

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

КЛИМЕНКО ЛІНА ЮРІЇВНА

УДК 615.9:543.054:543.062:543.422.3/.7:543.544

**КОМПЛЕКСНИЙ ПІДХІД
ДО РОЗРОБКИ ТА ВАЛІДАЦІЇ
МЕТОДИК КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АНАЛІТІВ
У БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ
В ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНОМУ АНАЛІЗІ**

15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора фармацевтичних наук

ХАРКІВ – 2016

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано на кафедрі аналітичної хімії Національного фармацевтичного університету Міністерства охорони здоров'я України.

Науковий консультант: доктор фармацевтичних наук, професор
ПЕТЮНІН Геннадій Павлович
Харківська медична академія післядипломної освіти,
завідуючий кафедрою клінічної біохімії,
судово-медичної токсикології та фармації

Офіційні опоненти: доктор хімічних наук, професор
ГРИЗОДУБ Олександр Іванович
ДП «Український науковий фармакопейний
центр якості лікарських засобів»,
директор, головний науковий співробітник
Відділу Державної Фармакопеї України,

доктор фармацевтичних наук, професор
ВЕТЮТНЕВА Наталія Олександрівна
Національна медична академія
післядипломної освіти імені П. Л. Шупика,
завідуюча кафедрою контролю якості і
стандартизації лікарських засобів

доктор фармацевтичних наук, професор
ВАСЮК Світлана Олександрівна
Запорізький державний медичний університет,
завідуюча кафедрою аналітичної хімії

Захист відбудеться «12» лютого 2016 р. о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.01 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Блюхера, 4).

Автореферат розіслано «11» січня 2016 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради, проф.

В. А. Георгіянець

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Сьогодні вже не викликає серйозних заперечень теза про необхідність валідації аналітичних методик, що використовують в хіміко-токсикологічному аналізі (ХТА). Незважаючи на явну відсутність економічного ефекту від введення валідації таких методик в обов'язковий статус, ця процедура, проте, неминуча, оскільки будь-яка аналітична методика, за допомогою якої вирішують офіційні завдання, має бути валідована; інакше не можна бути впевненим в коректності отриманих результатів.

Достовірність аналітичних результатів в судово-медичній і клінічній токсикології має величезне значення – недостовірні результати можуть призвести до невинуватених правових наслідків або неправильного лікування пацієнта. Так, наприклад, для аналітів, наявність яких в організмі допускається в терапевтичних концентраціях, факт виявлення та ідентифікації не може бути правильно інтерпретований без проведення кількісного аналізу, результатом якого в цьому випадку повинен стати висновок про попадання концентрації препарату в певний діапазон – відповідно терапевтичний, токсичний або летальний. Для аналітів, наявність яких в організмі не допускається, результати кількісного визначення не мають такого вирішального значення, проте виконувати його необхідно – для віднесення отруєнь до певного ступеня тяжкості та додаткового виключення псевдопозитивних результатів.

В Україні відсутні нормативні документи, що регламентують проведення валідації біоаналітичних методик для застосування в ХТА. Видано методичні рекомендації «Валідація біоаналітичного методу» (ДП «ДЕЦ МОЗ України») – адаптований переклад відповідного керівництва ЕМА (2011), що наводить лише загальні рекомендації щодо валідації біоаналітичних методик для проведення фармакокінетичних досліджень, у тому числі досліджень біодоступності та біоеквівалентності.

Єдиної позиції щодо порядку проведення валідації біоаналітичних методик взагалі і методик для застосування в ХТА зокрема в світі на сьогодні немає – аналіз нормативних документів показує відсутність єдиних назв і визначень термінів, єдиних процедур визначення і оцінки валідаційних параметрів тощо. Більш того, існуючі підходи до валідації біоаналітичних методик містять велику кількість ступенів свободи, що створює можливості для підгонки і маніпулювання даними та отримання фальсифікованих результатів. І головне, процедура валідації розглядається лише як завершальний етап розробки методики. Проте в ХТА валідація повинна відігравати більш вагому роль, а саме – стати механізмом розробки, модифікації та вдосконалення аналітичних методик, оптимізації окремих етапів і методик в цілому, проведення ж валідації в рамках єдиного стандартизованого поля дозволить також легітимізувати розроблену методику.

Шлях розв'язання окресленої проблеми полягає в площині створення стандартизованих процедур розробки та валідації аналітичних методик, застосовуваних в ХТА, з урахуванням їх особливостей, цілей та задач.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертацію виконано згідно з планом науково-дослідних робіт Національного фармацевтичного університету за темами «Хімічний синтез і аналіз біологічно-активних речовин, створення лікарських засобів синтетичного походження» (номер державної реєстрації 0103U000475) та «Хіміко-токсикологічний аналіз біологічно активних речовин та

лікарських засобів» (номер державної реєстрації 0114U000958) та проблемної комісії «Фармація» МОЗ та НАМН України.

Мета і задачі дослідження. Метою дослідження є розробка та обґрунтування комплексної методології валідації методик кількісного визначення аналітів у біологічних рідинах для застосування в ХТА як інструменту розробки, оптимізації та легітимізації таких методик з урахуванням їх специфіки.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі задачі:

- узагальнити інформацію щодо цілей, завдань та особливостей досліджень в ХТА, складнощів, що виникають у зв'язку з ними при виконанні аналітичних процедур, та провести критичний аналіз існуючих підходів до розробки і валідації біоаналітичних методик шляхом аналізу міжнародних нормативних документів і оригінальних наукових публікацій;
- теоретично обґрунтувати та експериментально підтвердити єдину поетапну схему проведення валідації як механізму розробки, оптимізації і модифікації методик для ХТА на прикладі кількісного визначення ряду азотовмісних сполук кислотного, основного та амфотерного характеру, що мають токсикологічне значення, в крові та сечі;
- сформулювати перелік валідаційних параметрів, що підлягають визначенню для методик кількісного визначення аналітів у біологічних рідинах в ХТА; теоретично обґрунтувати підходи до їх визначення та розрахувати критерії прийнятності; експериментально підтвердити коректність запропонованих процедур оцінки валідаційних характеристик;
- запропонувати підходи до прогнозу повної невизначеності методик кількісного визначення аналітів у біологічних рідинах в ХТА;
- теоретично та експериментально обґрунтувати можливість та особливості застосування методу стандарту (МС) та методу добавок (МД) для проведення кількісного визначення аналітів у біологічних рідинах;
- розробити стандартизовані процедури валідації біоаналітичних методик в ХТА у варіанті методу калібрувального графіка (МКГ), МС, МД та підтвердити їх експериментально шляхом застосування до розробки та оптимізації ряду методик кількісного визначення аналітів в біологічних рідинах;
- запропонувати уніфіковані форми протоколів валідації кількісних біоаналітичних методик у варіантах МКГ, МС і МД та розробити їх електронні версії;
- експериментально дослідити особливості застосування розроблених процедур валідації до методик з використанням хроматографічних, оптичних та електрохімічних методів аналізу на прикладі кількісного визначення зопіклону, 2-аміно-5-хлорпіридину (маркер зопіклону), кетотифену, доксиламіну, трамадолу, фенітоїну, каптоприлу, метронідазолу та метоклопраміду в крові та сечі;
- розробити, оптимізувати і модифікувати серію методик кількісного визначення ряду токсикологічно значущих азотовмісних сполук кислотного, основного та амфотерного характеру (зопіклон, 2-аміно-5-хлорпіридин, кетотифен, доксиламін, трамадол, фенітоїн, каптоприл, метронідазол, метоклопрамід) в крові та сечі із застосуванням запропонованих стандартизованих процедур валідації для ілюстрації порядку вибору найбільш прийнятних, оптимальних методик.

Об'єкт дослідження. Розробка та валідація методик кількісного визначення аналітів у біологічних рідинах.

Предмет дослідження. Теоретичне та експериментальне обґрунтування процедур валідації методик кількісного визначення аналітів у біологічних рідинах для цілей ХТА у варіанті МКГ, МС і МД з використанням хроматографічних, оптичних та електрохімічних методів аналізу на прикладі токсикологічно значущих азотовмісних сполук кислотного (фенітоїн, каптоприл), основного (зопіклон, 2-аміно-5-хлорпіридин, кетотифен, доксиламін, трамадол, метоклопрамід) та амфотерного (метронідазол) характеру.

Методи дослідження. При вирішенні поставлених у роботі задач було застосовано фізичні та фізико-хімічні методи аналізу – газорідинна хроматографія (ГРХ) з полум'яно-іонізаційною детекцією (ПД), високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) з УФ-, діодно-матричною (ДМД) та мас-спектрометричною (МС) детекцією, пряма та деривативна тонкошарова хроматографія (ТШХ), абсорбційна спектрофотометрія (СФ) в УФ- та видимій (ВИД-) області спектра, фотоколориметрія (ФК), екстракційна фотометрія (ЕФ), іонометрія; методи ізолювання речовин із біологічних рідин шляхом їх обробки депротейнізуючими агентами з подальшою рідинно-рідинною екстракцією органічними розчинниками, що не змішуються з водою, та шляхом обробки біологічних рідин амфіфільними розчинниками з подальшим відділенням органічного шару в умовах насичення водної фази електролітом. Планування експерименту та обробку отриманих результатів проводили хемометричними методами моделювання, аналізу та візуалізації багатомірних даних – методи валідації моделей, метод головних компонент, регресійний та кореляційний аналіз, методи аналізу *n*-модальних даних, градування, дискримінація тощо.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше теоретично та експериментально обґрунтовано загальну методологію розробки та валідації методик кількісного визначення аналітів у біологічних рідинах для цілей ХТА як оптимального механізму створення коректних та легітимних методик.

Базуючись на систематичному використанні принципу незначущості і з урахуванням особливостей аналітичних досліджень в ХТА вперше запропоновано порядок проведення валідації кількісних біоаналітичних методик: на двох рівнях – з використанням модельних розчинів (МР) і зразків матриці і в три етапи – попередній, основний і додатковий – та передбачено критерії для переходу від одного рівня/етапу до іншого.

Вперше проведено адаптацію переліку валідаційних параметрів, що підлягають визначенню в процесі проведення валідації методик кількісного визначення аналітів у біологічних рідинах в ХТА, до вимог ІСН; теоретично і експериментально обґрунтовано процедури визначення та критерії прийнятності цих параметрів, розраховано їх величини.

Вперше теоретично обґрунтовано та експериментально доведено умови та особливості застосування МС та МД для проведення кількісного визначення аналітів у біологічних рідинах.

На підставі запропонованих принципів та підходів вперше розроблено стандартизовані процедури валідації біоаналітичних методик в ХТА у варіанті МКГ (заявка на патент України на винахід № а 2015 09373 від 29. 09. 2015 р.), МС (заявка на патент України на винахід № а 2015 09397 від 30. 09. 2015 р.) та МД (заявка на патент

України на винахід № а 2015 09395 від 30. 09. 2015 р.). Сформовано оптимальний порядок проведення валідації таких методик одночасно у варіанті МКГ, МС та МД. Запропоновані стандартизовані процедури валідації експериментально підтверджено шляхом розробки методик кількісного визначення ряду токсикантів в крові та сечі.

Розроблено нові методики іонометричного визначення кетотифену та трамадолу в крові із застосуванням створених кетотифенселективного (патент України на корисну модель №96004; заявка на патент України на винахід № а 2014 08966 від 30. 09. 2015 р.) і трамадолселективного (деклараційний патент України на винахід №48652А) електродів та нову тандемну ЕФ/СФ-методику кількісного визначення зопіклону в біологічних рідинах (заявка на патент України на корисну модель № u 2015 09116 від 22. 09. 2015 р.).

Вперше запропоновано проводити очистку витягів з біологічних рідин методом деривативної ТШХ (заявка на патент України на корисну модель № u 2015 09112 від 22. 09. 2015 р.), що ґрунтується на використанні розробленого способу селективного виявлення аліфатичних амінів (патент України на винахід №89862).

Запропоновано нові способи пробопідготовки біологічних рідин для подальшого їх аналізу на вміст фенітоїну (патент України на корисну модель №96005) та зопіклон (заявка на патент України на корисну модель № u 2015 09398 від 30. 09. 2015 р.).

Практичне значення одержаних результатів. На основі комплексу проведених досліджень розроблено стандартизовані процедури проведення валідації методик кількісного визначення аналітів у біологічних рідинах в ХТА у варіантах методу калібрувального графіка, методу стандарту і методу добавок, які оформлено у вигляді методичних рекомендацій «Стандартизована процедура валідації методик кількісного визначення аналітів в біологічних рідинах у варіанті методу калібрувального графіка для застосування в аналітичній токсикології», «Стандартизована процедура валідації методик кількісного визначення аналітів в біологічних рідинах у варіанті методу стандарту для застосування в аналітичній токсикології», «Стандартизована процедура валідації методик кількісного визначення аналітів в біологічних рідинах у варіанті методу добавок для застосування в аналітичній токсикології».

Запропоновано стандартні форми протоколів валідації кількісних біоаналітичних методик у варіантах МКГ, МС і МД та розроблено їх електронні версії з використанням програмного забезпечення Microsoft Excel.

З використанням запропонованих стандартизованих процедур розроблено, модифіковано та оптимізовано методики кількісного визначення зопіклону, 2-аміно-5-хлорпіридину, кетотифену, доксиламіну, трамадолу, фенітоїну, каптоприлу, метронідазолу та метоклопраміду в крові та сечі з використанням методів ГРХ/ПД, ВЕРХ/УФ, ВЕРХ/ДМД/МС, УФ-СФ, ВИД-СФ, ФК, ЕФ, іонометрії та ряду процедур пробопідготовки. Зазначені методики знайшли своє відображення в методичних рекомендаціях «Кількісне визначення зопіклону в біологічних рідинах методом високоефективної рідинної хроматографії», «Кількісне визначення трамадолу в біологічних рідинах методом високоефективної рідинної хроматографії», «Кількісне визначення метоклопраміду в біологічних рідинах методом високоефективної рідинної хроматографії», «Тандемна УФ-спектрофотометрична/екстракційно-фотометрична методика кількісного визначення зопіклону в біологічних рідинах».

Методичні рекомендації рекомендовано до використання в практичній роботі відділень судово-медичної токсикології, клінічних лабораторій тощо.

Розроблені стандартизовані процедури валідації та методики кількісного визначення впроваджено в науково-педагогічний процес кафедри клінічної біохімії, судово-медичної токсикології та фармації Харківської медичної академії післядипломної освіти, кафедри токсикологічної хімії Національного фармацевтичного університету, кафедри неорганічної та токсикологічної хімії Запорізького державного медичного університету, кафедри токсикологічної та аналітичної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, кафедри хімії фармацевтичного факультету Івано-Франківського національного медичного університету, кафедри фармацевтичної хімії та фармакогнозії ДЗ «Луганський державний медичний університет», кафедри хімії Донецького національного медичного університету ім. М. Горького, в практику роботи відділень судово-медичної токсикології Житомирського, Запорізького, Миколаївського, Одеського, Рівненського, Черкаського, Херсонського та Харківського обласних бюро судово-медичної експертизи.

Особистий внесок здобувача. Автором особисто:

- проаналізовано нормативні документи і оригінальні наукові публікації в галузі валідації біоаналітичних методик, інформацію щодо існуючих підходів до розробки і валідації таких методик та особливостей досліджень в ХТА;
- теоретично обґрунтовано концепцію проведення валідації (етапність, перелік параметрів тощо) як механізму розробки і оптимізації методик кількісного визначення аналітів у біологічних рідинах;
- теоретично обґрунтовано та експериментально підтверджено підходи до визначення валідаційних параметрів і запропоновано критерії їх прийнятності;
- розроблено стандартизовані процедури валідації біоаналітичних методик у варіантах МКГ, МС, МД;
- сплановано експериментальні дослідження, що дозволяють обрати оптимальні умови проведення валідації, підтвердити коректність запропонованих стандартизованих процедур валідації і можливість їх використання.

У комплексних дослідженнях, проведених колективом співавторів публікацій, особисто дисертантом здійснено постановку цілей та задач досліджень, моделювання та планування усіх експериментальних робіт, наукове забезпечення розробки методик кількісного визначення зопіклону, 2-аміно-5-хлорпіридину, кетотифену, доксіламіну, трамадолу, фенітоїну, каптоприлу, метронідазолу та метоклопраміду в крові та сечі, складено плани валідації розроблених методик, проведено обробку, аналіз та візуалізацію отриманих експериментальних даних.

Особистий внесок дисертанта щодо публікацій у співавторстві, зазначено в тексті дисертаційної роботи та в авторефераті у списку опублікованих праць.

Дослідження методом ВЕРХ проведено на базі НВФ «Аналітика» (м. Харків, директор – В. Ф. Першин), ГРХ – на базі ТОВ «Дослідний завод» «ДНЦЛЗ» (м. Харків, директор – В. Б. Демьохін).

Апробація результатів дисертації. Основні результати та положення дисертаційної роботи викладено і обговорено на Всеукраїнському конгресі «Сьогодення та майбутнє фармації» (Харків, 2008), Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні проблеми судово-токсикологічної науки і практики» (Харків, 2009), VII Національному з'їзді фармацевтів України «Фармація України. Погляд у майбутнє» (Харків, 2010), Всеукраїнській науково-практичній конфе-

ренції «Діагностичні та організаційні питання щодо створення системи забезпечення якості клінічних лабораторних досліджень» (Київ, 2010), науково-практичній конференції завідувачів відділеннями судово-медичної токсикології «Організаційні та практичні питання судово-медичної токсикології» (Дніпропетровськ, 2011), III з'їзді токсикологів України «Сучасні проблеми токсикології. Безпека їжі та середовища життєдіяльності людини» (Київ, 2011), річній сесії Наукової Ради з проблеми «Аналітична хімія» НАН України (Гурзуф, 2012), науково-практичній конференції «Актуальні питання експериментальної, клінічної медицини та фармації» (Луганськ, 2012), XX та XXI Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Actual Questions of Development of New Drugs» (Харків, 2013, 2014), III Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Теоретичні та практичні підходи до вирішення сучасних питань фармацевтичної та медичної науки» (Луганськ, 2013), I та II науково-практичній конференції з міжнародною участю «Розбудова системи забезпечення якості клінічних лабораторних досліджень в Україні» (Київ, 2013, 2014), Національному конгресі «Клінічна фармація: 20 років в Україні» (Харків, 2013), VII, VIII та IX Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Управління якістю в фармації» (Харків, 2013, 2014, 2015), IV Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Аспекти розвитку фармацевтичних та медичних досліджень на сучасному етапі» (Луганськ, 2014), Всеросійській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Проблемы злоупотребления лекарственными препаратами и новыми психоактивными веществами» (Перм, 2014), Республіканській науково-практичній конференції (з міжнародною участю) «Интеграция образования, науки и производства в фармации» (Ташкент, 2014), Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Topical Issues of New Drugs Development» (Харків, 2015), Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Аналітична хімія у фармації» (Харків, 2015), Російській науково-практичній конференції студентів і молодих вчених «Актуальные вопросы современной фармацевтической науки» (Перм, 2015), дистанційній науково-практичній конференції студентів і молодих вчених «Инновации в медицине и фармации» (Мінськ, 2015), засіданні секції «Фізикохімія поверхності, кінетика і динаміка обменних процесів» Наукової Ради РАН з фізичної хімії та IV Всеросійському симпозиумі з міжнародною участю «Кінетика и динамика обменных процессов» (Сочі, 2015).

Публікації. Матеріали дисертаційної роботи опубліковано у 75 наукових роботах, серед яких 34 статті (31 стаття – у наукових фахових виданнях України та інших країн), 1 патент України на винахід, 1 деклараційний патент України на винахід, 2 патенти України на корисну модель, 10 методичних рекомендацій, 27 тез доповідей на науково-практичних конференціях різного рівня.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури (розділ 1), розділу, присвяченого обґрунтуванню вибору об'єктів дослідження та моделюванню експерименту (розділ 2), теоретичного (розділ 3) та експериментальних розділів (розділи 4 – 6), загальних висновків, списку використаних джерел та окремого тому додатків. Дисертацію викладено на 816 сторінках друкованого тексту (обсяг основного тексту 296 сторінок), ілюстровано 98 таблицями в основному тексті та 447 таблицями в додатках, 58 рисунками, 58 схемами. Перелік використаної літератури містить 398 джерел, серед яких 237 – іноземні.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Аналіз існуючих підходів до розробки та валідації методик для хіміко-токсикологічних досліджень (огляд літератури)

В огляді літератури узагальнено інформацію відносно цілей, завдань, особливостей досліджень в ХТА та їх етапності, виділено основні відмінності між фармацевтичним і токсикологічним аналізом, а також складнощі виконання аналітичних процедур, що виникають у зв'язку з цим.

