8,0	80,0	$\Delta \bar{x} = 5,16$
	$\bar{x}_{\text{ср.}} 7,83$	78,3	$\bar{\epsilon} = 6,59$
50	41,2	82,4	$S = 1,41$
	41,8	83,6	$S_{\bar{x}} = 0,82$

	40,9	80,8	$\Delta \bar{x} = 3,53$
	$\bar{x}_{\text{ср.}}$ 44,3	82,3	$\bar{\epsilon} = 4,29$
100	82,0	82,0	$S = 0,95$
	83,9	83,9	$S \bar{x} = 0,55$
	83,1	83,1	$\Delta \bar{x} = 2,37$
	$\bar{x}_{\text{ср.}}$ 83,0	83,0	$\bar{\epsilon} = 2,86$

При статистической обработке данных, полученных в ходе количественного определения доксициклина, в модельных пробах мочи, на трёх уровнях концентраций, отражается вполне удовлетворительная повторяемость результатов в пределах рекомендуемой аналитической области. Рассчитанное стандартное отклонение среднего результата (критерий воспроизводимости результатов измерений) находится в пределах критерия приемлемости (менее 2 процентов) [1].

Предел обнаружения доксициклина на электрофореграмме – 0,1 мкг вещества в пробе.

Предел определения методом УФ-спектрофотометрии после электрофоретического выделения составил для доксициклина 1 мкг/мл.

## Выводы

1. Разработана методика определения доксициклина в моче на основе прямой дробной экстракции хлороформом, электрофоретического выделения и УФ-спектрофотометрии.

2. Показано, что по разработанной методике пробоподготовки при использовании электрофоретического приёма, балластные вещества мочи не мешают УФ-спектрофотометрическому определению доксициклина.

3. Методика охарактеризована по показателям валидации: линейность, специфичность, правильность, сходимость результатов, предел обнаружения, предел определения доксициклина. При статистической обработке полученные результаты находятся в пределах критериев приемлемости. Методика отвечает требованиям валидации и может быть рекомендована к применению при клинико-диагностических и химико-токсикологических анализах доксициклина.

## Список литературы

1. Аладышева Ж. И. Практические аспекты работ по валидации аналитических методик / Ж. И. Аладышева, В. В. Беляев, В. В. Береговых // Фармация. – 2008. – № 7. – С. 9–14.

2. Государственная Фармакопея Российской Федерации: 12-е изд., Ч.1. – М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2008. – 704 с.
3. Государственная Фармакопея СССР: 11-е изд., Вып.1. – М.: Медицина, 1987. – 336 с.
4. Машковский М. Д. Лекарственные средства: 16-е изд., – М.: Новая волна, 2010. – 1216 с.
5. Химико-токсикологический анализ золпидема / Ю. А. Хомов, Е. И. Егорова, Н. В. Кокшарова, Е. А. Шилова // Вестник РУДН, серия Медицина. – 2009. – № 4. – С. 469–473.
6. Хомов Ю. А. Изолирование, обнаружение и количественное определение золпидема в биологических жидкостях / Ю. А. Хомов, Е. А. Крылова, Е. И. Егорова // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 2. – URL: [www.science-education.ru/102-5868](http://www.science-education.ru/102-5868) (дата обращения 23.04.2012).
7. Хромато-масс-спектрометрическое определение зопиклона в моче / С. С. Катаев, Ю. А. Хомов, Н. В. Кокшарова, М. Дайех // Журнал аналитической химии. – 2007. – Т. 62. – № 5. – С. 510–514.

**Рецензенты:**

Михалев А. И., д. фарм. н., профессор, зав. кафедрой биологической химии, ГБОУ ВПО ПГФА Минздравсоцразвития, г. Пермь.

Ярыгина Т. И., д. фарм. н., профессор, профессор кафедры фармацевтической химии очного факультета, ГБОУ ВПО ПГФА Минздравсоцразвития, г. Пермь.