

# ПРОЦЕДУРА ОПРЕДЕЛЕНИЯ И КРИТЕРИИ ПРИЕМЛЕМОСТИ ВАЛИДАЦИОННЫХ ПАРАМЕТРОВ МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНАЛИТОВ В БИОЖИДКОСТЯХ В ВАРИАНТЕ МЕТОДА СТАНДАРТА

*Клименко Л. Ю., Петюнин Г. П., Костина Т. А., Микитенко Е. Е.*

**Национальный фармацевтический университет, г. Харьков**

В настоящее время существует ряд международных руководств, дающих направленные рекомендации по проведению валидации биоаналитических методик [FDA, 2001; EMA, 2011; UNODC, 2009; SWGTOX, 2012]. Указанные документы ориентированы на разработку методик количественного определения аналитов в биологических жидкостях в варианте метода калибровочного графика. Метод калибровочного графика, безусловно, позволяет учесть и частично нивелировать фоновое влияние матрицы на результаты определения, но оправдывает себя лишь в случае выполнения рутинных анализов.

В судебно-токсикологическом анализе мы часто сталкиваемся с разовыми экспертизами, на которые направляются разнообразные биологические жидкости, органы и ткани, т. е. необходимо количественно определять аналит в нескольких разнообразных биологических объектах, при этом необходимость выполнения такого определения может возникать достаточно редко. В такой ситуации построение калибровочного графика для каждой матрицы потребует совершенно нерациональных затрат времени, и к моменту получения результатов анализа они могут стать неактуальными.

В связи с этим возникает необходимость изучить возможность использования метода стандарта при проведении определения аналитов в биологических жидкостях и предложить процедуру определения и оценки приемлемости линейности, правильности и прецизионности для валидации таких методик в варианте метода стандарта.

Определение валидационных параметров методик количественного определения аналитов в биологических жидкостях в варианте метода стандарта нами предложено проводить в соответствии со следующей процедурой:

1) применение нормализованных координат:

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

$$C_i = C_{sample}; \quad A_i = A_{sample} - A_{blank}; \quad S_i = S_{sample};$$

для нормализации полученных экспериментальных данных используют два подхода:

- Подход 1: использование раствора сравнения с концентрацией аналита ( $C_{reference}^{model}$ ), соответствующей его концентрации в конечном анализируемом растворе при условии нулевых потерь для точки 100% в нормализованных координатах:

$$C_{st} = C_{reference} = C_{reference}^{model} \cdot K; \quad A_{st}(S_{st}) = A_{reference}(S_{reference}) = \frac{A_{reference}^{model}(S_{reference}^{model}) \cdot \bar{R}}{100}; \quad (2)$$

- Подход 2: использование образца сравнения с концентрацией аналита ( $C_{reference}^{sample}$ ), соответствующей его концентрации для точки 100% в нормализованных координатах:

$$C_{st} = C_{reference}^{sample}; \quad A_{st} = A_{reference}^{sample} - \bar{A}_{blank}^*; \quad S_{st} = S_{reference}^{sample}; \quad (3)$$

- 2) диапазон применения – 25 – 125%, 25 – 150% или 25 – 175%; за 100% принимают среднюю летальную либо токсическую концентрацию аналита в соответствующей биологической жидкости; количество концентрационных уровней –  $g = 5, 6$  или  $7$  (в зависимости от выбранного диапазона применения) с постоянным шагом 25%;
- 3) оценку линейности, правильности и сходимости методики на первом этапе выполняют с использованием модельных растворов в рамках подхода, основанного на предположении незначимости неопределенности количественного определения аналита в модельных растворах  $\Delta_{As}^{model}$  по сравнению с полной неопределенностью результатов анализа  $\Delta_{As}$ , в соответствии с рассчитанными критериями приемлемости параметров линейной зависимости (табл. 1):

Таблица 1

Критерии приемлемости линейности по модельным растворам в варианте метода стандарта

диапазон (g)	$\max a^{model}$	$RSD_{range}$	$t(95\% ; g - 2)$	$\max RSD_0^{model}$	$\min R_c^{model}$
25 – 125% ( $g = 5$ )	2,73%	39,53%	2,3534	2,72%	0,9976
25 – 150% ( $g = 6$ )		46,77%	2,1318	3,00%	0,9979
25 – 175% ( $g = 7$ )		54,01%	2,0150	3,18%	0,9983

а также требованиями к правильности и сходимости ( $\delta^{model} \leq 2,05\%$  и  $\Delta_{As}^{model} \leq 6,40\%$ );

- 4) на втором этапе проводят определение линейности, правильности, сходимости и внутрилабораторной прецизионности методики на модельных образцах, приготовленных с использованием матрицы, для трех параллельных последовательностей; в рамках каждой последовательности определяют значения параметров линейности, величин  $\delta$  и  $\Delta_z$ , величины которых сравнивают с рассчитанными критическими значениями (табл. 2):

Таблица 2

Критерии приемлемости правильности, сходимости и линейности в варианте метода стандарта

диапазон (g)	$\max \Delta_z$	$\max \delta$	$\max a$	$\max RSD_0$	$\min R_c$
25 – 125% ( $g = 5$ )	20,00%	6,40%	8,53%	8,50%	0,9766
25 – 150% ( $g = 6$ )				9,38%	0,9797
25 – 175% ( $g = 7$ )				9,93%	0,9830

для проверки внутрилабораторной прецизионности для трех полученных последовательностей рассчитывали объединенное среднее значение  $\bar{Z}^{intra}$ , объединенное стандартное отклонение  $RSD_Z^{intra}$  и относительный доверительный интервал  $\Delta_Z^{intra}$ ; величина  $\Delta_Z^{intra}$  не должна превышать максимальную неопределенность анализа  $\max \Delta_{As}$ :

$$\Delta_Z^{intra} = t(95\% , 3g - 1) \cdot RSD_Z^{intra} \leq \max \Delta_{As}. \quad (4)$$

Таким образом, нами предложена и обоснована процедура определения и оценки приемлемости линейности, правильности и прецизионности для валидации методик количественного определения аналитов в биологических жидкостях, применяемых в судебно-токсикологическом анализе, в варианте метода стандарта.