Проведено критичний аналіз нормативних документів U.S. FDA (2001), EMA (2011), UNODC (2009) і SWGTOX (2013) та оригінальних наукових публікацій в області валідації біоаналітичних методик з акцентом на методики кількісного визначення аналітів у біологічних рідинах, в результаті чого нами сформовано узагальнену схему розробки та валідації таких методик – схема 1.

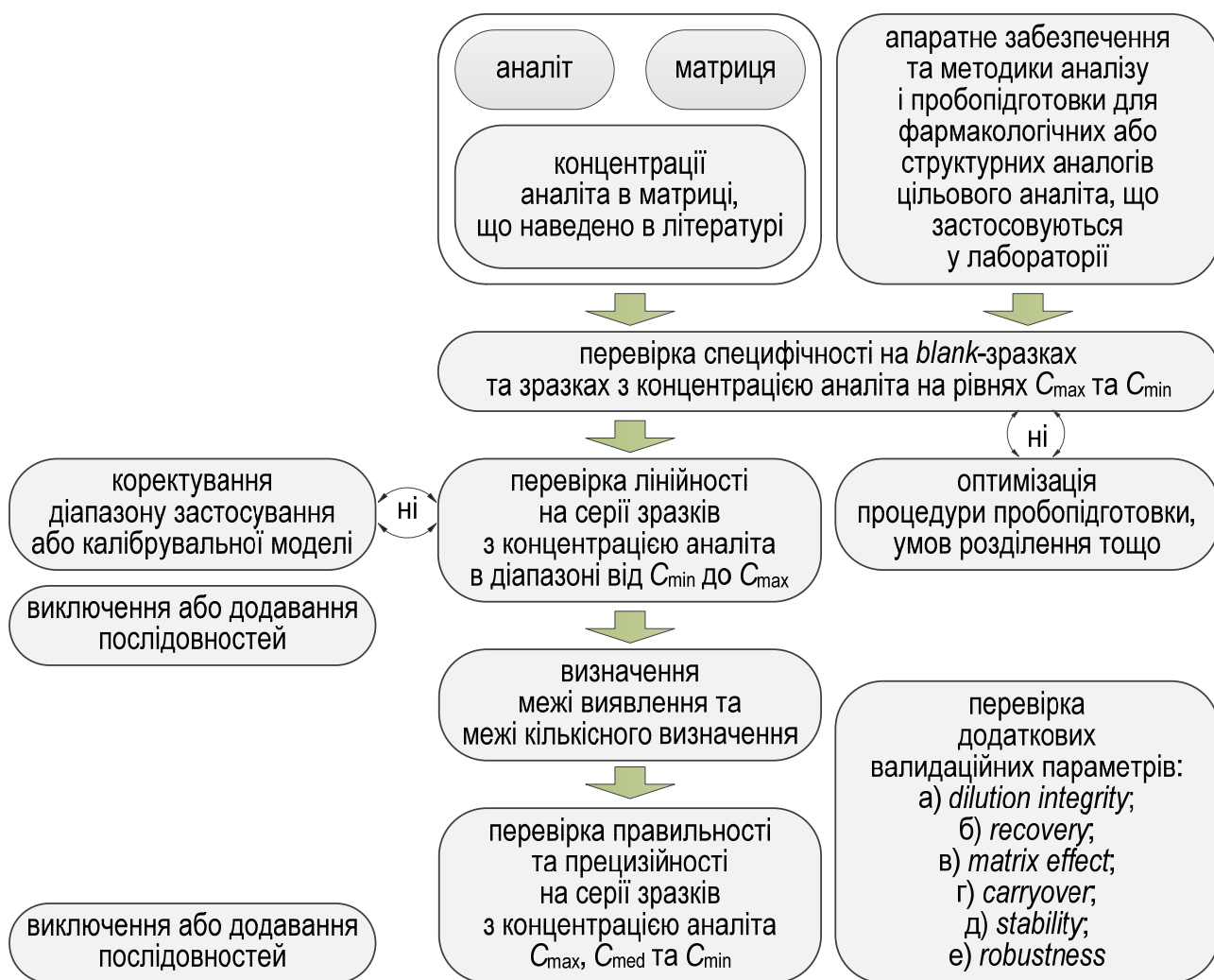


Схема 1. Процедура розробки та валідації методики кількісного визначення аналіта у біологічній рідині за даними нормативних документів та наукових публікацій (узагальнено автором)

Показано наявність істотних відмінностей і протиріч в текстах нормативних документів – в переліках валідаційних параметрів, визначенні термінів і понять, в процедурах визначення і оцінки прийнятності; відсутність етапності в процедурі валідації і її взаємозв'язку з процедурою розробки методики тощо.

Відзначено, що відсутність єдиної процедури валідації біоаналітичних методик в аналітичній токсикології, наявність великого числа ступенів свободи у застосовуваних підходах до валідації створює можливості для отримання недостовірних результатів аналізу.

Тому створення стандартизованих процедур валідації біоаналітичних методик в ХТА як інструменту розробки оптимальної методики аналізу, підтвердження її здатності давати правильні результати з необхідною точністю, тобто надання їй легітимного статусу, є актуальним та необхідним.

Обґрунтування вибору об'єктів дослідження та моделювання експерименту

Для експериментального підтвердження запропонованих процедур розробки та валідації методик кількісного визначення, призначених для застосування в ХТА, на підставі статистичних даних та аналітичних оглядів було підібрано ряд аналітів з групи речовин, що ізолюються з біологічного матеріалу полярними розчинниками, – азотовмісні сполуки основного (зопіклон, 2-аміно-5-хлорпіридин, доксиламін, кетотифен, трамадол, метоклопрамід), кислотного (каптоприл, фенітоїн) та амфотерного (метронідазол) характеру, що відображає узагальнену якісну структуру отруєнь токсикантами зазначеної класифікаційної групи; фізико-хімічні властивості та основні аналітичні характеристики зазначених речовин наведено в розділі 2.

На основі власних попередніх досліджень та аналізу спеціальних наукових публікацій для ілюстрації процедури вибору оптимальних методик кількісного визначення обраних аналітів в біологічних рідинах було змодельовано способи пробопідготовки крові та сечі в двох напрямках:

- 1) шляхом обробки біологічних рідин депротейнізуючими агентами з подальшою рідинно-рідинною екстракцією органічними розчинниками, що не змішуються з водою, відповідно до схеми 2 і табл. 1;
- 2) шляхом обробки біологічних рідин амфіфільними розчинниками з подальшим відділенням органічного шару в умовах насичення водної фази амонію сульфатом відповідно до схеми 3 і табл. 2.

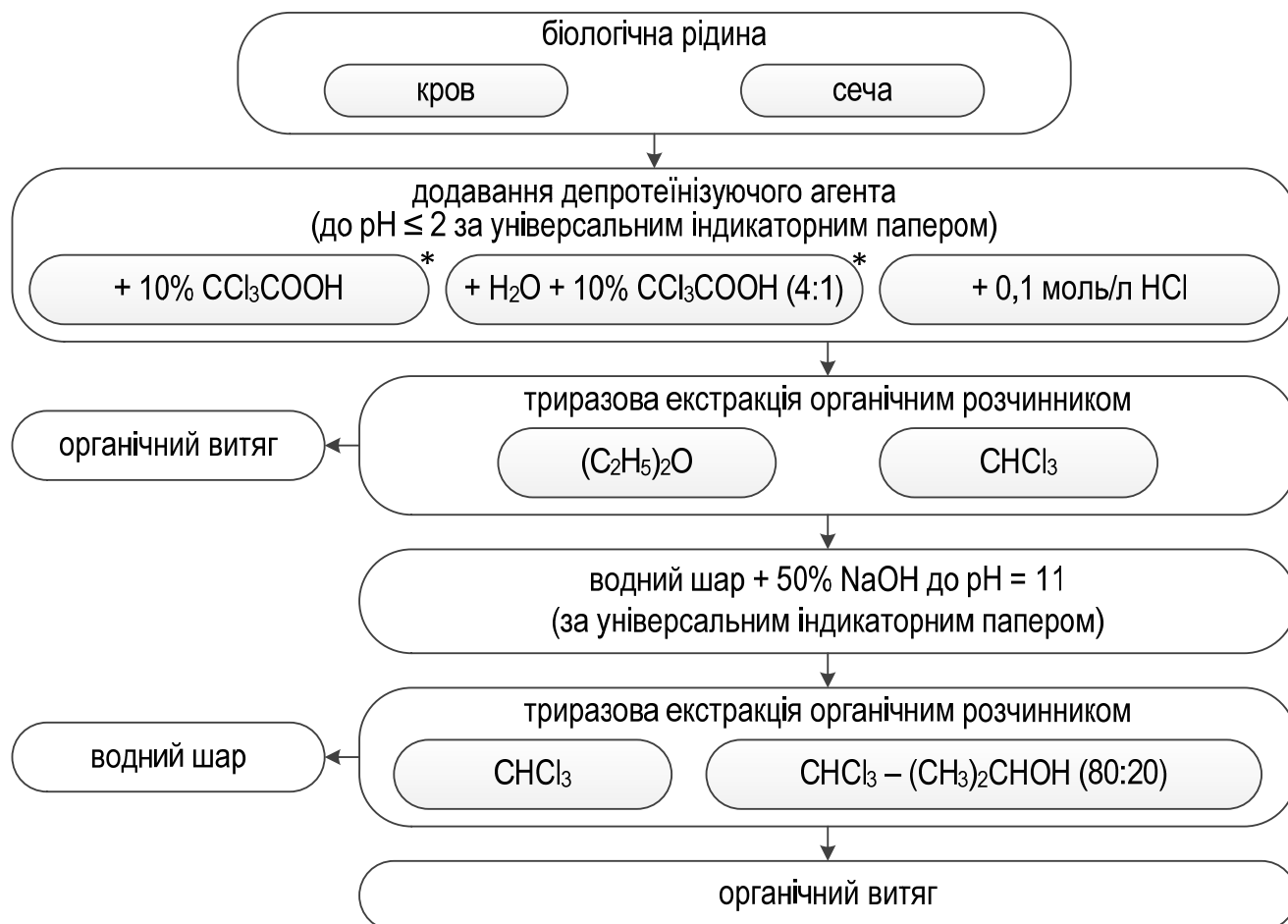
Таблиця 1

Методики пробопідготовки біологічних рідин шляхом обробки депротейнізуючими агентами з подальшою рідинно-рідинною екстракцією органічними розчинниками, що не змішуються з водою (напрямок 1)

Органічний розчинник (pH = 2)	Депротейнізуючий агент			Органічний розчинник (pH = 11)
	CCl ₃ COOH*	H ₂ O + CCl ₃ COOH*	HCl	
	шифр методики (A-B-C-D)**			
(C ₂ H ₅) ₂ O	1-1-1-1	1-2-1-1	1-3-1-1	CHCl ₃
CHCl ₃	1-1-2-1	1-2-2-1	1-3-2-1	CHCl ₃
CHCl ₃	1-1-2-2	1-2-2-2	1-3-2-2	CHCl ₃ – (CH ₃) ₂ CHOH (80:20)
CHCl ₃	—	—	1-3-2	—

* тільки для крові

** A – напрямок; B – депротейнізуючий агент; C – органічний розчинник 1; D – органічний розчинник 2



* тільки для крові

Схема 2. Основні етапи досліджуваних методик пробопідготовки біологічних рідин шляхом обробки депротейнізуючими агентами з подальшою рідинно-рідинною екстракцією органічними розчинниками, що не змішуються з водою (напрямок 1)

Таблиця 2

Методики пробопідготовки біологічних рідин шляхом обробки амфіфільними розчинниками з подальшим відділенням органічного шару в умовах насичення водної фази амонію сульфатом (напрямок 2)

Створення необхідного значення рН середовища	Амфіфільний розчинник			
	$(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$	CH_3OH	CH_3CN	$(\text{CH}_3)_2\text{CO}$
	шифр методики (A-E-F)*			
6 моль/л HCl до рН = 5	2-1-1	2-1-2	2-1-3	2-1-4
50% NaOH до рН = 11	2-2-1	2-2-2	2-2-3	2-2-4
0,1 моль/л HCl до рН = 2	2-3-1	2-3-2	2-3-3	2-3-4
без обробки	—	—	2-4-3	2-4-4

* A – напрямок; E – рН; F – амфіфільний розчинник

Кількісне визначення обраних аналітів в отриманих органічних витягах виконували за допомогою хроматографічних, оптичних та електрохімічних методів аналізу відповідно до табл. 3.

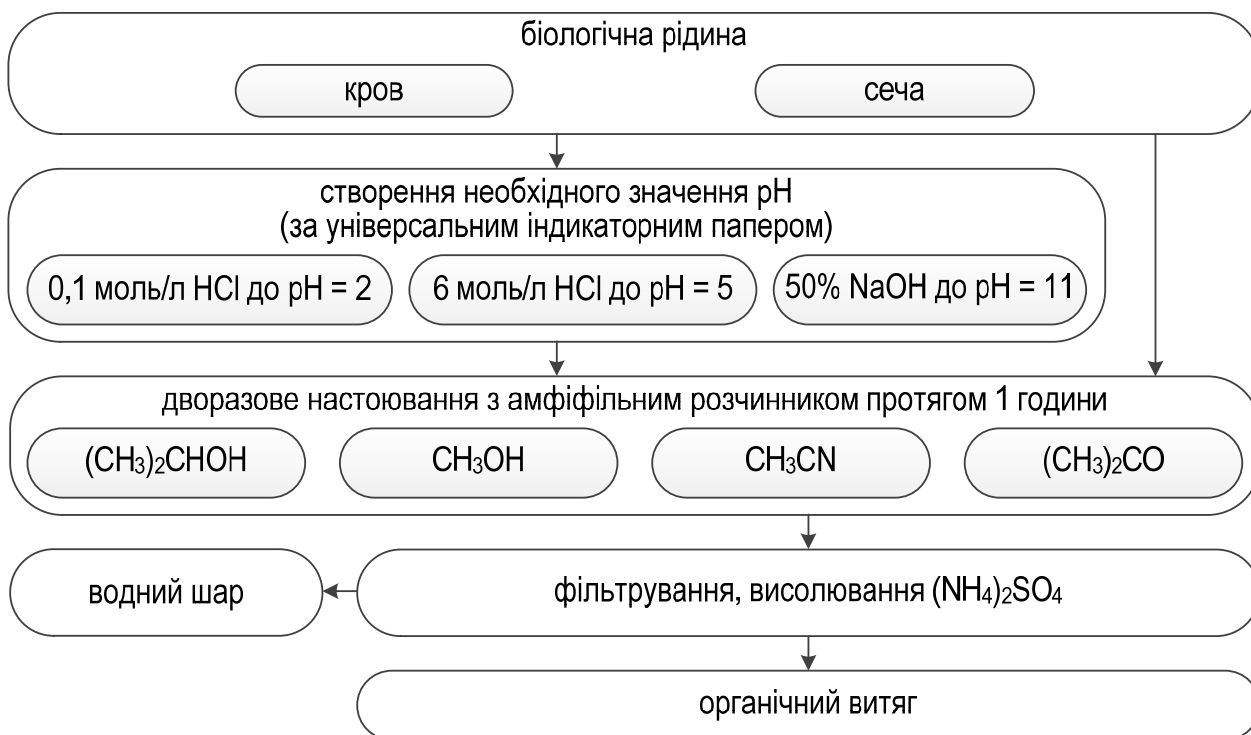


Схема 3. Основні етапи досліджуваних методик пробопідготовки біологічних рідин шляхом обробки амфіфільними розчинниками з подальшим відділенням органічного шару в умовах насичення водної фази амонію сульфатом (напрямок 2)

Таблиця 3

**Фізико-хімічні методи аналізу,
що використано для дослідження аналітів в біологічних рідинах**

Речовина	Методи аналізу				
	оптичні		хроматографічні		електрохімічні
зопіклон	УФ-СФ; 304 нм	ЕФ	—	ВЕРХ; 300 нм; ВЕРХ/ДМД/МС	—
	ЕФ/СФ; 304/540 нм				
2-аміно-5-хлорпіридин	УФ-СФ; 316 нм	—	—	ВЕРХ; 300 нм; ВЕРХ/ДМД/МС	—
доксиламін	УФ-СФ; 262 нм	ЕФ	—	ВЕРХ; 260 нм	—
кетотифен	УФ-СФ; 301 нм	ЕФ	—	ВЕРХ; 300 нм	іонометрія
трамадол	—	ЕФ	—	ВЕРХ; 280 нм	іонометрія
каптоприл	ВИД-СФ; 410 нм	—	—	—	—
фенітоїн	—	—	ГРХ/ПІД	ВЕРХ; 220 нм	—
метронідазол	УФ-СФ; 277 нм; 310 нм; 314 нм; 319 нм	—	—	—	—
метоклопрамід	—	—	—	ВЕРХ; 280 нм	—

Оптичні та електрохімічні методи аналізу застосовували після попередньої ТШХ-очистки і без такої; хроматографічні методи аналізу застосовували лише після попередньої твердофазної (ТФ) або ТШХ-очистки проб.

**Теоретичне обґрунтування та експериментальне підтвердження
підходів до визначення та оцінки валідаційних параметрів
для методик кількісного визначення аналітів
у біологічних рідинах в хіміко-токсикологічному аналізі**

З урахуванням результатів проведеного аналізу існуючої процедури розробки та валідації методик кількісного визначення аналітів в біологічних рідинах (див. схему 1), а також зауважень щодо проведення кожного з етапів валідації та оцінки валідаційних параметрів, що вивчаються, нами вироблено низку підходів, метою яких є оптимізація власне процесу розробки та модифікації методик кількісного визначення в ХТА шляхом створення єдиної стандартизованої процедури валідації таких методик.

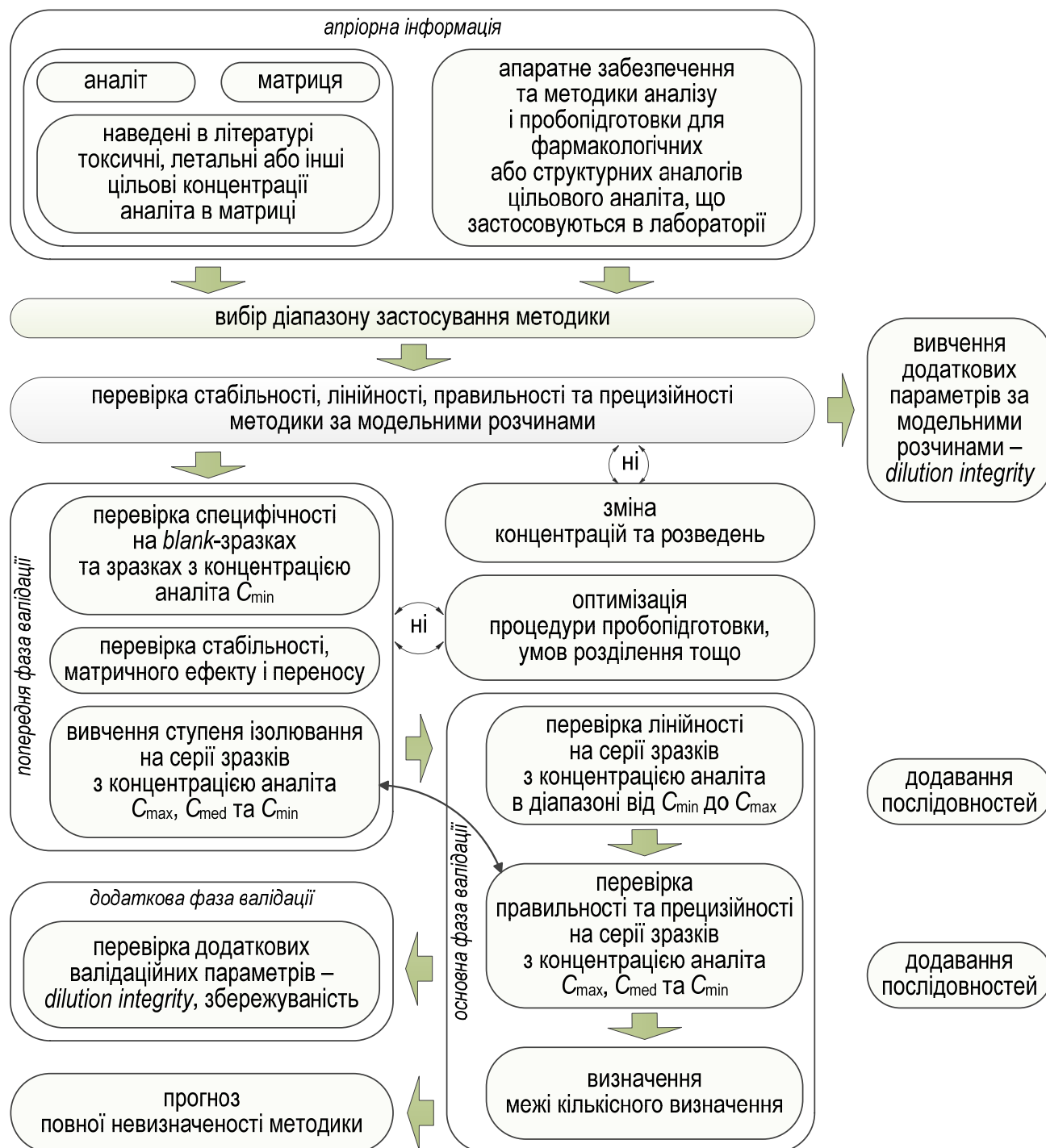
У загальному вигляді стандартизовану процедуру валідації, що пропонується нами, подано на схемі 4 (модифікована схема 1). Її ключовими позиціями є:

- визначення кожного валідаційного параметра в рамках єдиної процедури;
- наявність критеріїв прийнятності для валідаційних параметрів, що вивчаються, і критеріїв переходу від попередньої стадії валідації до наступної;
- аналіз апріорної інформації та вибір на її основі діапазону застосування методики як визначального чинника розробки методики;
- принципова оцінка придатності власне аналітичної процедури для подальшої роботи з біологічними рідинами шляхом виконання валідації методики з використанням МР;
- проведення попередньої фази валідації, в ході якої вивчають специфічність/селективність методики, стабільність аналіта в аналізованому розчині та ступінь ізолювання аналіта з матриці, для оцінки можливостей застосування процедури пробопідготовки, що пропонується;
- вивчення лінійності, правильності та прецизійності методики з використанням зразків матриці, а також визначення межі кількісного визначення (МКВ), під час проведення основної фази валідації;
- можливість проведення додаткової фази валідації, в ході якої вивчають можливість розведення проб аналіта та деякі розширені аспекти стабільності;
- обов'язковий прогноз сумарної невизначеності методики.

