

**ВАЛИДАЦИЯ УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИХ МЕТОДИК
КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ В СУДЕБНО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОМ
АНАЛИЗЕ: ОЦЕНКА ПОТЕРЬ ЦЕЛЕВОГО АНАЛИТА**

*Клименко Л. Ю., Трут С. Н., Петюнин Г. П.**

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков, Украина

***Харьковская медицинская академия последиplomного образования, г. Харьков**

Количество аналита, достигшее конца процедуры анализа и выраженное в процентах по отношению к начальному количеству, характеризуется валидационным параметром «recovery» [UNODC, 2009]. Международные рекомендательные документы в области валидации биоаналитических методик определяют recovery как «эффективность экстракции аналитического процесса, представляющую собой выраженную в процентах часть известного количества аналита, доведенную до конца экстракции и технологических стадий методики» [FDA, 2001; SWGTOX, 2012] либо как «процентное отношение отклика детектора, полученного от количества аналита, добавленного в матрицу до экстракции, и отклика детектора, полученного от того же количества аналита, добавленного после экстракции» [UNODC, 2009].

Таким образом, все три международных документа так или иначе увязывают валидационный параметр recovery с процедурой экстракции, что, в свою очередь, подразумевает, что экстракция – это основная стадия процедуры пробоподготовки, приводящая к потерям целевого аналита. В то же время, авторы [Крамаренко В. Ф., 1989] в качестве основного механизма повышения количества аналита, извлекаемого из биологического материала, рассматривают разрушение связей между белками и анализируемым веществом.

Целью данной работы является формирование оптимальной процедуры выполнения эксперимента для определения стадий процедуры пробоподготовки, приводящих к наибольшим потерям целевого аналита; оценка величины потерь целевого аналита на стадиях пробоподготовки; выделение критических стадий пробоподготовки, нуждающихся в оптимизации для повышения recovery.

Оценку величины потерь целевого аналита на стадиях пробоподготовки и выделение критических стадий пробоподготовки, нуждающихся в оптимизации, проводили на примере УФ-спектрофотометрической методики количественного определения доксиламина в крови. Для проведения валидации УФ-спектрофотометрической методики количественного определения доксиламина в крови применяли нормализованные координаты [Гризодуб А. И., 2011; Клименко Л. Ю. и др., 2013]; аналитический диапазон методики составляет 25 – 175%; за 100% принимали летальную концентрацию доксиламина в крови [Köppel et al., 1987] – 25 мг/л (что соответствует 36 мг/л доксиламина сукцината).

Для того, чтобы оценить потери доксиламина на каждой стадии пробоподготовки, выполняли анализ blank-проб матрицы и растворителя, в которые вводили аналит в количестве, соответствующем точкам 25%, 100% и 175%, последовательно на каждом этапе методики, и определяли параметр «recovery» (R , %) и его воспроизводимость ($\Delta_{R,r}$, %) как было предложено ранее [Klimenko, L. Yu. et al., 2013]. Все потери аналита (L_{analyte} , %) в ходе выполнения биоаналитической методики условно можно разделить на два типа – потери за счет выполнения операций пробоподготовки (операционные потери – $L_{\text{procedure}}$, %) и потери за счет влияния биологической матрицы (L_{matrix} , %). Согласно полученным нами результатам можно сделать следующие выводы:

- ~70% общих потерь аналита приходится на потери второго типа – воспользовавшись принципом незначимости [Гризодуб А. И., 2011] можно показать, что операционные потери незначимы по сравнению с общими потерями, т. е. $L_{procedure} \leq 0,32 \cdot L_{analyte}$;
- ~85% потерь, связанных с влиянием биологической матрицы, обеспечивают первые две стадии процедуры пробоподготовки – настаивание биологического материала с трихлоруксусной кислотой и последующее центрифугирование (воспользовавшись принципом незначимости можно показать, что потери третьей и последующих стадий незначимы по сравнению с общими потерями и потерями второго типа, т. е. $L_{3-n} \leq 0,32 \cdot L_{analyte}$ и $L_{3-n} \leq 0,32 \cdot L_{matrix}$);
- невысокое значение параметра «recovery» связано не с недостаточной эффективностью экстракции, а с неполным разрывом связей аналита с матрицей (белками и форменными элементами крови) и с его соосаждением на твердых компонентах биологической матрицы в ходе центрифугирования, т. е. англоязычный термин «recovery» более корректно называть не «степенью экстракции», а принятыми в отечественной литературе терминами «степень изолирования» либо «степень извлечения» аналита из биологической матрицы;
- для повышения эффективности извлечения аналита из матрицы, т. е. для увеличения значения параметра «recovery» необходимо проводить модификацию и оптимизацию критических стадий методики, т. е. подбирать реагенты, обеспечивающие максимальный разрыв связей аналита с компонентами матрицы, и минимизировать соосаждение аналита на компонентах матрицы.

Использованная для количественного определения доксиламина в крови процедура пробоподготовки является одной из общепринятых в судебно-токсикологическом анализе; основные этапы таких процедур по своей сути являются общими, а различия касаются реагентов, используемых для разрушения связей компонентов биологической матрицы с веществом, кратности экстракции, используемых органических растворителей и их объемов и т. д. Таким образом, с учетом полученных результатов, можно сформировать алгоритм выбора оптимальной процедуры пробоподготовки, обеспечивающей достаточную эффективность изолирования аналита из биологической матрицы:

- на первом этапе необходимо проанализировать по исследуемой методике рабочие растворы аналита в точках 25%, 100% и 175% и определить величины R , % и $\Delta_{R,r}$, % – если величина R является низкой либо невоспроизводимой, работать далее с такой процедурой пробоподготовки будет нецелесообразным;
- на втором этапе необходимо определить параметр «recovery» и оценить его воспроизводимость для методики в соответствии с предложенной ранее процедурой [Klimenko, L. Yu. et al., 2013];
- на третьем этапе необходимо оценить значимость $L_{procedure}$ по сравнению с L_{matrix} – если $L_{procedure} \geq 0,32 \cdot L_{matrix}$, то можно проводить дальнейшую работу по валидации данной методики, в случае, если $L_{procedure} \leq 0,32 \cdot L_{matrix}$, методика нуждается в доработке в отношении стадий настаивания и центрифугирования.

Итогом выполненной работы является выделение критических стадий пробоподготовки, нуждающихся в оптимизации для повышения recovery, путем оценки величины потерь целевого аналита на отдельных этапах методики на примере УФ-спектрофотометрического определения доксиламина в крови. Предложены подходы к выбору оптимальной процедуры пробоподготовки, обеспечивающей достаточную эффективность изолирования аналита из биологической матрицы.