

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАРАМЕТРА "ЛИНЕЙНОСТЬ" В ХОДЕ ПРОЦЕДУРЫ
ВАЛИДАЦИИ МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
МЕТОДОМ УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ
В СУДЕБНО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ**

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

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

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

Согласно международным руководствам по валидации биоаналитических методик для определения линейности предполагается построение калибровочной кривой с использованием той же биологической матрицы, для которой разрабатывается методика, для 6 – 8 (U.S. FDA, 2001), 6 и более (EMA, 2011; SWGTOX, 2012), 5 (UNODC, 2009) концентрационных уровней. Документы SWGTOX и UNODC требуют для каждого концентрационного уровня приготовления 5 растворов с использованием различных источников биологической матрицы, документы FDA и EMA требований к количеству растворов не предъявляют.

Задавшись вопросом, не являются ли требования SWGTOX избыточно жесткими, мы провели определение линейности на примере УФ-спектрофотометрической методики количественного определения доксиламина в крови (Болотов В. В. и др., 2011) в соответствии с требованиями руководства SWGTOX, и показали динамику изменений метрологических характеристик полученных линейных зависимостей при уменьшении количества концентрационных уровней (от 7 до 5) и повторов для каждого уровня (от 5 до 3).

Методика: 100,00 мл крови заливают 50,00 мл 10% водного раствора кислоты трихлоруксусной, перемешивают и оставляют на 1 час при постоянном перемешивании. Смесь центрифугируют (в течение 5 мин. при 5000 об./мин.), сливают надосадочную жидкость, доводят ее объем до 100 мл водой очищенной, проверяют pH (должно равняться 2) и трижды экстрагируют хлороформом порциями по 15,00 мл. Полученные хлороформные извлечения отделяют и в дальнейшем не исследуют. Водный слой подщелачивают 50% раствором натрия гидроксида до pH = 11 и трижды экстрагируют хлороформом порциями по 15,00 мл (при образовании стойких эмульсий применяют центрифугирование (в течение 5 мин. при 5000 об./мин.)). «Щелочные» хлороформные извлечения объединяют и фильтруют через бумажный фильтр («красная лента») с 1 г натрия сульфата безводного в мерную колбу емкостью 50,0 мл, доводят объем хлороформом до метки. Далее проводят исследование в двух вариантах:

1) 20,00 мл полученного хлороформного извлечения упаривают на водяной бане при температуре 80°C до полного удаления органического слоя. Сухой остаток растворяют в 10,00 мл 0,1 моль/л раствора кислоты хлористоводородной. После тщательного перемешивания измеряют оптическую плотность полученного раствора при длине волны 262 нм на спектрофотометре СФ-46 в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве компенсационного раствора используют 0,1 моль/л раствор кислоты хлористоводородной.

2) 20,00 мл полученного хлороформного извлечения упаривают на водяной бане при температуре 80°C до полного удаления органического слоя; сухой остаток растворяют в ~0,5 мл хлороформа и количественно наносят на линию старта хроматографической пластины «Sorbfil» ПТСХ-ПВ (пластины предварительно обрабатывают 0,1 моль/л раствором калия гидроксида в метаноле, а затем высушивают при 110°C в течение 30 мин.) полосой шириной 2 см. Рядом наносят 10 мкл стандартного хлороформного раствора доксиламина сукцината (концентрация 1 мг/мл) в точку ("свидетель"). Пластины дважды элюируют в хлороформе. После высушивания пластину элюируют в системе растворителей хлороформ – метанол (90:10), высушивают, проявляют полосу «свидетеля» реактивом Драгендорфа и наблюдают пятно коричневого цвета в зоне R_f 0,5 – 0,7. С помощью скальпеля напротив пятна

«свидетеля» с пластины тщательным образом снимают сорбент с площади 3 см × 1 см в стеклянный флакон. Во флакон добавляют 10,00 мл 0,1 моль/л раствора кислоты хлористоводородной и встряхивают в течение 5 мин., после чего фильтруют в мерную колбу емкостью 10,0 мл и доводят объем раствора через фильтр («красная лента») растворителем до метки. После тщательного перемешивания измеряют оптическую плотность полученного раствора при длине волны 262 нм на спектрофотометре СФ-46 в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве компенсационного раствора используют 0,1 моль/л раствор кислоты хлористоводородной.

Для построения калибровочного графика применяли нормализованные координаты (Гризодуб А. И. и др., 2004, 2006). При выборе аналитического диапазона методики исходили из значения минимальной зафиксированной токсической концентрации доксиламина в крови (Körpel et al., 1987) – 250 мкг/л. При этом за 100% принимали концентрацию, превышающую минимальную токсическую в 2 раза, – 500 мкг/л, а для построения графика выбрали значения 25, 50, 75, 100, 125, 150 и 175%, т. е. нижняя граница диапазона – концентрация, являющаяся в 2 раза меньшей чем минимальная токсическая (125 мкг/л). Для приготовления калибровочных образцов использовали пять различных источников модельной крови.

Результаты представлены в таблице.

Таблица

Метрологические характеристики линейных зависимостей, полученных при определении параметра «линейность» для УФ-спектрофотометрической методики количественного определения доксиламина в крови

Характеристика	Вариант 1				Вариант 2			
	35	21	25	15	35	21	25	15
m	35	21	25	15	35	21	25	15
v	33	19	23	13	33	19	23	13
\bar{x}	97,33	97,33	98,93	98,93	97,33	97,33	98,93	98,93
\bar{y}	87,65	86,19	88,84	87,94	96,55	94,75	98,07	96,96
a	10,12	11,10	10,09	11,65	1,308	2,518	1,328	3,256
b	0,797	0,771	0,796	0,771	0,979	0,948	0,978	0,947
s_a	2,079	2,654	2,432	3,264	2,567	3,291	3,004	4,039
s_b	0,019	0,024	0,021	0,029	0,024	0,030	0,026	0,036
$t(95\%, v)$	2,035	2,093	2,069	2,160	2,035	2,093	2,069	2,160
Δa	4,230	5,555	0,044	7,052	5,222	6,888	6,214	0,077
Δb	0,039	0,051	5,032	0,062	0,048	0,063	0,055	8,726
r	0,99070	0,99070	0,99179	0,99110	0,99061	0,99052	0,99170	0,99097
s_0	5,569	5,506	5,984	6,220	6,875	6,827	7,390	7,696
s_y	40,32	39,44	45,80	45,03	49,53	48,45	56,27	55,31
R_c	0,99042	0,99020	0,99143	0,99041	0,99032	0,99002	0,99134	0,99027

Приведенные в таблице данные наглядно показывают, что руководство SWGTOX выдвигает излишне строгие требования к количеству концентрационных уровней и повторов для каждого уровня и при некотором их уменьшении не происходит существенного изменения значений метрологических характеристик линейных зависимостей, при этом затраты времени снижаются как минимум вдвое (с ~36 ч до ~16 ч).

Таким образом, считаем целесообразным при последующих экспериментах выполнять построение калибровочной кривой для 5 концентрационных уровней и готовить для каждого уровня 3 раствора с использованием различных источников биологической матрицы.