Для формування процедури визначення та оцінки прийнятності валідаційних параметрів при проведенні валідації методик кількісного визначення в ХТА ми спиралися на систематичне використання принципу незначущості та нормалізованих координат (перехід від рівняння виду $A_i(S_i) = b_1 \cdot C_i + a_1$ до рівняння виду $Y_i = b_2 \cdot X_i + a_2$), виходячи з величини максимально допустимої невизначеності методики Δ_{As} в аналітичній токсикології, що становить 25% для нижньої точки аналітичного діапазону застосування методики та 20% для усього іншого діапазону.

Для єдиного трактування пропонованих підходів до валідації методик в ХТА нами введено ряд необхідних термінів, понять і позначень.

Діапазон застосування. Попередній аналіз показав, що вимоги міжнародних керівництв до лінійності та правильності/прецизійності біоаналітичних методик не корелюють один з одним – шляхом розширення діапазону застосування методики і збільшення числа концентраційних рівнів g та аналітичних послідовностей k можна



Для обґрунтування діапазону застосування D методик в ХТА за 100% в нормалізованих координатах ми пропонуємо приймати певну цільову (наприклад, середню токсичну або летальну) концентрацію аналіта в біологічній рідині $C_{100\%}^{target}$ – залежно від того, для яких цілей і завдань призначено методик, що розробляється. При цьому необхідно мати на увазі, що діапазон токсичних і летальних концентрацій

аналіта в біологічних рідинах може бути досить широким, більше того, частіше фіксуються концентрації нижчі, ніж відповідні середні.

На першому етапі визначали D для найбільш «проблемних» методик – з використанням оптичних методів аналізу, застосування яких не може забезпечити можливість надійного кількісного визначення аналіта в діапазоні концентрацій, що відрізняються більше, ніж на порядок. Тому доцільно обирати D методики таким чином, щоб точка 100% знаходилася ближче до його верхньої межі, а оптична густина кінцевого розчину, що спектрофотометрують, яка відповідає цій точці, за ідеальних умов (нульові втрати і відсутність фонового поглинання) становила 0,7 – 0,9.

Нами також обґрунтовано мінімальне допустиме значення оптичної густини A_{\min} , виходячи з того, що оптична густина *blank*-проби A_{blank} має бути незначуща у порівнянні з A_{\min} , та враховуючи наявність кюветної різниці, що вносить систематичну похибку, яка має бути незначущою у порівнянні з максимально допустимою систематичною похибкою δ :

$$0,1 \leq A_{\min} \geq \frac{A_{\text{blank}}}{0,32}. \quad (1)$$

Враховуючи, що A_{blank} може сягати 0,1 і навіть вище, вимоги до A_{\min} , а також рекомендації міжнародних керівництв до g , що використовують для побудови калібрувальної кривої, як нижню межу діапазону застосування методики було обрано точку 25% в нормалізованих координатах.

У свою чергу верхню точку аналітичного діапазону методики запропоновано прийняти рівною 125% або – за бажанням аналітика – розширити його до 150% – 175% (у разі роботи з аналізованими зразками з більш високими концентраціями можна використовувати розведення проб для отримання значень оптичної густини, що знаходитимуться в діапазоні застосування методики).

Запропоновані діапазони застосування методики дозволили нам рівномірно розташувати всередині них концентраційні рівні з кроком 25% – таким чином $g = 5 - 7$, що відповідає міжнародним рекомендаціям. Використання постійного кроку 25% незалежно від обраного діапазону застосування дозволяє динамічно додавати або відкидати концентраційні рівні – відповідно до отримуваних експериментальних даних і поставлених цілей.

Нами теоретично доведено достатність запропонованої кількості концентраційних рівнів в обраних діапазонах застосування для забезпечення необхідної за вимогами UNODC відносної невизначеності методики (20 – 25%) та коефіцієнту кореляції лінійної залежності (0,99) – результати розрахунків наведено в табл. 4.

Незважаючи на те, що хроматографічні методики аналізу не мають такої жорсткої лімітуючої умови щодо роботи в широкому діапазоні концентрацій, ми не рекомендуємо розширювати діапазон їх застосування вище 175%, оскільки це призведе або до введення додаткових концентраційних рівнів і відповідного збільшення трудових і часових витрат на проведення власне валідації і, згодом, рутинного аналізу, або (при збереженні колишньої кількості концентраційних рівнів з іншим кроком) – до погіршення правильності і прецизійності методики поблизу нижньої межі кількісного визначення. Концентрацію аналіта, що відповідає точці 25% в нормалізованих координатах, запропоновано обирати таким чином, щоб вона забезпечувала співвідношення «сигнал/шум» не менше 10.

**Результати прогнозу Δ_{As}
для запропонованих діапазонів застосування методики**

D	шаг	g	RSD_{range}	RSD_0	$t(95\%; g-2)$	Δ_{cal}	Δ_{As}
25 – 125%	25%	5	39,53%	5,58%	2,3534	13,12%	18,56%
25 – 150%	25%	6	46,77%	6,60%	2,1318	14,07%	19,89%
25 – 175%	25%	7	54,01%	7,62%	2,0150	15,35%	21,71%

Специфічність/селективність. Для підтвердження специфічності/селективності оптичних методик кількісного визначення аналітів в біологічних рідинах нами запропоновано доводити, що відносна систематична похибка, яка вноситься компонентами *blank*-проби у визначення аналізованої речовини δ_{blank} (ендогенними компонентами матриці δ_{matrix} і процедурою пробопідготовки $\delta_{procedure}$), є незначущою у порівнянні з $\max \Delta_{As}$, тобто не перевищує $\max \delta$:

$$\delta_{blank} = \frac{A_{blank}}{A_{sample}} \cdot 100\% = \frac{A_{matrix} + A_{procedure}}{A_{sample}} \cdot 100\% = \delta_{matrix} + \delta_{procedure} \leq \max \delta = 0,32 \cdot \max \Delta_{As}. \quad (2)$$

Виконувати перевірку специфічності/селективності необхідно на концентраційних рівнях 25% та 50% – з цією метою аналізують відповідні модельні зразки (МЗ) (не менше 3 для кожного концентраційного рівня) та *blank*-зразки (не менше 5), приготовані з використанням різних джерел біологічної матриці, і отримують величини \bar{A}_{sample} та \bar{A}_{blank} відповідно.

Якщо $\delta_{blank} > \max \delta$, ми пропонуємо виконати аналіз *blank*-розчинів (не менше 3), отримати величину $\bar{A}_{procedure}$ і перевірити виконання умови

$$\delta_{procedure} = \frac{\bar{A}_{procedure}}{\bar{A}_{sample}} \cdot 100\% \leq 0,32 \cdot \delta_{blank}. \quad (3)$$

Невиконання умови (3) свідчить про неадекватний підбір процедури пробопідготовки і потребує її модифікації; у разі виконання наведеної умови можна використовувати середнє значення оптичної густини *blank*-зразка для коректування значень оптичної густини аналізованих розчинів.

Кількість аналізованих зразків k , *blank*-зразків n , а також *blank*-розчинів n , достатню для отримання надійних середніх значень \bar{A}_{sample} , \bar{A}_{blank} та $\bar{A}_{procedure}$, запропоновано визначати на підставі розрахунку RSD_{nom} по відношенню до введенного нами номінального значення оптичної густини A_{nom} . Як A_{nom} для визначення збіжності значень A_{blank} та $A_{procedure}$ рекомендовано використовувати A_{min} ; для $A_{sample} - A_{nom} = \bar{A}_{25\%}^{sample}$.

Для оцінки прийнятності значень RSD_{nom} нами запропоновано критерії, виходячи з того, що внесок похибки визначення значення \bar{A}_{blank} і $\bar{A}_{procedure}$ в сумарну невизначеність аналізу повинен бути незначущий, та виходячи з рівності відносної невизначеності збіжності значень оптичної густини МЗ, отриманих в паралельних дослідах, і відносної невизначеності побудови калібрувального графіка:

$$RSD_{nom}(blank, procedure) = \frac{s}{A_{nom}} \cdot 100\% \leq \frac{0,32 \cdot \max \Delta_{As} \cdot \sqrt{n}}{t(95\%; n-1)}; \quad (4)$$

$$RSD_{nom}(sample) = \frac{s}{A_{nom}} \cdot 100\% \leq \frac{0,707 \cdot \max \Delta_{As} \cdot \sqrt{k}}{t(95\%; k-1)}. \quad (5)$$

У табл. 5 наведено розраховані критичні значення $\max RSD_{nom}(blank)$ і $\max RSD_{nom}(sample)$ для різних кількостей виконуваних повторних експериментів.

Таблиця 5

**Критерії прийнятності збіжності значень відгуків
аналізованих і blank-зразків**

n/k	$\max RSD_{nom}(blank)$	$\max RSD_{nom}(sample)$	n/k	$\max RSD_{nom}(blank)$	$\max RSD_{nom}(sample)$
3	3,80%	8,39%	6	7,78%	17,19%
4	5,44%	12,02%	7	8,71%	19,25%
5	6,71%	14,83%	8	9,55%	21,11%

Таким чином, в ході проведення валідації необхідно виконати 3 повторних експерименти, розрахувати відповідне RSD_{nom} і, спираючись на його величину, прийняти отримане середнє значення або виконати додаткові повторні експерименти до досягнення прийнятності RSD_{nom} .

Оцінку специфічності/селективності хроматографічних методик кількісного визначення аналітів в біологічних рідинах ми пропонуємо проводити за фактом наявності/відсутності на хроматограмі досліджуваних компонентів, що заважають, (*blank*-зразки, *blank*-розчини, метаболіти, аналоги тощо) піків з часом утримування, що співпадає з часом утримування аналіта. Практика показала, що у разі аналізу витягів з біологічних об'єктів можливий невеликий зсув піка аналіта, тому оцінювати треба наявність піків в діапазоні $t_R \pm 0,5$ хв і перевіряти виконання такого критерію:

$$\delta_{blank} = \frac{\overline{S}_{t_R \pm 0,5 \times 8}^{\Sigma blank}}{\overline{S}_{25\%}^{sample}} \cdot 100\% \leq \max \delta = 0,32 \cdot \max \Delta_{As}. \quad (6)$$

Кількість зразків, достатню для отримання надійних значень $\overline{S}_{t_R \pm 0,5 \times 8}^{\Sigma blank}$ і \overline{S}^{sample} , нами рекомендовано визначати, як і у разі оптичних методів аналізу, шляхом розрахунку RSD_{nom} ($S_{nom} = \overline{S}_{25\%}^{sample}$). Вимоги до RSD_{nom} – див. табл. 5.

Для хроматографічних методів аналізу у рамках експерименту з вивчення специфічності/селективності ми рекомендуємо оцінити перенос (*carryover*) CO, виконавши хроматографування аналізованого розчину, отриманого для *blank*-зразка, після MP ~175%, – визначаємо величину $(S_{t_R \pm 0,5 \times 8}^{\Sigma blank})'$, порівнюємо із величиною $\overline{S}_{t_R \pm 0,5 \times 8}^{\Sigma blank}$ і оцінюємо її внесок у визначення цільового аналіта δ'_{blank} :

$$CO = \frac{|(S_{t_R \pm 0,5 \times 8}^{\Sigma blank})' - \overline{S}_{t_R \pm 0,5 \times 8}^{\Sigma blank}|}{S_{nom}} \cdot 100\% \leq \max RSD_{nom}(blank); \quad (7)$$

$$\delta'_{blank} = \frac{(S_{t_R \pm 0,5 \times 8}^{\Sigma blank})'}{\overline{S}_{25\%}^{sample}} \cdot 100\% \leq \max \delta = 0,32 \cdot \max \Delta_{As}. \quad (8)$$

Якщо умови (7) та (8) не виконуються, то необхідно передбачити проведення регенерації колонки після хроматографування зразків з високим вмістом аналіта – як в ході виконання валідації, так і в рутинній роботі.

За результатами експериментальної оцінки специфічності/селективності ряду методик аналізу зопіклону, 2-аміно-5-хлорпіридину, кетотифену, доксиламіну, трамадолу, фенітоїну, каптоприлу, метронідазолу та метоклопраміду в крові і сечі, необхідно зазначити, що оптичні методики без попередньої ТШХ-очистки в більшості випадків характеризуються значущим впливом компонентів *blank*-проби на результати аналізу, і тому вимагають проведення корекції величин оптичної густини аналізованих зразків на величину A_{blank} ; в той же час ті самі методики, але з виконанням ТШХ-очистки, у всіх випадках відповідають вимогам за параметром «специфічність/селективність». Хроматографічні методики в біологічних рідинах у всіх випадках відповідають вимогам за параметром «специфічність/селективність», при цьому чим більше значення довжини хвилі, за якої проводять детекцію аналіта, тим менше величина $\overline{S}_{t_R \pm 0,5 \text{ хв}}^{\Sigma blank}$, більш того, при $\lambda > 300 \text{ нм}$ на хроматограмах фактично відсутні піки з часом утримування в діапазоні $t_R \pm 0,5 \text{ хв}$.

На прикладі УФ-спектрофотометричних методик визначення метронідазолу в крові та сечі на рис. 1 наведено порівняльний аналіз експериментальних даних щодо вивчення специфічності/селективності шляхом конструювання полігональних проєкційних діаграм – така діаграма є n -кутною пірамідою, основа якої відображає область максимально допустимих значень (тобто критерій прийнятності) валідаційного параметра, а площини перерізу такої піраміди (зображено на діаграмах різними кольорами у вигляді прямокутних ізометричних проєкцій) є сукупними областями значень валідаційного параметра; розташування таких площин всередині піраміди говорить про прийнятність отриманих значень валідаційних параметрів, вихід площин за межі піраміди – про їх неприйнятність відповідно.

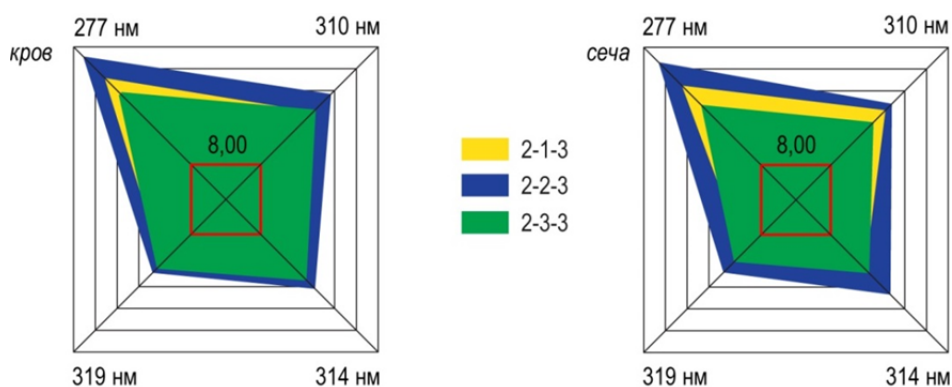


Рис. 1. Порівняльні результати оцінки специфічності УФ-СФ-методик (без ТШХ-очистки) кількісного визначення метронідазолу в крові та сечі

Нами розроблено методику виявлення аліфатичних амінів методом деривативної ТШХ, що ґрунтується на реакції з натрію гіпохлоритом, та запропоновано на її основі спосіб деривативної ТШХ-очистки витягів із біологічних рідин, що містять доксиламін, – дослідження специфічності/селективності УФ-спектрофотометричної методики 2-1-3 визначення доксиламіну в крові показали, що такий спосіб очистки дозволяє зменшити δ_{blank} до незначущої величини.

Ступінь ізолювання (*recovery*) – як її величина, так і відтворюваність та сталість в межах аналітичного діапазону методики – є критичним фактором для ухвалення рішення про те, чи слід взагалі продовжувати розробку цієї методики, оскільки часто ступінь ізолювання має низькі значення при малих кількостях аналіта в пробі і різко зростає зі збільшенням його концентрації; крім того, він може сильно змінюватися залежно від стану біологічної матриці (гниття, хронічні захворювання тощо).

Нами запропоновано декілька схем вивчення ступеня ізолювання, перевірено їх експериментально на прикладі УФ-СФ-методики 1-1-2-1 визначення доксиламіну в крові і на основі отриманих даних обрано таку процедуру: визначення ступеня ізолювання виконують одночасно з підтвердженням специфічності/селективності в точках 25% і 50%, а також додатково в точці 100%, а для $D = 25 - 150\%$ і $25 - 175\%$ – в точках 150% і 175% відповідно; кількість зразків k для кожного концентраційного рівня встановлюють виходячи з критерію (5); величину R розраховують за формулою:

$$R_i = \frac{A_i^{sample} - \bar{A}_{blank}}{A_i^{model}} \cdot \left(\frac{S_i^{sample}}{S_i^{model}} \right) \cdot 100\% , \quad (9)$$

* за умови значущості

де $A_i^{model}(S_i^{model})$ – аналітичний сигнал відповідного МР.

Експеримент з визначення ступеня ізолювання ми рекомендуємо виконувати в рамках різних послідовностей/днів за допомогою зразків, приготованих з використанням різних джерел біологічної матриці.

Для підтвердження прийнятності відтворюваності величини *recovery* ми пропонуємо використовувати в розрахунках увесь масив окремих експериментально отриманих значень (як k вибірок з однієї генеральної сукупності) та перевіряти виконання одночасно двох критеріїв:

- об'єднаний відносний довірчий інтервал $\Delta_{R,r}$ не повинен перевищувати $\max \Delta_{As}$:

$$\Delta_{R,r} = t(95\%; k \cdot n - 1) \cdot \sqrt{\frac{\sum (RSD_R^k)^2}{k}} \leq \max \Delta_{As} = 20,00\%; \quad (10)$$

- кутовий коефіцієнт лінійної залежності $R = b^R \cdot X + a^R$ повинен статистично незначуще відрізнятися від нуля за умови значущості вільного члена (в ідеальній ситуації лінійна залежність набирає вигляду $R = a^R$):

$$a^R > t(95\%; k \cdot n - 2) \cdot s_a^R; \quad b^R \leq t(95\%; k \cdot n - 2) \cdot s_b^R \quad (11)$$

Додатково треба оцінити власне величину R за таким критерієм:

$$|100 - \bar{R}| \leq \max \delta = 6,40\% . \quad (12)$$

При недотриманні вимог (10) та (11) необхідна модифікація процедури пробопідготовки; при виконанні умови (12) в подальших розрахунках можна не враховувати ступінь ізолювання, інакше – необхідно коректувати дані на величину R .

Для хроматографічних методів аналізу з МС-детекцією за тих самих умов перевіряють наявність матричного ефекту ME , проаналізувавши затравлені аналітом *blank*-екстракти:

$$ME_i = \left(\frac{S_{blank,i}^{model}}{S_i^{model}} - 1 \right) \cdot 100\% , \quad (13)$$

оцінюють його відтворюваність та значущість:

$$\Delta_{ME,r} = t(95\%; k \cdot n - 1) \cdot \sqrt{\frac{\sum (RSD_{ME}^k)^2}{k}} \leq \max \Delta_{As} = 20,00\%; \quad \overline{ME} \leq \max \delta = 6,40\%. \quad (14)$$

Вивчення ступеня ізолювання дозволяє визначити критичні стадії процедури пробопідготовки. На рис. 2 на прикладі розробленої нами УФ-СФ-методики 1-1-2-1 визначення доксиламіну в крові наведено отримані нами експериментальні дані щодо відносного внеску кожної стадії пробопідготовки у втрати цільового аналіта $L_{analyte}$, які показують, що $\sim 70\%$ загальних втрат аналіта припадає на втрати за рахунок впливу біологічної матриці L_{matrix} , операційні ж втрати $L_{procedure}$ є незначущими ($L_{procedure} \leq 0,32 \cdot L_{analyte}$), а $\sim 85\%$ L_{matrix} забезпечують перші дві стадії процедури пробопідготовки – обробка депротейнізуючим агентом і подальше центрифугування.

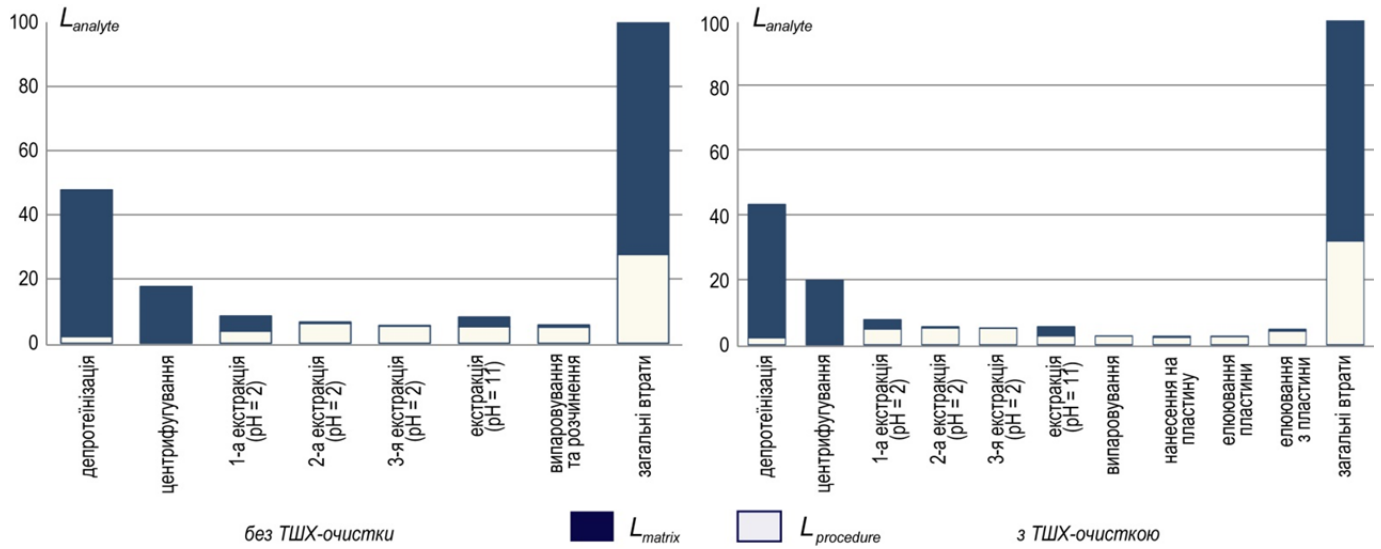


Рис. 2. Внесок стадій пробопідготовки УФ-СФ-методики 1-1-2-1 визначення доксиламіну в крові у втрати цільового аналіта

Лінійність/калібрувальна модель. З урахуванням запропонованої загальної концепції проведення валідації в ХТА та діапазону застосування, на основі власних попередніх досліджень декількох схем виконання експерименту обґрунтовано процедуру підтвердження лінійності, що складається з двох етапів. Загальні положення:

- використання нормалізованих координат;
- за 100% в нормалізованих координатах приймають цільову концентрацію аналіта в біологічній рідині $C_{100\%}^{target}$ (наприклад, середню токсичну або летальну);
- $g = 5, 6$ або 7 (залежно від обраного D) з постійним кроком 25%;
- для нормалізації експериментальних даних використовують розчин порівняння з концентрацією аналіта $C_{reference}^{model} = C_{100\%}^{model}$.

Етап 1. Перевірка лінійності за МР:

- вираження для нормалізованих координат:

$$X_{i, fact}^{model} = \frac{C_i^{model}}{C_{reference}^{model}} \cdot 100\%; \quad Y_i^{model} = \frac{A_i^{model}}{A_{reference}^{model}} \left(\frac{S_i^{model}}{S_{reference}^{model}} \right) \cdot 100\%; \quad (15)$$

- розраховують параметри a^{model} , s_a^{model} , b^{model} , s_b^{model} , RSD_0^{model} , R_c^{model} для лінійної залежності $Y^{model} = a^{model} + b^{model} \cdot X^{model}$;

- критерії прийнятності розраховано в рамках двох запропонованих підходів:
Підхід 1 – невизначеність процедури пробопідготовки дорівнює невизначеності кількісного визначення аналіта в МР Δ_{As}^{model} , звідки

$$\begin{aligned} \max \Delta_{As}^{model} &= \max \Delta_{As} / \sqrt{2} = 0,707 \cdot \max \Delta_{As} = 0,707 \cdot 20,00\% = 14,14\%; \\ \max \Delta_{cal}^{model} &= \max \Delta_{sample}^{model} = \max \Delta_{As}^{model} / \sqrt{2} = 0,707 \cdot \max \Delta_{As}^{model} = 0,707 \cdot 14,14\% = 10,00\%; \end{aligned} \quad (16)$$

Підхід 2 – Δ_{As}^{model} незначуща в порівнянні з Δ_{As} , звідки

$$\begin{aligned} \max \Delta_{As}^{model} &= 0,32 \cdot \max \Delta_{As} = 0,32 \cdot 20,00\% = 6,40\%; \\ \max \Delta_{cal}^{model} &= \max \Delta_{sample}^{model} = \max \Delta_{As}^{model} / \sqrt{2} = 0,707 \cdot \max \Delta_{As}^{model} = 0,707 \cdot 6,40\% = 4,52\%; \end{aligned} \quad (17)$$

- вимоги до залишкового стандартного відхилення RSD_0^{model} і коефіцієнта кореляції R_c^{model} для різних діапазонів застосування методики в рамках двох підходів наведено в табл. 6.

Таблиця 6

Критичні значення параметрів лінійної залежності $Y^{model} = a^{model} + b^{model} \cdot X^{model}$ для запропонованих діапазонів застосування методики

Діапазон (g)	<i>Підхід 1</i>		<i>Підхід 2</i>	
	$\max RSD_0^{model}$	$\min R_c^{model}$	$\max RSD_0^{model}$	$\min R_c^{model}$
$D = 25 - 125\% (g = 5)$	4,25	0,9942	1,92	0,9988
$D = 25 - 150\% (g = 6)$	4,69	0,9950	2,12	0,9990
$D = 25 - 175\% (g = 7)$	4,96	0,9958	2,25	0,9991

Етап 2. Перевірка лінійності за калібрувальними зразками (КЗ):

- вираження для нормалізованих координат (концентрацію розчину порівняння перераховують з урахуванням коефіцієнта розведення K , а відгук коректують на величину ступеня ізолювання \bar{R}):

$$\begin{aligned} X_{i, fact} &= \frac{C_i^{calibrator}}{C_{reference}} \cdot 100\%; \quad C_{reference} = C_{reference}^{model} \cdot K; \\ Y_i &= \frac{A_i^{calibrator}}{A_{reference}} \left(\frac{S_i^{calibrator}}{S_{reference}} \right) \cdot 100\%; \quad A_{reference}(S_{reference}) = \frac{A_{reference}^{model}(S_{reference}^{model}) \cdot \bar{R}}{100}. \end{aligned} \quad (18)$$

- аналіз калібрувальних зразків 1 – 7 в рамках трьох послідовностей ($k = 3$); одна послідовність – одне джерело біологічної матриці; збіжність величин $A_i^{calibrator}(S_i^{calibrator})$ оцінюють за критерієм (5) – у разі невиконання збільшують k ;
- розраховують параметри $a^k, s_a^k, b^k, s_b^k, RSD_0^k, R_c^k$ для лінійних залежностей $Y^k = a^k + b^k \cdot X^k$ в рамках кожної k -послідовності (*within-run* лінійність) та $a, s_a, b, s_b, RSD_0, R_c$ – для лінійної залежності $Y = a + b \cdot X$ за середніми значеннями (*between-run* лінійність);
- критерії прийнятності лінійної залежності встановлено виходячи з положення про рівність невизначеності побудови калібрувального графіка Δ_{cal} та невизначеності аналізу досліджуваного зразка Δ_{sample} , звідки:

$$\max \Delta_{cal} = \max \Delta_{sample} = \frac{\max \Delta_{As}}{\sqrt{2}} = 0,707 \cdot \max \Delta_{As} = 0,707 \cdot 20,00\% = 14,14\%; \quad (19)$$

- вимоги до залишкового стандартного відхилення RSD_0 і коефіцієнта кореляції R_c для різних діапазонів застосування методики наведено в табл. 7.

**Критичні значення параметрів лінійної залежності виду $Y = a + b \cdot X$
для запропонованих діапазонів застосування методики**

Параметр	Діапазон (g)		
	$D = 25 - 125\% (g = 5)$	$D = 25 - 150\% (g = 6)$	$D = 25 - 175\% (g = 7)$
$\max RSD_0 / \max RSD_0^k$	7,02	6,63	6,01
$\min R_c / \min R_c$	0,9915	0,9899	0,9884

Запропоновану схему вивчення лінійності застосовано нами до серії методик визначення трамадолу та кетотифену у крові та сечі, у тому числі і до прямих іонометричних методик з використанням створених нами нових мембран твердоконтактних іоноселективних електродів (електродоактивні речовини – асоціати трамадолу та кетотифену з гетерополіаніонами структури Кеггіна) – на рис 3 наведено порівняльний аналіз величин RSD_0 для досліджених методик у вигляді полігональних проєкційних діаграм – методики задовольняють заявленим вимогам.

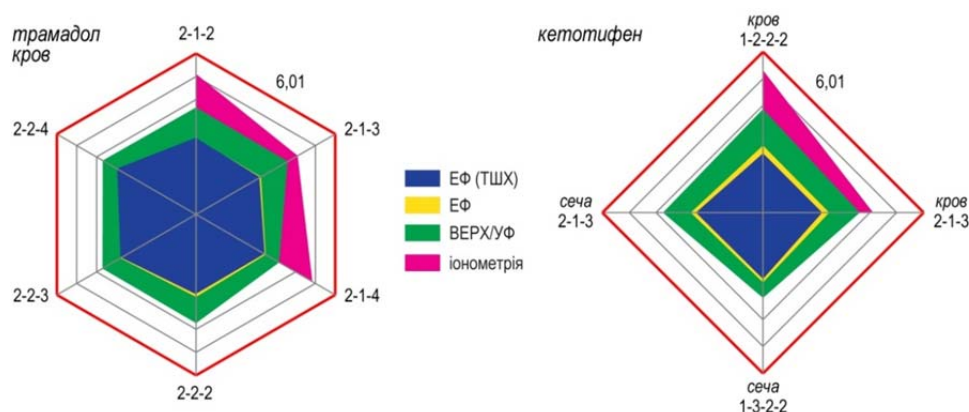


Рис. 3. Оцінка лінійності методик визначення трамадолу в крові

Правильність та прецизійність. Нами запропоновано декілька схем підтвердження правильності та прецизійності біоаналітичних методик в ХТА, перевірено їх експериментально на прикладі УФ-СФ-методики 1-1-2-1 визначення доксиламіну в крові і на основі отриманих даних обрано процедуру, що складається з двох етапів:

Етап 1. Перевірка правильності та прецизійності за МР – згідно схеми 5.

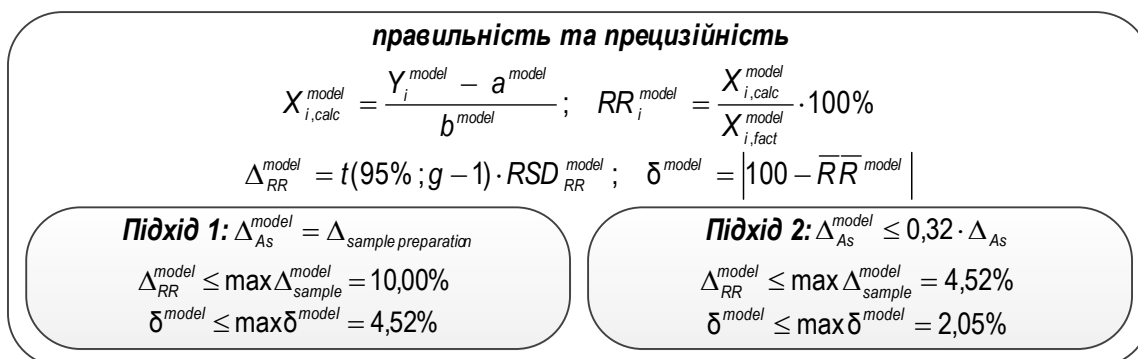


Схема 5. Оцінка правильності та прецизійності методик кількісного визначення аналітів за МР

Критерії прийнятності розраховано в рамках наведених вище *Підходу 1* та *Підходу 2* – $\max \delta^{model} = 0,32 \cdot \max \Delta_{As}^{model}$.

Етап 2. Перевірка правильності та прецизійності за КЗ та МЗ (схема 6) – випробування ми пропонуємо проводити на двох рівнях – *within-run* і *between-run*. У разі прецизійності *within-run* відповідає терміну «збіжність», а *between-run* може характеризувати внутрішньолабораторну прецизійність та відтворюваність – залежно від умов виконання експерименту.

прецизійність та правильність	<p><i>within-run</i> прецизійність (збіжність) та правильність</p> $X_{i,calc}^k = \frac{Y_i^k - a^k}{b^k}; RR_i^k = \frac{X_{i,calc}^k}{X_{i,fact}^k} \cdot 100\%$ $\Delta_{RR}^k = t(95\%; g - 1) \cdot RSD_{RR}^k \leq \max \Delta_{sample} = 14,14\%; \delta^k = 100 - \overline{RR}^k \leq \max \delta = 6,40\%$
	<p><i>between-run</i> (внутрішньолабораторна) прецизійність та правильність (за калібрувальними зразками)</p> $X_{i,calc} = \frac{Y_i^k - a}{b}; RR_i = \frac{X_{i,calc}}{X_{i,fact}} \cdot 100\%; \overline{RR}^{intra} = \frac{\sum RR_i}{k \cdot g}; RSD_{RR}^{intra} = \sqrt{\frac{\sum RSD_{RR,k}^2}{k}}$ $\Delta_{RR}^{intra} = t(95\%; k \cdot g - 1) \cdot RSD_{RR}^{intra} \leq \max \Delta_{sample} = 14,14\%; \delta^{intra} = 100 - \overline{RR}^{intra} \leq \max \delta = 6,40\%$
	<p><i>between-run</i> (внутрішньолабораторна) прецизійність та правильність (за модельними зразками)</p> $X_{i,fact}^{sample} = \frac{C_i^{sample}}{C_{reference}} \cdot 100\%; Y_i^{sample} = \frac{A_i^{sample} (S_i^{sample})}{A_{reference} (S_{reference})} \cdot 100\%; X_{i,calc}^{sample} = \frac{Y_i^{sample} - a}{b}$ $RR_i^{sample} = \frac{X_{i,calc}^{sample}}{X_{i,fact}^{sample}} \cdot 100\%; \overline{RR}^{sample} = \frac{\sum RR_i^{sample}}{k \cdot n}; RSD_{RR}^{sample} = \sqrt{\frac{\sum (RSD_{RR,k}^{sample})^2}{k}}$ $\Delta_{RR}^{sample} = t(95\%; k \cdot n - 1) \cdot RSD_{RR}^{sample} \leq \max \Delta_{As} = 20,00\%; \delta^{sample} = 100 - \overline{RR}^{sample} \leq \max \delta = 6,40\%$

Схема 6. Оцінка правильності та прецизійності методик кількісного визначення аналітів у біологічних рідинах в ХТА (за КЗ та МЗ)

Фактично експеримент з перевірки *within-run* правильності та прецизійності методики характеризує таку реальну ситуацію в рутинному аналізі для ХТА: експерт, отримавши завдання виконати експертизу на аналіт, що рідко зустрічається в практиці, буде протягом одного дня калібрувальний графік (одна послідовність) і за ним проводить розрахунок результату для аналізованого зразка.

Підтвердження *between-run* прецизійності та правильності проводять:

- за КЗ одночасно з визначенням *between-run* лінійності;
- за МЗ, проаналізованими в ході попередньої фази валідації (розподіл точок для різних діапазонів застосування – такий самий як для визначення ступеня ізолювання).

Експеримент з перевірки *between-run* правильності та прецизійності покликаний охарактеризувати таку реальну ситуацію в рутинному аналізі для ХТА: експерт регулярно аналізує біологічні рідини на вміст аналіта, що часто зустрічається в практиці, тому буде калібрувальний графік за результатами трьох або більше послідовностей, і за ним проводить розрахунок результатів для аналізованих зразків впродовж певного періоду часу (1 тиждень і більше).

Вимоги до Δ_{RR}^{sample} ($\leq 20,00\%$) запропоновано зробити більш ліберальними порівняно з Δ_{RR}^k і Δ_{RR}^{intra} ($\leq 14,14\%$), оскільки Δ_{RR}^{sample} відображає сумарну похибку – і за рахунок зміни матриці, і за рахунок різної кількості аналіта в пробі, і похибку визначення параметрів лінійної залежності тощо.

На попередньому етапі нами було підібрано умови спектрофотометричного визначення каптоприлу за реакцією з реактивом Еллмана – на рис. 4а наведено результати вивчення правильності та прецизійності методик визначення каптоприлу в крові за цих умов у відповідності до запропонованої схеми. На рис. 4б наведено порівняльний аналіз експериментальних даних вивчення правильності та прецизійності на прикладі методик визначення фенітоїну в крові із застосуванням розроблених нами способів пробопідготовки біологічних рідин.

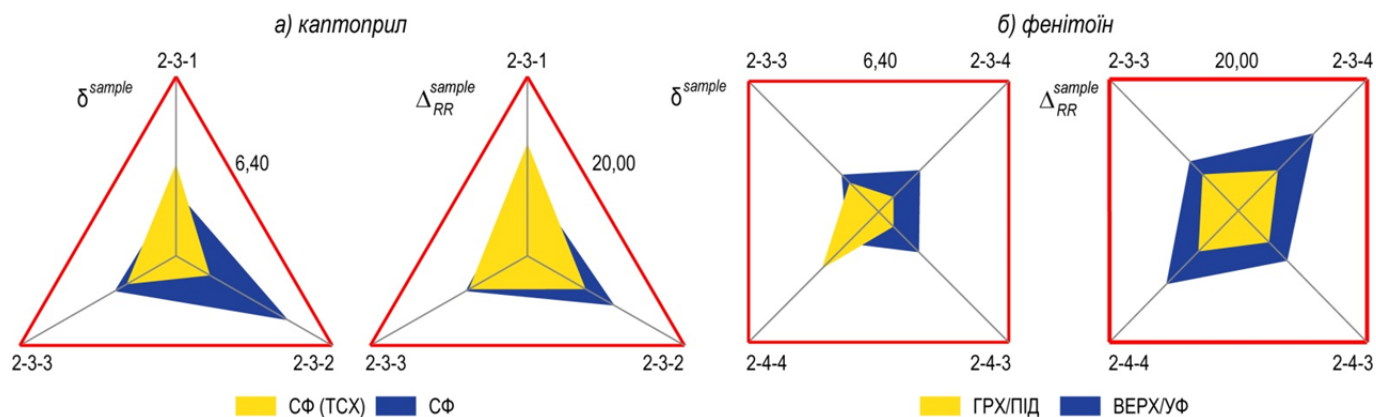


Рис. 4. Результати перевірки правильності та прецизійності методик визначення каптоприлу та фенітоїну в крові

Межа кількісного визначення. Як оптимальну обрано комплексну оцінку МКВ як нижньої точки на калібрувальному графіку, координати якої можуть бути виміряні з прийнятною прецизійністю та правильністю, при цьому нижню точку калібрувального графіка задають від початку (*decision point concentration*) – на підставі вимірювання аналітичного сигналу *blank*-зразка і $C_{100\%}^{target}$. З урахуванням запропонованих підходів до визначення мінімальної допустимої величини аналітичного сигналу, визначення МКВ як нижньої точки калібрувального графіка також враховує вимоги до мінімального співвідношення «сигнал/шум».

Dilution integrity. Параметр *dilution integrity* незаслужено обділено увагою в керівництвах з валідації біоаналітичних методик – можливість розведення зразків дозволяє звужувати діапазон застосування методики і застосовувати для калібрування більш просту модель та отримувати кращі показники лінійності, правильності та прецизійності; розробляти методику для області низьких концентрацій і використовувати її як універсальну – і для цілей клінічної токсикології, і для цілей посмертної токсикології, а в деяких випадках і для роботи з терапевтичними концентраціями.

Для розробки процедури визначення і оцінки *dilution integrity* нами виконано модельний експеримент за схемою 7.

На прикладі УФ-СФ-методики 1-1-2-1 визначення доксиламіну в крові показано, що усі три схеми виконання дають задовільні результати. Найбільш репрезентативним є *Варіант 2*, але його використання вимагає виконання великої кількості експериментів, *Варіант 1* має істотний недолік – дозволяє оцінити прецизійність та правильність лише в межах 100%, тому виконувати рутинний аналіз в такому варіанті потрібно з ретельним підбором розведення. Оптимальним є виконання експерименту у *Варіанті 3* – необхідно проаналізувати 3 зразки, при цьому процедура дозволяє оцінити прецизійність та правильність у рамках усього діапазону застосування методики.

Варіант 1

модельні зразки $C_i^{\text{sample DI}} \cong 200\%, 500\%, 1000\% \rightarrow A_i^{\text{sample DI}}(S_i^{\text{sample DI}})$
 $k = 3; P_i = 1/2, 1/5, 1/10$ відповідно

Варіант 2

модельні зразки $C_i^{\text{sample DI}} \cong 250\%, 500\%, 1000\%, 1500\%, 1750\% \rightarrow A_i^{\text{sample DI}}(S_i^{\text{sample DI}})$
 $k = 1; P = 1/10$

модельні зразки $C_i^{\text{sample DI}} \cong 50\%, 100\%, 200\%, 300\%, 350\% \rightarrow A_i^{\text{sample DI}}(S_i^{\text{sample DI}})$
 $k = 1; P = 1/2$

модельні зразки $C_i^{\text{sample DI}} \cong 125\%, 250\%, 500\%, 750\%, 875\% \rightarrow A_i^{\text{sample DI}}(S_i^{\text{sample DI}})$
 $k = 1; P = 1/5$

Варіант 3

модельні зразки $C^{\text{sample DI}} \cong 350\% \rightarrow A_i^{\text{sample DI}}(S_i^{\text{sample DI}})$

$D = 25 - 175\%; g = 7$
 $n = 4, k = 3$
 $P_i = 1/10, 2/10, 3/10, 5/10$

$D = 25 - 150\%; g = 6$
 $n = 4, k = 3$
 $P_i = 1/10, 2/10, 3/10, 4/10$

$D = 25 - 125\%; g = 5$
 $n = 3, k = 3$
 $P_i = 1/10, 2/10, 3/10$

$$X_{i,\text{fact}}^{\text{DI}} = \frac{C_i^{\text{sample DI}}}{C_{\text{reference}}} \cdot 100\%; Y_i^{\text{DI}} = \frac{A_i^{\text{sample DI}}}{A_{\text{reference}}} \left(\frac{S_i^{\text{sample DI}}}{S_{\text{reference}}} \right) \cdot 100\%$$

$$X_{i,\text{calc}}^{\text{DI}} = \frac{Y_i^{\text{DI}} - a^{\text{model}}}{b^{\text{model}} \cdot P_i}; RR_i^{\text{DI}} = \frac{X_{i,\text{calc}}^{\text{DI}}}{X_{i,\text{fact}}^{\text{DI}}} \cdot 100\%; \overline{RR}^{\text{DI}} = \frac{\sum RR_i^{\text{DI}}}{k \cdot n}; RSD_{RR}^{\text{DI}} = \sqrt{\frac{\sum (RSD_{RR,k}^{\text{DI}})^2}{k}}$$

$$\Delta_{RR}^{\text{DI}} = t(95\%; k \cdot n - 1) \cdot RSD_{RR}^{\text{DI}} \leq \max \Delta_{\text{sample}} = 14,14\%; \delta^{\text{DI}} = |100 - \overline{RR}^{\text{DI}}| \leq \max \delta = 6,40\%$$

Схема 7. Модельний експеримент для оцінки *dilution integrity*

На рис. 5 наведено порівняльний аналіз експериментальних даних вивчення *dilution integrity* на прикладі методик визначення 2-аміно-5-хлорпіридину в крові та сечі.

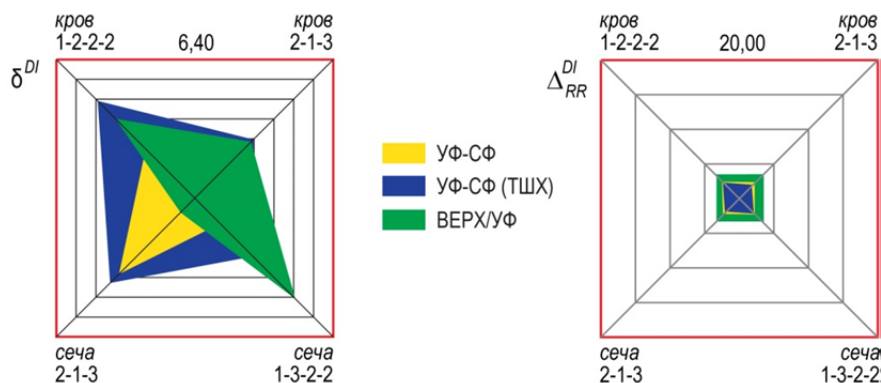


Рис. 5. Результати перевірки *dilution integrity* для методик визначення 2-аміно-5-хлорпіридину в крові та сечі

Стабільність. В ранг обов'язкової ми пропонуємо ввести процедуру визначення стабільності аналіта в кінцевому аналізованому розчині (*processed sample stability*) і, відповідно до загальної логіки викладеного раніше, вивчати її на двох рівнях – з використанням МР і МЗ – шляхом вимірювання аналітичного сигналу через 1, 12, 24, 36 та 48 годин після приготування розчину.

Критерії прийнятності для параметра «стабільність» запропоновано нами виходячи з положення, що зміни аналіта в процесі зберігання аналізованого розчину не повинні призводити до виникнення значущої систематичної похибки, тобто:

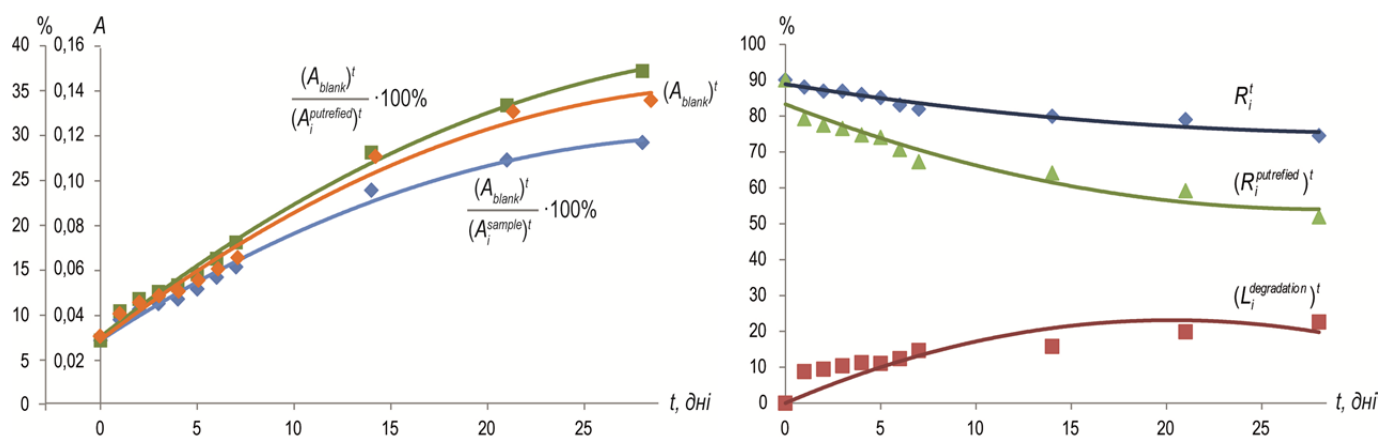
$$\delta^{model\ stability} = \frac{|A_0^{model\ stability} - A_t^{model\ stability}|}{A_0^{model\ stability}} \left(\frac{|S_0^{model\ stability} - S_t^{model\ stability}|}{S_0^{model\ stability}} \right) \cdot 100\% \leq \max \delta^{model}; \quad (19)$$

$$\delta^{stability} = \frac{|A_0^{stability} - A_t^{stability}|}{A_0^{stability}} \left(\frac{|S_0^{stability} - S_t^{stability}|}{S_0^{stability}} \right) \cdot 100\% \leq \max \delta. \quad (20)$$

Збережуваність аналіта в матриці. На нашу думку, в посмертній токсикології на перший план повинні виходити дослідження, які у вітчизняній літературі прийнято називати вивченням збережуваності, і які присвячено питанням вивчення поведінки аналіта в матриці за умов гниття в різних температурних режимах.

Такі дослідження повинні носити характер науково-дослідних і, відповідно, факультативних, і вивчатися в процесі валідації за бажанням аналітика.

Нами запропоновано схему дослідження збережуваності аналіта в матриці – на рис. 6 подано результати такого модельного експерименту на прикладі УФ-СФ-методики 2-1-3 кількісного визначення доксиламіну в крові.



t – термін зберігання; $(\bar{A}_{blank})^t$ – поглинання *blank*-зразка;

$(A_{putrefied})^t$ та $(A_{sample})^t$ – поглинання МЗ, в який введено аналіт до та після зберігання відповідно;

R_i^t , $(L_i^{degradation})^t$ та $(R_i^{putrefied})^t$ – ступінь ізолювання, ступінь деградації та збережуваність аналіта

Рис. 6. Результати дослідження збережуваності доксиламіну в крові на прикладі УФ-СФ-методики 2-1-3

Результати, отримані в ході такого експерименту, можуть бути використані для визначення значення фонового поглинання з метою корекції поглинання аналізованих зразків, отриманих від трупа, для якого приблизно встановлено час настання смерті; для введення поправки в результати аналізу, отримані для зразків, що зазнали гnilісних змін, за допомогою методики, розробленої на зразках свіжої матриці; для оцінки доцільності проведення екстгумації трупа за результатами даних про кількість аналіта, які можуть бути визначені через задані періоди часу, тощо.

Оцінка і прогноз повної невизначеності. Для ілюстрації можливостей існуючого підходу до оцінки невизначеності методики на рис. 7 на прикладі УФ-СФ-методики 1-1-2-1 визначення доксиламіну в крові наведено отримані нами експериментальні дані щодо внеску кожної стадії пробопідготовки у загальну невизначеність.

Отримані результати можуть бути використані для визначення критичних стадій пробопідготовки, що вносять найбільший внесок в загальну невизначеність методики, але виконувати такий величезний експеримент за умови, що Δ_{As} не перевищує допустимих норм, щонайменше, не вигідно з економічної точки зору.

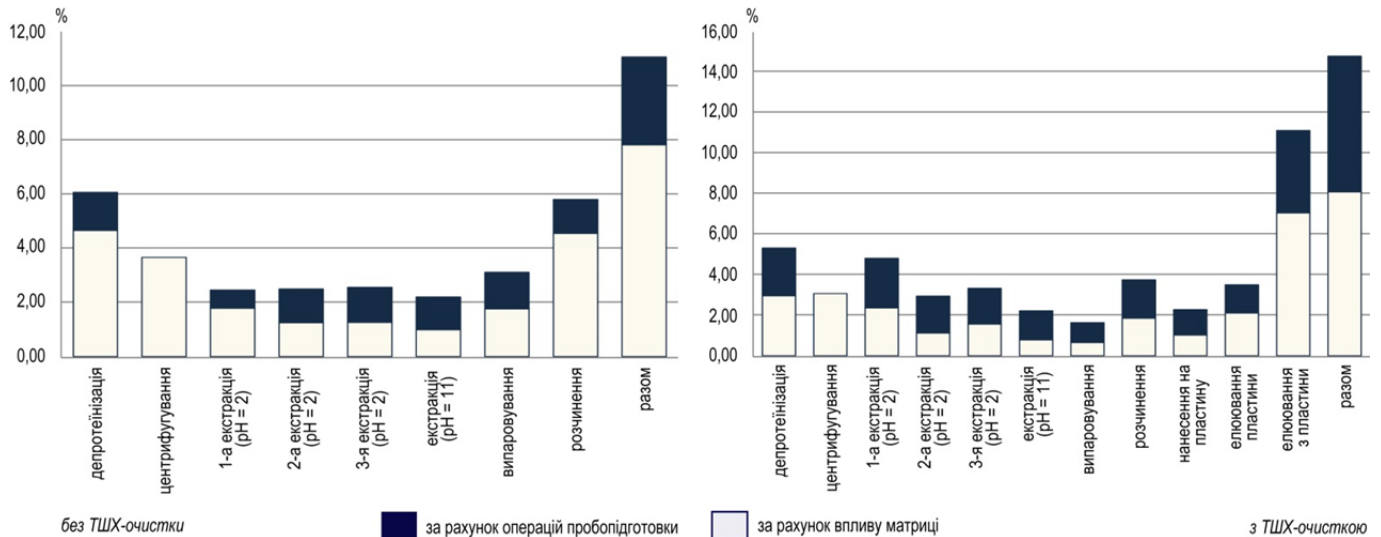


Рис. 7. Внесок стадій пробопідготовки УФ-СФ-методики 1-1-2-1 визначення доксиламіну в крові в загальну невизначеність методики

Що ж до прогнозу загальної невизначеності, то такий експеримент не дає нам інформації для прогнозування, а лише дозволяє оцінити величину невизначеності, причому така оцінка по стадіях застосовна лише для цієї конкретної методики, оскільки інший аналіт в рамках тих самих операцій даватиме зовсім інші похибки, і, можливо, навіть критичні стадії будуть іншими.

Тому використовувати цей підхід для прогнозу повної невизначеності методик кількісного визначення в аналітичній токсикології ми вважаємо недоречним.

Для прогнозу повної невизначеності методики в ХТА нами запропоновано використовувати підхід, що ґрунтується на оцінці невизначеності як загальної допустимої похибки (*total allowable error* – TAE), який пропонує оцінювати невизначеність методики як арифметичну суму її систематичної та випадкової похибки.

Нами запропоновано два варіанти виконання розрахунків для визначення прогнозованої сумарної невизначеності методики, виходячи з наведених раніше допущень – $\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{cal}^2 + \Delta_{sample}^2}$ і $\Delta_{cal} = \Delta_{sample}$:

$$1) \Delta_{As} = \sqrt{2 \cdot \Delta_{RR}^{intra}} + \delta^{intra} \leq \max \Delta_{As} = 20,00\%; \quad (21)$$

$$2) \Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{cal}^2 + (\Delta_{RR}^{intra})^2} + \delta^{sample} \leq \max \Delta_{As} = 20,00\%, \quad (22)$$

а також варіант, що ґрунтується на використанні як складових для розрахунку Δ_{RR}^{sample} і δ^{sample} – як величин, що відображають найбільшу кількість помилок методики:

$$3) \Delta_{As} = \Delta_{RR}^{sample} + \delta^{sample} \leq \max \Delta_{As} = 20,00\%. \quad (23)$$

Результати прогнозу Δ_{As} з використанням запропонованих варіантів розрахунку для ряду розроблених і модифікованих нами методик кількісного визначення зопіклону в крові та сечі показують, що найбільш песимістичний прогноз дає перший варіант розрахунку, який і рекомендовано нами до подальшого використання.

Аналогічно у разі роботи з модельними розчинами повну невизначеність методики запропоновано прогнозувати відповідно до виразу:

$$\Delta_{As}^{model} = \sqrt{2 \cdot \Delta_{RR}^{model}} + \delta^{model} \leq \max \Delta_{As}^{model}; \quad (24)$$

отримана величина не повинна перевищувати $\max \Delta_{As}^{model}$ для Підходу 1 або Підходу 2.

Розробка та валідація методик кількісного визначення аналітів в біологічних рідинах для хіміко-токсикологічного аналізу у варіанті методу калібрувального графіка

З урахуванням запропонованої загальної концепції проведення валідації методик в ХТА та підходів до визначення окремих валідаційних параметрів нами розроблено стандартизовану процедуру валідації методик визначення аналітів в біологічних рідинах у варіанті МКГ – з використанням МР (схема 8) та зразків матриці (схема 9).

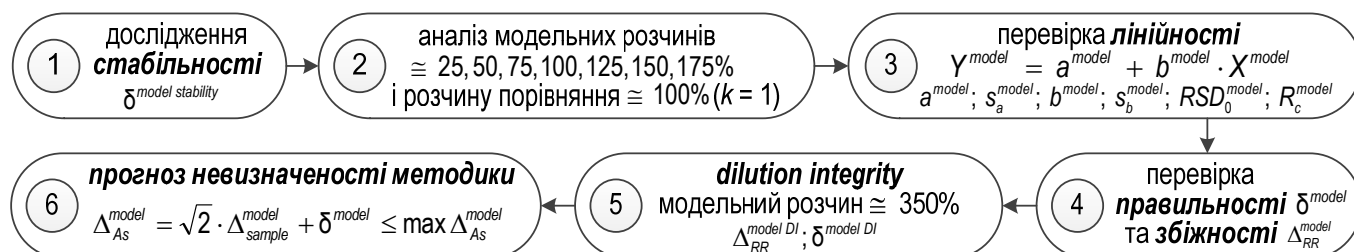


Схема 8. Етапи стандартизованої процедури валідації
методик визначення аналітів з використанням МР у варіанті МКГ

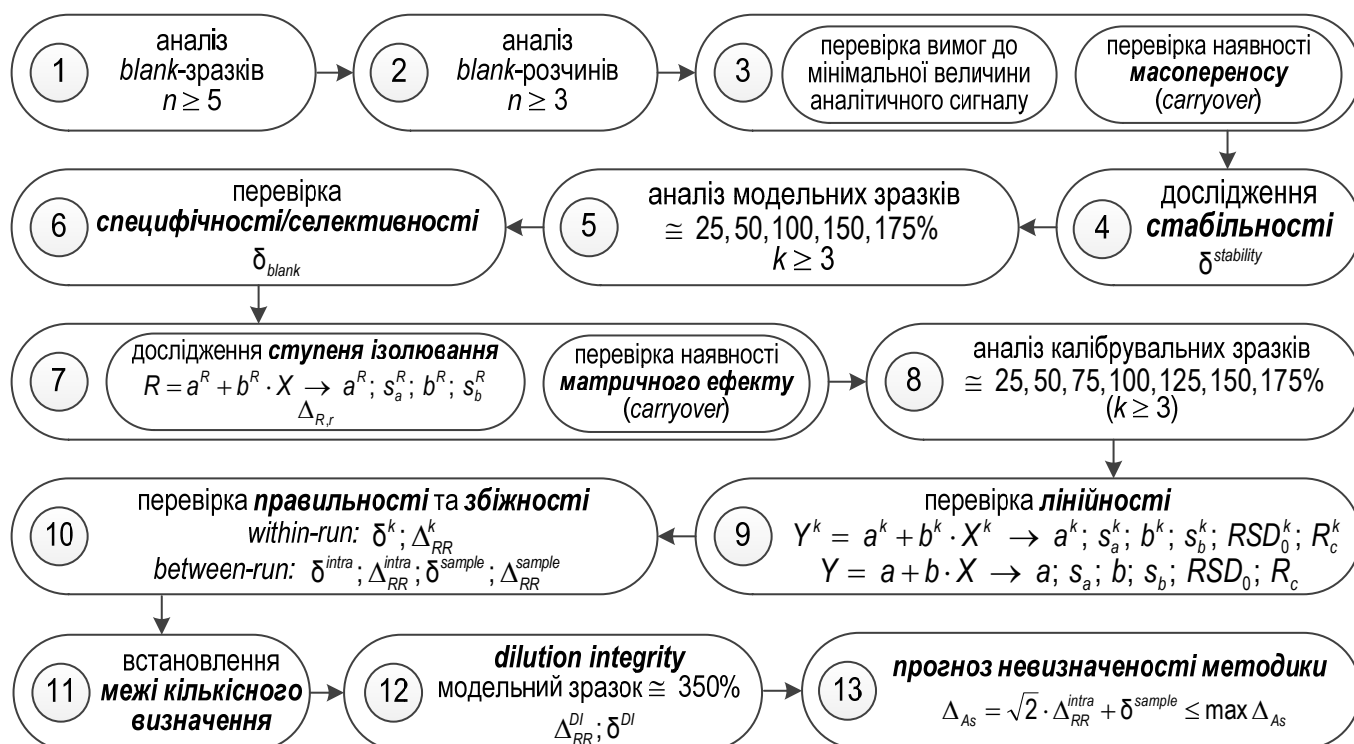


Схема 9. Етапи стандартизованої процедури валідації
методик визначення аналітів з використанням зразків матриці у варіанті МКГ

Для апробації запропонованої стандартизованої процедури нами було проведено розробку та модифікацію серії методик кількісного визначення ряду токсикологічно значущих азотовмісних сполук кислотного, основного та амфотерного характеру в крові та сечі з використанням різних методів аналізу та процедур пробопідготовки відповідно до табл. 1 – 3 та схем 2 – 3 і виконано їх валідацію у варіанті МКГ.

На рис. 8 наведено узагальнені дані визначення δ^{model} , Δ_{RR}^{model} та Δ_{As}^{model} розроблених методик визначення зопіклону, 2-аміно-5-хлорпіридину, доксиламіну, кетотифену, трамадолу, каптоприлу, фенітоїну та метронідазолу за МР.

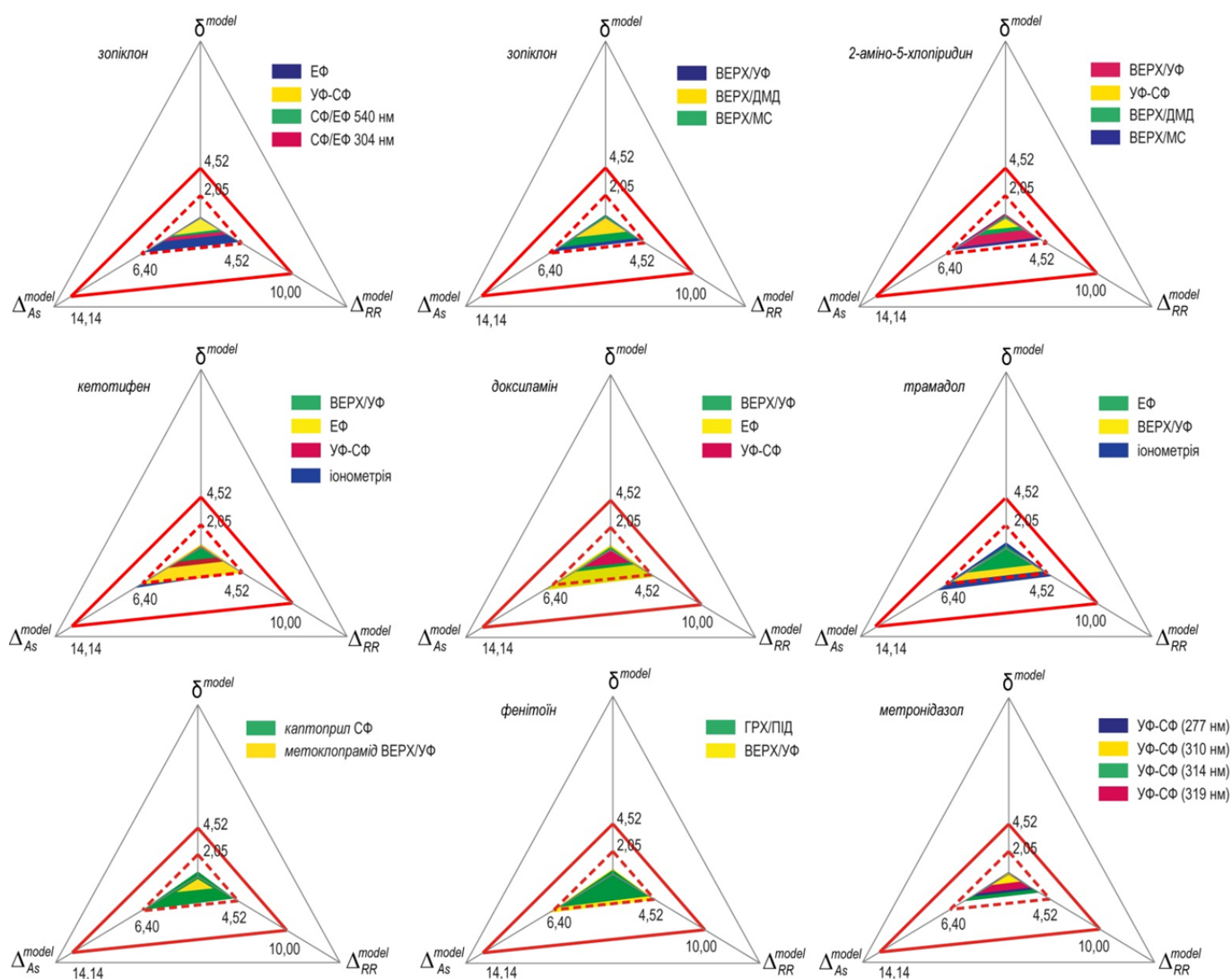


Рис. 8. Порівняльні результати визначення валідаційних параметрів методик кількісного визначення досліджуваних аналітів за МР у варіанті МКГ

Отримані результати свідчать, що показники правильності, прецизійності та загальної невизначеності методик кількісного визначення аналітів за МР з використанням методів ВЕРХ/УФ, ВЕРХ/ДМД, ВЕРХ/МС, ГРХ/ПІД та УФ-СФ вкладаються в рамки критеріїв прийнятності як для *Підходу 1*, так і для *Підходу 2*. Для методик з попередньою аналітичною пробопідготовкою (ЕФ, ФК та ВИД-СФ) вимоги до валідаційних параметрів виконуються лише у рамках більш ліберального *Підходу 1*.

На рис. 9 наведено узагальнені дані визначення Δ_{As} розроблених методик на прикладі кількісного визначення зопіклону в крові та сечі для $D = 25 - 175\%$.

На підставі отриманих результатів зроблено такі узагальнюючі висновки:

- усі методики з використанням оптичних методів аналізу з попередньою ТШХ-очисткою характеризуються нижчими величинами Δ_{As} , ніж відповідні методики без ТШХ-очистки, головним чином, за рахунок зменшення систематичної похибки методики;
- у разі виконання аналізу оптичними методами без ТШХ-очистки, більшість методик з використанням методів ВИД-СФ та ЕФ, що передбачають отримання забарвленого продукту реакції з вихідного аналіта, обтяжені меншою систематичною похибкою, ніж відповідні УФ-СФ-методи;

- найкращими валідаційними параметрами характеризуються ВЕРХ- та ГРХ-методики кількісного визначення аналітів у біологічних рідинах;
- усі зазначені покращення валідаційних параметрів пов'язано з відсутністю значущого впливу компонентів *blank*-проби на результати аналізу.

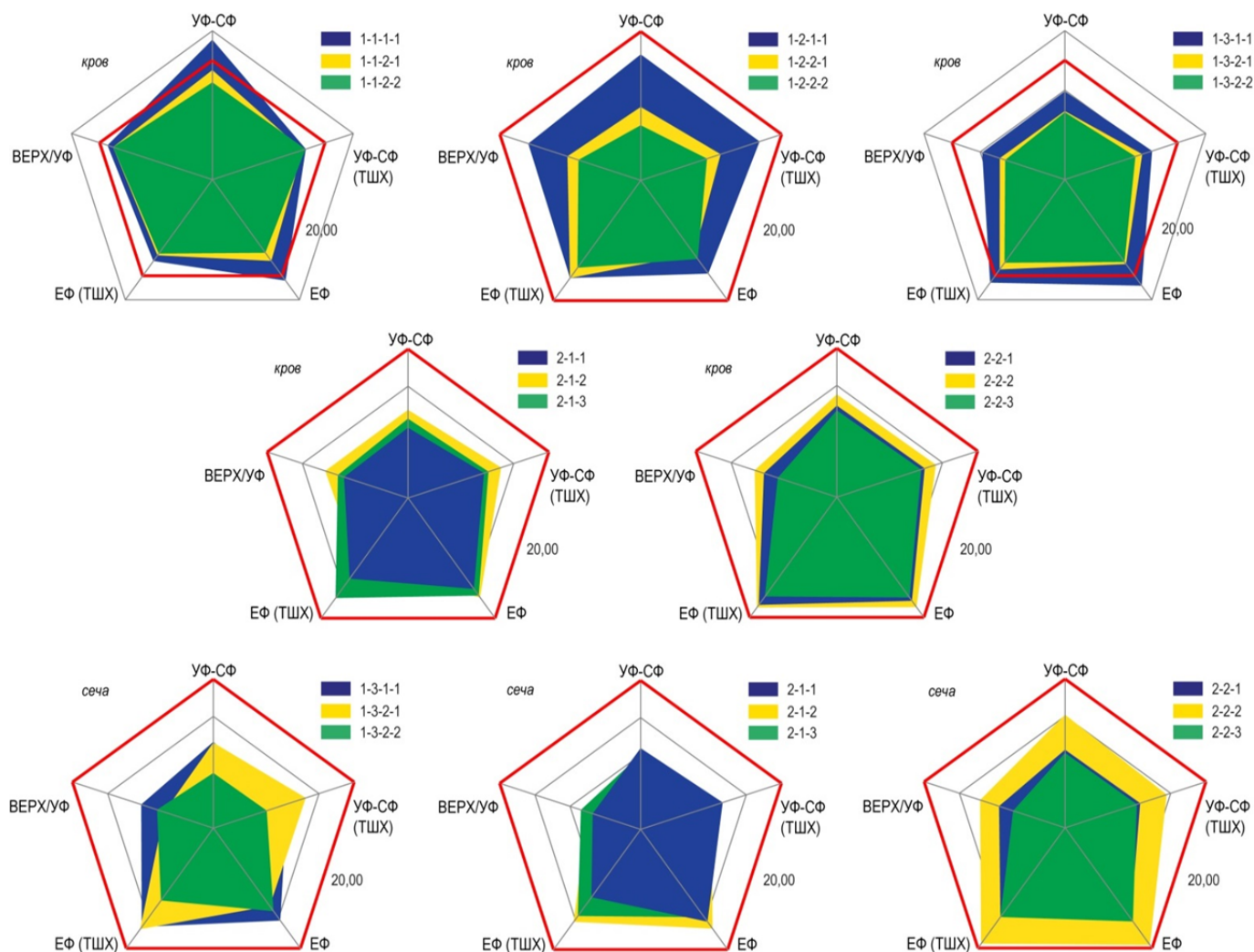


Рис. 9. Порівняльні результати прогнозу загальної невизначеності методик кількісного визначення зопіклону в крові та сечі у варіанті МКГ

Розробка та валідація методик кількісного визначення аналітів в біологічних рідинах для хіміко-токсикологічного аналізу у варіанті методу стандарту

Міжнародні керівництва в області валідації біоаналітичних методик передбачають виконання аналізу винятково за МКГ, що багато в чому продиктоване специфікою фармакокінетичних досліджень – аналізують невелику кількість відомих аналітів та виконують аналіз великої кількості зразків на кожен аналіт щодня. МКГ, безумовно, дозволяє врахувати і частково нівелювати вплив фонового сигналу матриці на результати визначення, але виправдовує себе лише у разі виконання рутинних аналізів. В ХТА ми часто зустрічаємося із разовими експертизами, на які направляють різні біологічні рідини, тобто необхідно кількісно визначати аналіт в кількох різноманітних біологічних об'єктах, при цьому необхідність виконання такого визначення може виникати досить рідко. У такій ситуації побудова калібрувального гра-

фіка для кожної матриці вимагає абсолютно нераціональних витрат часу, і на момент отримання результатів аналізу вони можуть стати неактуальними.

У зв'язку з цим нами теоретично і практично обґрунтовано можливість застосування методу стандарту для проведення кількісного визначення аналітів у біологічних рідинах. Експериментально досліджено варіанти використання розчину порівняння та зразка порівняння як стандартів та доведено більшу прийнятність застосування розчину порівняння з концентрацією аналіта, що відповідає його концентрації в кінцевому аналізованому розчині за умови нульових втрат для точки 100% в нормалізованих координатах; як і в МКГ, відгук такого розчину порівняння коригується на середню величину R , отриману на попередньому етапі валідації, і використовується для нормалізації значень відгуків аналізованих зразків.

Розроблено стандартизовану процедуру валідації методик визначення аналітів в біологічних рідинах у варіанті МС – на схемах 10 – 11 наведено етапи зазначеної процедури, що відрізняються від відповідних етапів у МКГ.

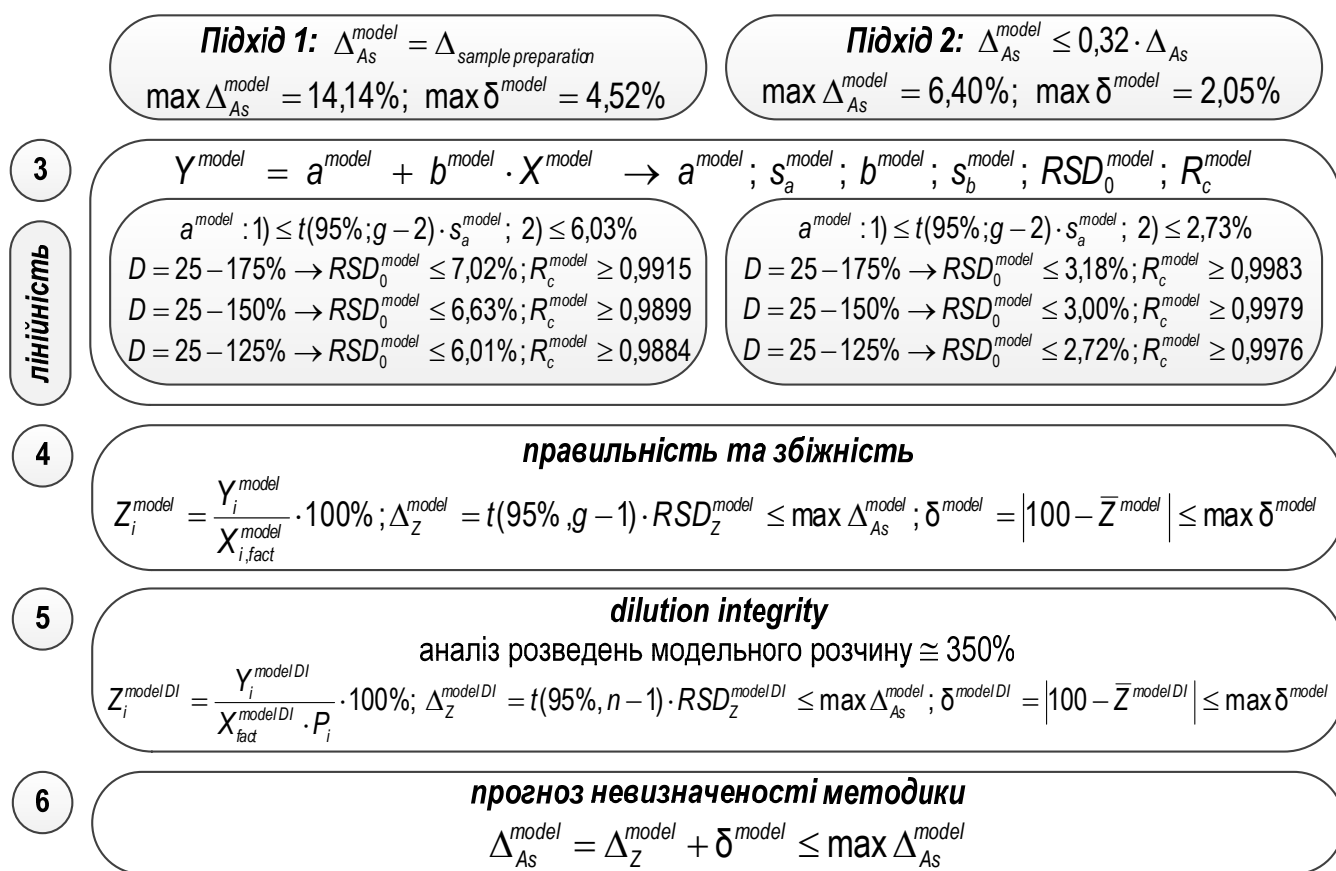


Схема 10. Етапи стандартизованої процедури валідації методик визначення аналітів з використанням МР у варіанті МС

Для апробації запропонованої стандартизованої процедури нами було виконано валідацію розроблених на попередньому етапі методик кількісного визначення зопіклону, 2-аміно-5-хлорпіридину, доксиламіну, кетотифену, трамадолу, каптоприлу, фенітоїну, метронідазолу і метоклопраміду в крові та сечі у варіанті МС.

На рис. 10 наведено узагальнені дані визначення Δ_{As} розроблених методик для $D = 25 - 175\%$ у вигляді відповідних полігональних проекційних діаграм.

В абсолютній більшості випадків прогноз загальної невизначеності методик у варіанті МС песимістичніший, ніж у варіанті МКГ.

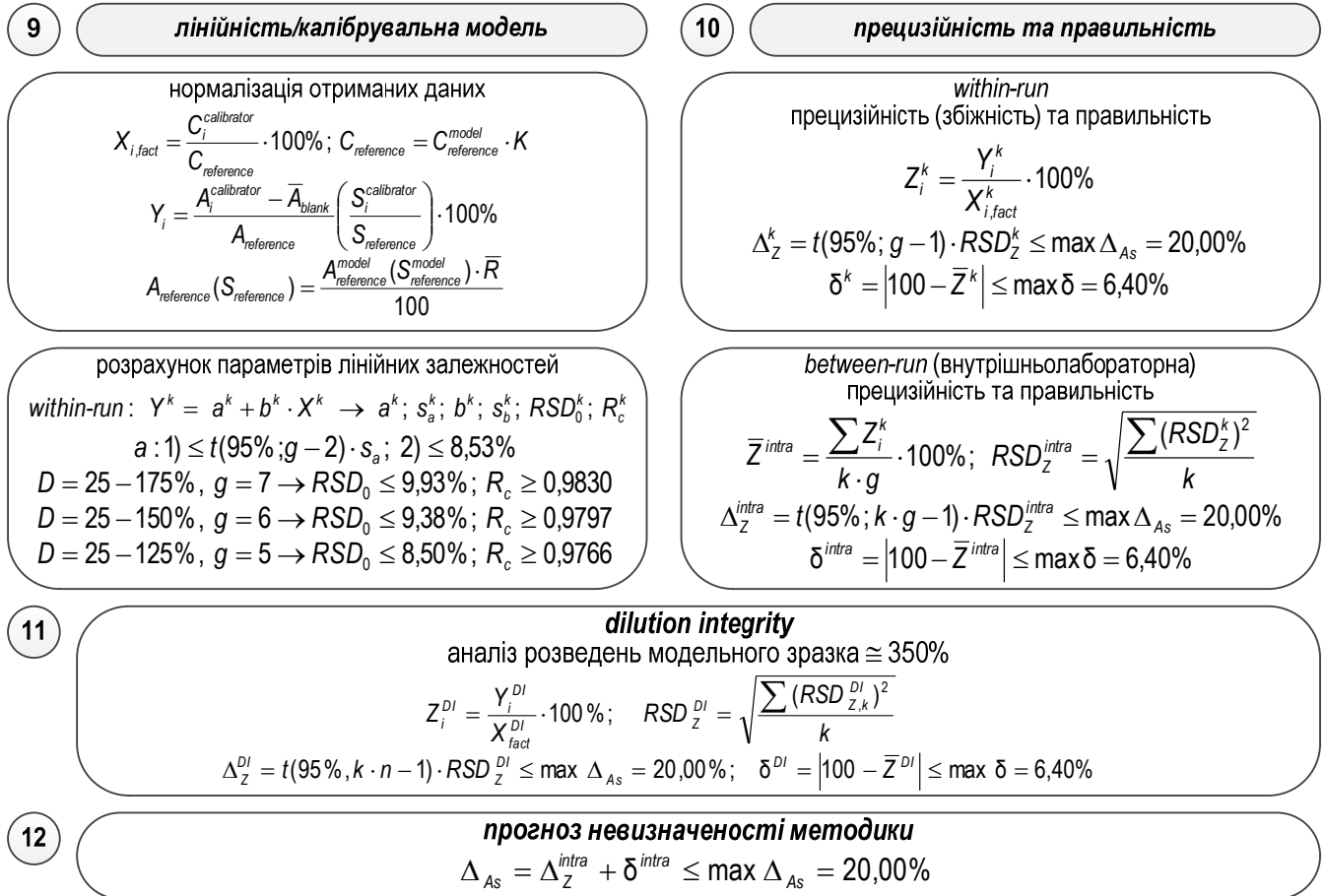


Схема 11. Етапи стандартизованої процедури валідації методик визначення аналітів з використанням зразків матриці у варіанті МС

Розробка та валідація методик кількісного визначення аналітів в біологічних рідинах для хіміко-токсикологічного аналізу у варіанті методу добавок

У ХТА склад біологічної матриці відрізняється великою різноманітністю внаслідок таких чинників як час, що минув після настання смерті, гнильні зміни, термічна дія, хронічні захворювання тощо. Значно покращити результат аналізу за таких умов може використання методу добавок, що дозволяє вимірювати відгук усієї процедури аналізу в цілому, з урахуванням різних явних і неявних ефектів та процесів, та застосовується, головним чином, при аналізі об'єктів, в яких поведінка досліджуваного аналіта визначається переважно характеристиками самого об'єкту (матриці).

Залежно від особливостей об'єктів і випадків в судово-токсикологічній лабораторії може виникнути необхідність виконання однієї і тієї самої методики кількісного визначення аналіта як у варіанті МКГ, так і у варіанті МС або МД.

У зв'язку з цим нами теоретично і практично обґрунтовано можливість застосування МД для проведення кількісного визначення аналітів у біологічних рідинах. Проведено емпіричні розрахунки щодо встановлення оптимальної величини добавки для запропонованого діапазону застосування $D = 25 - 175\%$ та експериментально досліджено варіанти використання добавки, що відповідає 25, 50, 75 та 100% в нормалізованих координатах – добавка $\sim 75\%$ дозволяє досягти прийнятних показників правильності та прецизійності методики як за МР, так і за МЗ.

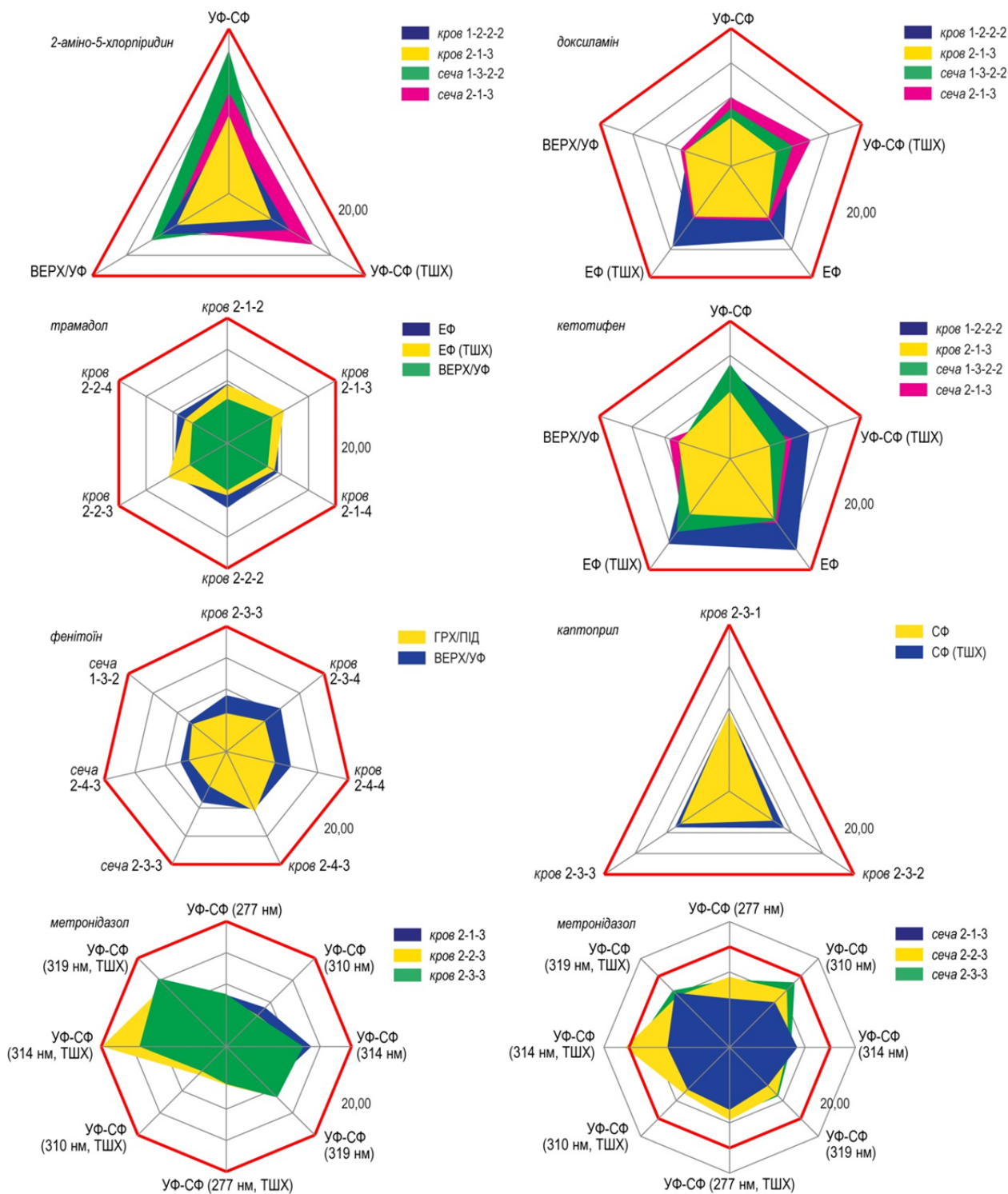


Рис. 10. Порівняльні результати прогнозу загальної невизначеності кількісного визначення аналітів в крові та сечі у варіанті МС

Розроблено стандартизовану процедуру валідації методик визначення аналітів в біологічних рідинах у варіанті МД – на схемах 12 – 13 наведено етапи зазначеної процедури, що відрізняються від відповідних етапів у МКГ.

Для апробації запропонованої стандартизованої процедури нами було виконано валідацію розроблених методик кількісного визначення зопіклону, 2-аміно-5-хлорпіридину, доксиламіну, кетотифену і метоклопраміду в крові та сечі у варіанті МД.

На рис. 11 наведено узагальнені дані визначення Δ_{As} розроблених методик у вигляді відповідних полігональних проекційних діаграм.

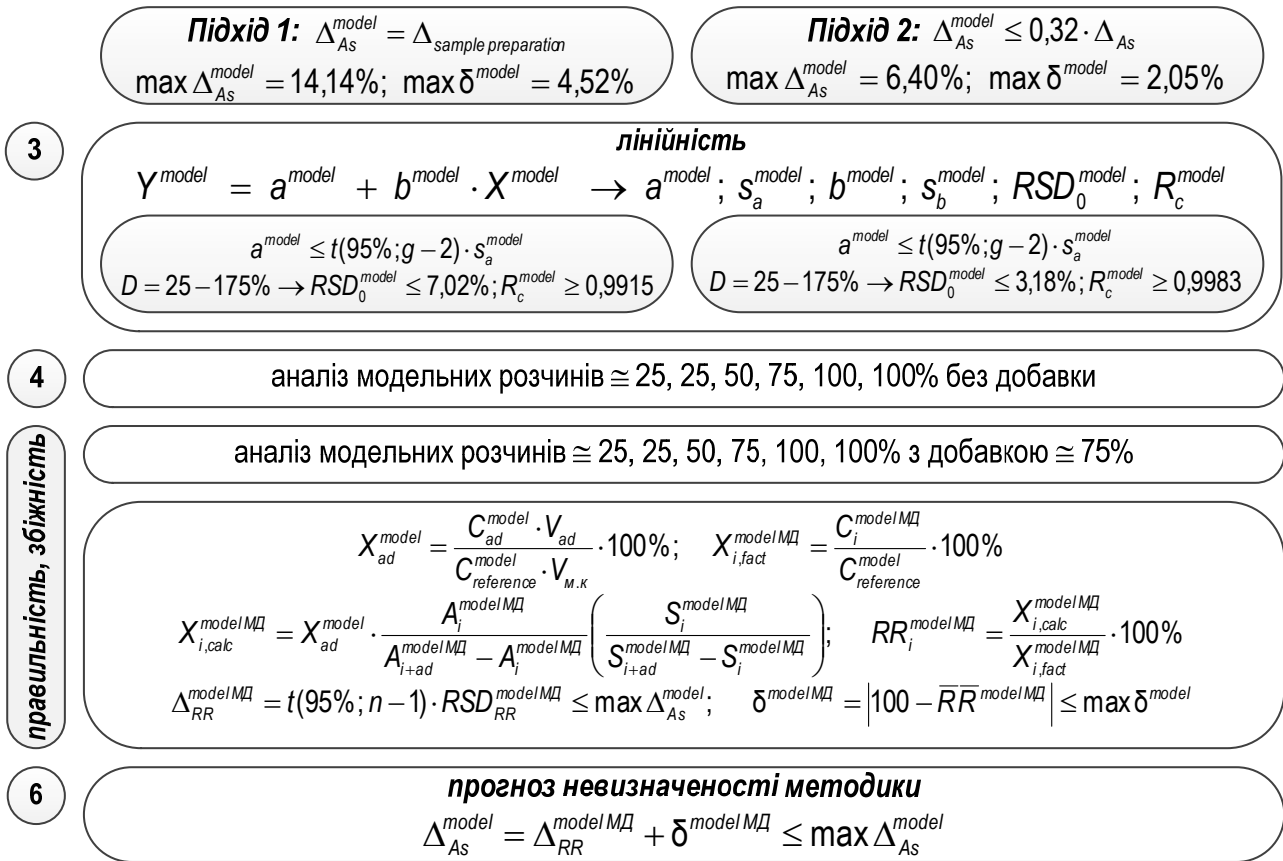


Схема 12. Етапи стандартизованої процедури валідації методик визначення аналітів з використанням МР у варіанті МД

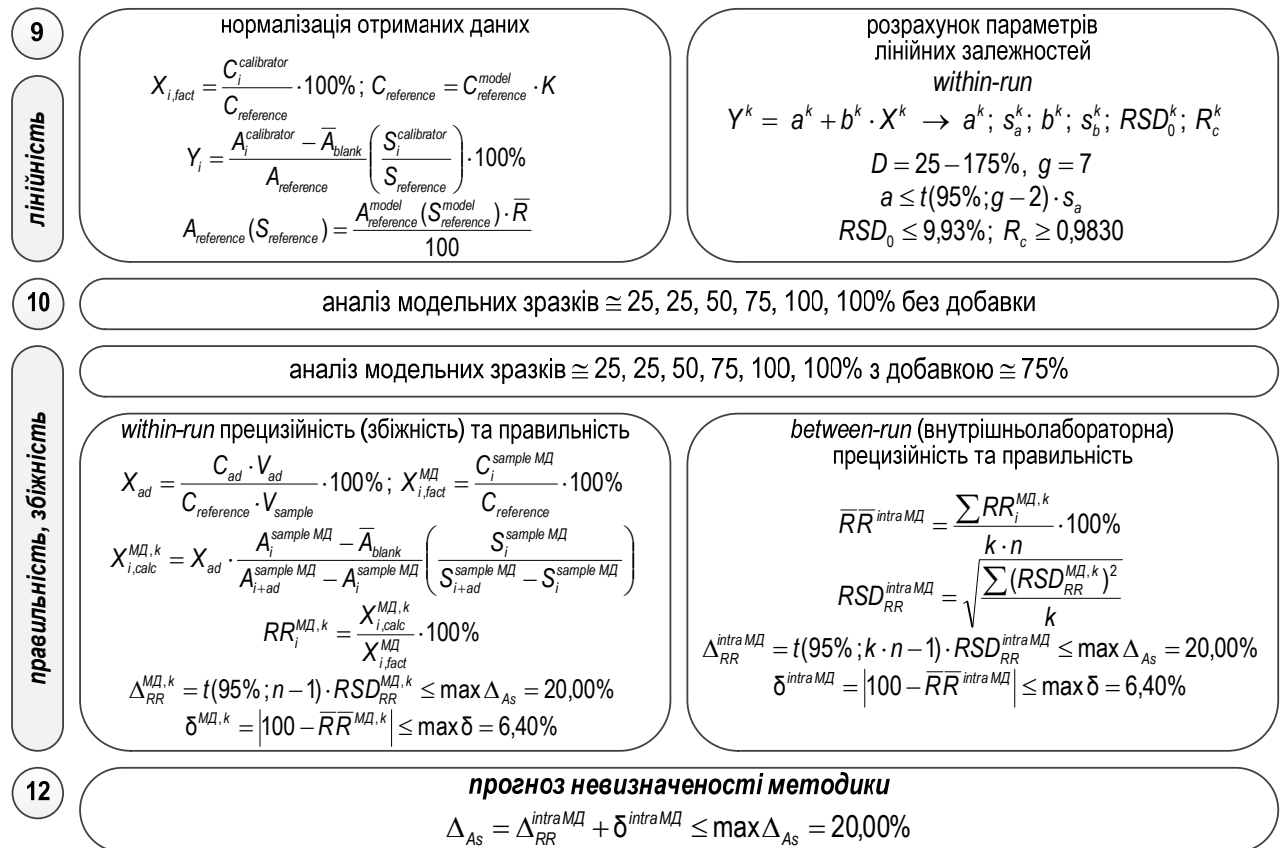


Схема 13. Етапи стандартизованої процедури валідації методик визначення аналітів з використанням зразків матриці у варіанті МД

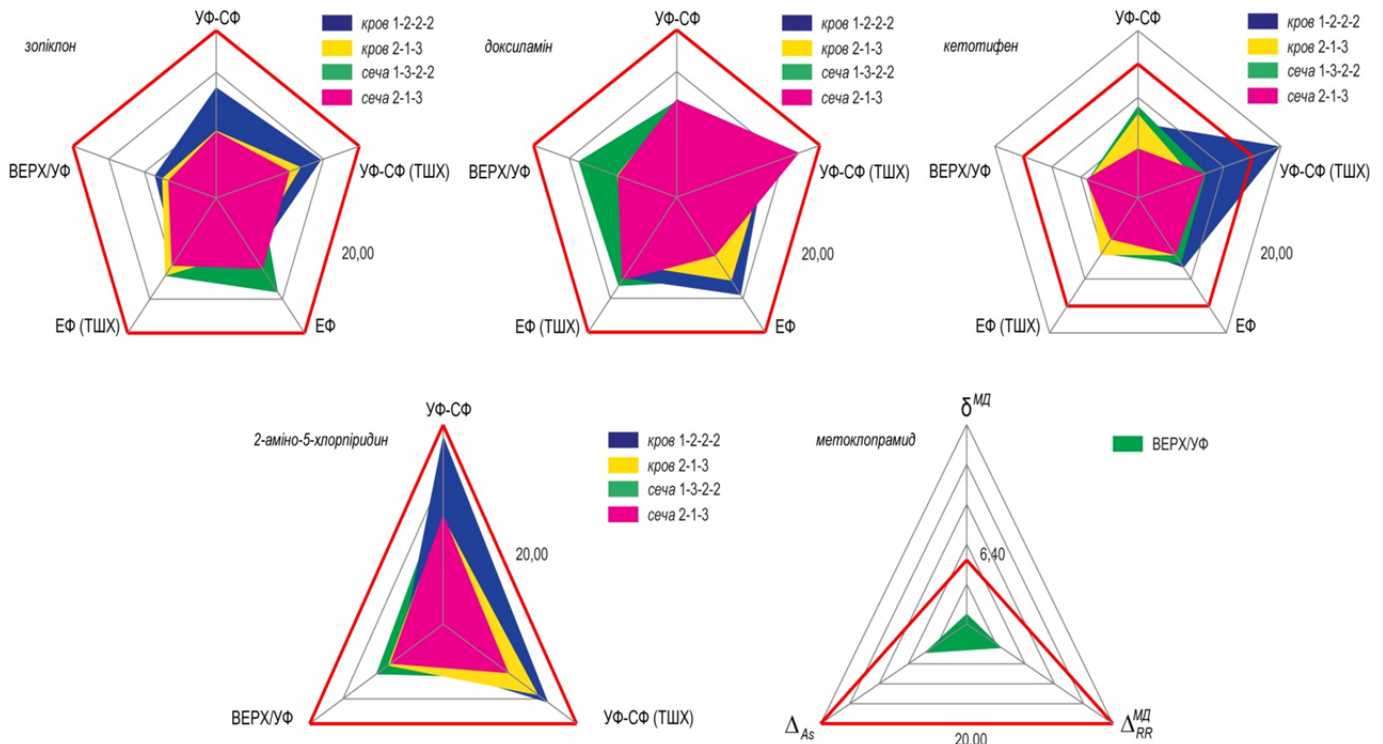


Рис. 11. Порівняльні результати визначення прогнозу загальної невизначеності кількісного визначення аналітів в крові та сечі у варіанті МД

В абсолютній більшості випадків прогноз Δ_{As} методик з додатковою ТШХ-очисткою у варіанті МД дає гірші результати, ніж у варіанті МКГ та МС, проте вкладається в рамки запропонованих критеріїв. Проте УФ-СФ- та ЕФ-методици без додаткової ТШХ-очистки характеризуються кращими показниками правильності саме у варіанті МД, що пояснюється нівелюванням впливу матриці на результати аналізу.

Запропоновано уніфіковані форми протоколів перевірки стабільності, специфічності/селективності та ступеня ізолювання, лінійності, правильності та прецизійності, *dilution integrity* методик кількісного визначення аналітів в біологічних рідинах у варіантах МКГ, МС та МД – загалом 20 (рис. 12) та створено їх програмне забезпечення.

В табл. 8 наведено дані відносно мінімальної кількості зразків, які необхідно проаналізувати відповідно до міжнародних керівництв та запропонованих нами процедур валідації для ухвалення рішення про придатність методики до застосування.

Таблиця 8

Мінімальні кількості зразків, які необхідно проаналізувати у відповідності до існуючих підходів та запропонованих стандартизованих процедур валідації для підтвердження придатності методики

Параметр	Кількість зразків						
	FDA	EMA	UNODC	SWGTOX	МКГ	МС	МД
специфічність	12	12	16	16	5	5	5
лінійність	6 × 3 = 18	6 × 3 = 18	5 × 6 = 30	6 × 5 = 30	7 × 3 = 21	7 × 3 = 21	7 × 3 = 21
правильність і прецизійність	3 × 3 × 5 = 45	3 × 4 × 5 = 60	3 × 3 × 3 = 27	5 × 3 × 3 = 45	5 × 3 = 15		6 × 2 × 3 = 36
ступінь ізолювання	3 × 5 = 15	–		6 × 2 = 12			
разом	90	90	73	103	41	26	62

Протокол вивчення стабільності (МР)

Параметр	Значення					
	0 год	1 год	12 год	24 год	36 год	48 год
$A_{model\ steb\ iity} \quad (A_{model\ steb\ iity})$						
$A_0^{model\ steb\ iity} - A_t^{model\ steb\ iity}$						
$(S_0^{model\ steb\ iity} - S_t^{model\ steb\ iity})$						
$\delta^{model\ steb\ iity}, \% \leq \max$						
Підхід 1	$\leq 4,5$					
Підхід 2	$\leq 2,0$					

Протокол перевірки лінійності (МР) у варіанті МКГ

Параметр	Значення	Критерії прийнятності			
		Підхід 1		Підхід 2	
b^{model}		-	-	-	-
s_b^{model}		-	-	-	-
a^{model}		-	-	-	-

Протокол перевірки правильності та збіжності (МР) у варіанті МКГ

Фактична концентрація аналіта в модельному розчині ($C_i^{model} = \text{мкг/мл}$)	Оптична густина (площа піку) $A_i^{model} (S_i^{model})$ ($A(S)_i^{model} =$)	Знайдено у % до стандартної оптичної густини (площі піку) $Y_i^{model}, \%$	Розрахована концентрація аналіта в модельному розчині $X_{i,palc}^{model}, \%$				
$C_i^{model}, \text{мкг/мл}$	$X_{i,fact}^{model}, \%$		$D = 25 - 175\% (g = 7)$	$D = 25 - 150\% (g = 6)$	$D = 25 - 125\% (g = 5)$		
25						2,25%	відп.
50						0,9991	відп.
75						-	-
100						-	-
125						-	-
150						-	-

Протокол вивчення dilution integrity (МР) у варіанті МКГ

Фактична концентрація аналіта в модельному розведенні	Оптична густина (площа піку) $A_i^{model/DI} (S_i^{model/DI})$	Знайдено у % до стандартної оптичної густини (площі піку) $Y_i^{model/DI}, \%$
25		
50		
75		
100		
125		
150		

Протокол визначення специфічності та ступеня ізолювання (оптичні методи аналізу)

$A_{blank,j}$	$A_{procedure,j}$	$X_{i,fact}^{sample} = X_{i,fact}^{model}, \%$	A_i^{sample}			$A_i^{sample} - \bar{A}_{blank}$			A_i^{model}	$k=2$	$k=3$
			день 1	день 2	день 3	день 1	день 2	день 3			
25											
50											
100											
150											
175											
\bar{A}_{blank}	-	-									
$\bar{A}_{procure}$	-	-									
$RSD_{ran}(blank), \%$	$\leq 6,71\%$	відп.									
$\bar{X}_{sample} = X_{i,fact}^{model}, \%$	$D = 25 - 175\% (g = 7)$										

Фактична концентрація аналіта ± 6/p ($C_{reference} = \text{мкг/л}$)	Оптична густина (площа піку) $A_{calibrator} (S_{calibrator})$ ($A(S)_{reference} =$)	Знайдено у % до стандартної оптичної густини (площі піку) $Y_i^k, \%$	$D = 25 - 175\% (g = 7)$											
			Розрахована концентрація аналіта ± 6/p $X_{i,cac}^k, \%$						$RR_i^k, \%$					
$C_{i,calibrator}$	$X_{i,cac}^k, \%$		день 1	день 2	день 3	день 1	день 2	день 3	день 1	день 2	день 3	день 1	день 2	день 3
25														
50														
75														
100														
125														
150														
175														
$\overline{RR}^k, \%$														
$\sigma^k, \% = 100 - \overline{RR}^k \leq \max \sigma = 6,40\%$														
$RSD_{ran}^k, \%$														
$\Delta_{ran}^k, \% = RSD_{ran}^k \cdot t(95\%; g-1) \leq \max \Delta_{ran} = 14,14\%$														

Фактична концентрація аналіта ± 6/p ($C_{reference} = \text{мкг/л}$)	Оптична густина (площа піку) $A_{calibrator} (S_{calibrator})$ ($A(S)_{reference} =$)	Знайдено у % до стандартної оптичної густини (площі піку) $Y_i^k, \%$	$D = 25 - 175\% (g = 7)$								
			Розрахована концентрація аналіта ± 6/p $X_{i,cac}^{(n-k)}, \%$						$RR_i^{(n-k)}, \%$		
$C_{i,calibrator}$	$X_{i,cac}^{(n-k)}, \%$		день 1	день 2	день 3	день 1					

Рис. 12. Форми протоколів валідації методик кількісного визначення аналітів у біологічних рідинах в ХТА

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення та практичне вирішення наукової проблеми, що полягає в формуванні комплексного методологічного забезпечення процесу розробки, валідації та легітимізації методик кількісного визначення аналітів у біологічних рідинах для застосування в ХТА як інструменту створення оптимальної методики із заданими цілями, завданнями та особливостями; розроблено та валідовано ряд методик кількісного визначення токсикологічно значущих речовин в крові та сечі для застосування в судово-токсикологічних лабораторіях.

1. З урахуванням результатів критичного аналізу існуючих нормативних документів і оригінальних наукових публікацій вперше теоретично обґрунтовано порядок проведення процедури валідації біоаналітичних методик в ХТА, що полягає у використанні модельних розчинів і зразків матриці в три етапи, застосуванні критеріїв переходу між рівнями/етапами і критеріїв прийнятності валідаційних параметрів та обов'язковому прогнозі сумарної невизначеності методики.
2. Запропоновано та обґрунтовано перелік валідаційних параметрів для методик кількісного визначення аналітів у біологічних рідинах в ХТА, узгоджений із рекомендаціями ІСН, який включає такі параметри, як специфічність, ступінь ізолювання, діапазон застосування, лінійність/калібрувальна модель, правильність, прецизійність, межа кількісного визначення, *dilution integrity* та стабільність.
3. З урахуванням міжнародних вимог до величини загальної невизначеності методики в ХТА ($\leq 20,00\%$) та коефіцієнта кореляції ($\geq 0,99$) вперше теоретично обґрунтовано аналітичний діапазон застосування методик кількісного визначення аналітів в біологічних рідинах – $D = 25 - 125\%$, $25 - 150\%$, $25 - 175\%$ в нормалізованих координатах, кількість концентраційних рівнів ($g = 5, 6, 7$) та їх розташування всередині діапазону застосування (з постійним кроком 25%); за 100% рекомендовано приймати цільову концентрацію аналіта в біологічній рідині.
4. Сформульовано теоретичні підходи до підтвердження специфічності/ селективності (аналіз ≥ 5 *blank*-зразків; внесок компонентів *blank*-проби в результати аналізу – $\delta_{blank(25\%)} \leq 8,00\%$; $\delta_{blank(50\%)} \leq 6,40\%$) та визначення і оцінки ступеня ізолювання R аналіта з матриці (аналіз модельних зразків в рамках ≥ 3 послідовностей; $\Delta_{R,r} \leq 20,00\%$; $a^R > t(95\%; k \cdot n - 2) \cdot s_a^R$; $b^R \leq t(95\%; k \cdot n - 2) \cdot s_b^R$ – для лінійної залежності $R = b^R \cdot X + a^R$; $|100 - \bar{R}| \leq 6,40\%$) як до критичних стадій попереднього етапу валідації, що дозволяють оцінити можливості подальшого застосування обраної процедури пробопідготовки; на прикладі серії методик кількісного визначення зопіклону в крові та сечі відпрацьовано поетапний алгоритм розробки оптимальної процедури пробопідготовки біологічної матриці.
5. Запропоновано порядок виконання основної фази валідації біоаналітичних методик в ХТА, що включає дослідження лінійності, правильності та прецизійності. Теоретично обґрунтовано та на прикладі серії методик кількісного визначення доксиламіну в крові експериментально підтверджено процедури визначення зазначених валідаційних параметрів – на першому етапі дослідження виконують з використанням модельних розчинів, на другому етапі досліджують показники в рамках однієї та декількох (≥ 3) аналітичних послідовностей з використанням калібрувальних та модельних зразків матриці.
6. Обґрунтовано порядок проведення додаткової фази валідації біоаналітичних методик в ХТА, що включає дослідження можливостей розведення аналізованих

зразків та стабільності аналіта в гниючій матриці; обґрунтовано процедури визначення відповідних параметрів.

7. Обґрунтовано та розраховано критерії прийнятності валідаційних параметрів на основі систематичного використання принципу незначущості та виходячи з $\Delta_{cal} = \Delta_{sample}$ ($\Delta_{As} \leq 14,14\%$; $\Delta_{cal} \leq 14,14\%$; $\delta^{sample} \leq 6,40\%$). Для параметрів, визначених за модельними розчинами, критерії прийнятності розраховано в рамках двох підходів: 1) $\Delta_{As}^{model} = \Delta_{sample\ preparation}$ ($\Delta_{As}^{model} \leq 14,14\%$; $\Delta_{cal}^{model} \leq 10,00\%$; $\delta^{model} \leq 4,52\%$); 2) $\Delta_{As}^{model} \leq 0,32 \cdot \max \Delta_{As}$ ($\Delta_{As}^{model} \leq 6,40\%$; $\Delta_{cal}^{model} \leq 4,52\%$; $\delta^{model} \leq 2,05\%$). На серіях методик кількісного визначення ряду токсикологічно значущих азотовмісних сполук кислотного, основного та амфотерного характеру в крові та сечі з використанням хроматографічних, оптичних та електрохімічних методів аналізу та різних процедур пробопідготовки підтверджено адекватність запропонованих критеріїв.
8. Визначення межі кількісного визначення методик запропоновано проводити шляхом комплексної імовірнісної та емпіричної оцінки як заданої нижньої точки на калібрувальному графіку, координати якої можуть бути виміряні з прийнятною прецизійністю та правильністю.
9. Для прогнозу повної невизначеності методики в ХТА за результатами розрахунків в рамках різних схем для серії методик кількісного визначення зопіклону в крові та сечі обрано варіант арифметичної суми *between-run* оцінок прецизійності $\sqrt{2} \cdot \Delta_{RR}^{intra}$ та правильності δ^{intra} на основі методу загальної допустимої похибки.
10. Теоретично і практично обґрунтовано можливість застосування методу стандарту та методу добавок для виконання разових експертиз у ХТА та дослідження біологічних рідин, що зазнали гнилісних змін, термічної дії тощо; доведено оптимальність використання розчину порівняння як стандарту та добавки $\sim 75\%$ в нормалізованих координатах відповідно.
11. Вперше розроблено стандартизовані процедури валідації біоаналітичних методик в ХТА у варіанті МКГ, МС та МД; запропоновано стандартні форми протоколів валідації та розроблено їх електронні версії з використанням програмного забезпечення Microsoft Excel. Експериментально досліджено особливості застосування розроблених стандартизованих процедур валідації до методик з використанням хроматографічних, оптичних та електрохімічних методів аналізу на прикладі кількісного визначення ряду токсикологічно значущих азотовмісних сполук кислотного, основного та амфотерного характеру в крові та сечі, проілюстровано порядок вибору найбільш прийнятних, оптимальних методик.
12. З використанням зазначених стандартизованих процедур валідації розроблено, модифіковано і оптимізовано методики кількісного визначення зопіклону, 2-аміно-5-хлорпіридину, кетотифену, доксиламіну, трамадолу, фенітоїну, каптоприлу, метронідазолу і метоклопраміду в крові та сечі з використанням методів ГРХ/ПІД, ВЕРХ/УФ, ВЕРХ/ДМД/МС, УФ-СФ, ВИД-СФ, ФК, ЕФ та різних процедур пробопідготовки біологічних рідин; в тому числі розроблено методики іонOMETричного визначення кетотифену та трамадолу в крові із застосуванням нових кетотифенселективного і трамадолселективного електродів та нову тандемну ЕФ/УФ-СФ-методику кількісного визначення зопіклону в біологічних рідинах, запропоновано ряд нових методик пробопідготовки біологічних рідин та спосіб очистки витягів з біологічних рідин методом деривативної ТШХ, що ґрунтується на реакції аліфатичних амінів з натрію гіпохлоритом.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Спектрофотометричне визначення каптоприлу за допомогою фотометричної реакції з реактивом Еллмана / В. В. Болотов, З. В. Шовкова, С. І. Мерзлікін, Л. Ю. Клименко // Журн. орган. та фармац. хімії. – 2007. – Т. 5, вип. 4 (20). – С. 63 – 66. (*Особистий внесок – розробка схеми проведення експерименту, участь в узагальненні та обговоренні експериментальних даних*).
2. Болотов, В. В. Применение реакционной тонкослойной хроматографии в анализе лекарственных препаратов. Сообщение 1. Способ селективного обнаружения первичных, вторичных и третичных алифатических аминов / В. В. Болотов, Л. Ю. Клименко, И. М. Иванчук // Журн. орган. та фармац. хімії. – 2008. – Т. 6, вип. 2 (22). – С. 76 – 79. (*Особистий внесок – постановка завдання, теоретичне обґрунтування експерименту, участь в узагальненні експериментальних даних*).
3. Болотов, В. В. Вивчення методів ізолювання донормілу з об'єктів біологічного походження / В. В. Болотов, І. М. Іванчук, Л. Ю. Клименко // Вісн. фармації. – 2008. – №3 (55). – С. 20 – 22. (*Особистий внесок – розробка схеми проведення експерименту, участь в узагальненні та обговоренні експериментальних даних*).
4. Ізолювання каптоприлу із тканин печінки / З. В. Шовкова, В. В. Болотов, С. І. Мерзлікін, Л. Ю. Клименко // Запороз. мед. журн. – 2008. – №5 (50). – С. 145 – 147. (*Особистий внесок – розробка схеми проведення експерименту, участь у проведенні досліджень та узагальненні експериментальних даних*).
5. Розробка методик ізолювання каптоприлу з біологічних рідин організму / З. В. Шовкова, В. В. Болотов, С. І. Мерзлікін, Л. Ю. Клименко // Запороз. мед. журн. – 2010. – Т. 12, №6. – С. 84 – 87. (*Особистий внесок – постановка завдання, участь у проведенні досліджень та узагальненні експериментальних даних*).
6. Спрямований хіміко-токсикологічний аналіз біологічного матеріалу на каптоприл / З. В. Шовкова, В. В. Болотов, С. І. Мерзлікін, Л. Ю. Клименко // Вісник фармації. – 2010. – №4 (64). – С. 42 – 45. (*Особистий внесок – постановка завдання, участь у проведенні досліджень та узагальненні експериментальних даних*).
7. Фотометричне визначення кетотифену / В. В. Болотов, Ю. О. Мирошніченко, Е. Ю. Ахмедов, Л. Ю. Клименко // Вісн. фармації. – 2011. – №3 (67). – С. 50 – 53. (*Особистий внесок – розробка схеми проведення експерименту, участь у проведенні досліджень та узагальненні експериментальних даних*).
8. Застосування вискоєфективної рідинної хроматографії в аналізі кетотифену / В. В. Болотов, Ю. О. Мирошніченко, Л. Ю. Клименко, Е. Ю. Ахмедов // Укр. мед. альм. – 2012. – Т. 15, №5 (додаток). – С. 40 – 42. (*Особистий внесок – розробка схеми проведення експерименту, участь у проведенні досліджень та узагальненні експериментальних даних*).
9. Болотов, В. В. Розробка твердоконтактного електрода, селективного до кетотифену / В. В. Болотов, Ю. О. Мирошніченко, Л. Ю. Клименко // Укр. мед. альм. – 2013. – Т. 16, №1. – С. 47 – 49. (*Особистий внесок – постановка завдання, участь у проведенні досліджень та узагальненні експериментальних даних*).
10. Клименко, Л. Ю. Анализ подходов к определению специфичности/селективности при проведении валидации аналитических методик в судебно-токсикологическом анализе / Л. Ю. Клименко, Г. П. Петюнин // Укр. мед. альм. – 2013. – Т. 16, №1. – С. 71 – 74. (*Особистий внесок – постановка завдання, критичний аналіз та узагальнення даних, підготовка та написання статті*).

11. Методы изолирования кетотифена из тканей печени / Ю. А. Мирошниченко, Л. Ю. Клименко, В. В. Болотов, Э. Ю. Ахмедов // Фармация Казахстана. – 2013. – №7. – С. 41 – 44. (*Особистий внесок – розробка схеми проведення експерименту, участь у проведенні досліджень та узагальненні експериментальних даних*).
12. Клименко, Л. Ю. Подходы к определению специфичности/селективности при валидации УФ-спектрофотометрических методик количественного определения в судебно-токсикологическом анализе / Л. Ю. Клименко, Г. П. Петюнин, Т. А. Костина // Фармация Казахстана. – 2013. – №8 (147). – С. 53 – 56. (*Особистий внесок – постановка завдання, теоретичне обґрунтування процедури дослідження та оцінки прийнятності, узагальнення даних, підготовка статті*).
13. Модификация и валидация УФ-спектрофотометрической методики количественного определения доксиламина в крови: специфичность/селективность / Л. Ю. Клименко, С. Н. Трут, Г. П. Петюнин, И. М. Иванчук // Укр. журн. клініч. та лаборатор. медицини. – 2013. – Т. 8, №4. – С. 191 – 199. (*Особистий внесок – постановка завдання, розробка схеми проведення експерименту, участь в узагальненні та обговоренні експериментальних даних*).
14. Validation of UV-spectrophotometric methods of quantitative determination in forensic and toxicological analysis: recovery / L. Yu. Klimenko, S. N. Trut, G. P. Petyunin, I. M. Ivanchuk // Фармация Казахстана. – 2013. – №12 (151). – С. 42 – 48. (*Особистий внесок – постановка завдання, теоретичне обґрунтування процедури дослідження та оцінки прийнятності, розробка схеми проведення експерименту, участь в узагальненні та обговоренні експериментальних даних*).
15. Клименко, Л. Ю. Валидация УФ-спектрофотометрических методик количественного определения в судебно-токсикологическом анализе: оценка потерь целевого аналита / Л. Ю. Клименко, С. Н. Трут, Г. П. Петюнин // Азерб. фармацевт. и фармакотерапевт. журн. – 2013. – Т. XIII, №2. – С. 12 – 17. (*Особистий внесок – постановка завдання, розробка схеми проведення експерименту, участь в узагальненні та обговоренні експериментальних даних*).
16. Klimenko, L. Yu. Development of approaches to validation of UV-spectrophotometric methods of quantitative determination in forensic and toxicological analysis: linearity and application range / L. Yu. Klimenko, G. P. Petyunin // Фармац. часоп. – 2014. – №2 (30). – С. 46 – 51. (*Особистий внесок – постановка завдання, теоретичне обґрунтування процедури дослідження та оцінки прийнятності, узагальнення даних, підготовка та написання статті*).
17. Klimenko, L. Yu. Validation of UV-spectrophotometric method of doxylamine quantitative determination in blood: linearity / L. Yu. Klimenko, S. M. Trut, E. Yu. Akhmedov // Фармац. часоп. – 2014. – №3 (31). – С. 56 – 60. (*Особистий внесок – постановка завдання, розробка схеми проведення експерименту, участь в узагальненні та обговоренні експериментальних даних*).
18. 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 // Актуал. питання фармац. і мед. науки та практики. – 2014. – №2 (15). – С. 15 – 22. (*Особистий внесок – постановка завдання, теоретичне обґрунтування процедури дослідження та оцінки прийнятності, розробка схеми проведення експерименту, участь в узагальненні експериментальних даних*).

19. Determining accuracy in validation of UV-spectrophotometric methods of quantitative measurement in forensic toxicological analysis / L. Yu. Klimenko, S. M. Trut, G. P. Petyunin, T. A. Kostina // Укр. біофармац. журн. – 2014. – №2 (31). – С. 55 – 67. (*Особистий внесок – постановка завдання, теоретичне обґрунтування процедури дослідження та оцінки прийнятності, розробка схеми проведення експерименту, участь в узагальненні та обговоренні експериментальних даних*).
20. 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. (*Особистий внесок – постановка завдання, теоретичне обґрунтування процедури дослідження та оцінки прийнятності, узагальнення даних, підготовка та написання статті*).
21. Валидация УФ-спектрофотометрической методики количественного определения доксиламина в крови: прецизионность / Л. Ю. Клименко, С. Н. Трут, Т. А. Костина, И. М. Иванчук // Вестн. КазНМУ. – 2014. – №4. – С. 301 – 308. (*Особистий внесок – постановка завдання, розробка схеми проведення експерименту, участь в узагальненні та обговоренні експериментальних даних*).
22. Клименко, Л. Ю. Разработка подходов к определению линейности, правильности и прецизионности УФ-спектрофотометрических методик количественного определения методом стандарта в судебно-токсикологическом анализе / Л. Ю. Клименко // Фармація Казахстану. – 2014. – №4 (155). – С. 31 – 35.
23. Klimenko, L. Yu. Determination of validation characteristics of UV-spectrophotometric method of doxylamine quantitative determination in blood in the variant of the method of standard / L. Yu. Klimenko, S. M. Trut, S. M. Poluyan // Вісн. фармації. – 2014. – №2 (78). – С. 53 – 58. (*Особистий внесок – розробка схеми проведення експерименту, участь в узагальненні та обговоренні експериментальних даних*).
24. Klimenko, L. Yu. Determination of linearity, accuracy and precision of UV-spectrophotometric methods of quantitative determination in forensic and toxicological analysis in the variant of the method of additions / L. Yu. Klimenko // Фармація Казахстану. – 2014. – №7 (158). – С. 51 – 58.
25. Клименко, Л. Ю. Определение валидационных характеристик УФ-спектрофотометрической методики количественного определения доксиламина в крови в варианте метода добавок / Л. Ю. Клименко, С. Н. Трут, В. И. Степаненко // Вестн. Тадж. нац. ун-та (науч. журн.). Сер. естеств. наук. – 2014. – №1/3 (134). – С. 189 – 199. (*Особистий внесок – постановка завдання, розробка схеми проведення експерименту, участь в узагальненні експериментальних даних*).
26. Клименко, Л. Ю. Разработка и валидация экстракционно-фотометрических методик количественного определения зопиклона в биологических жидкостях в варианте метода калибровочного графика / Л. Ю. Клименко, Е. В. Гуменюк, А. И. Новицкий // Вестн. Тадж. нац. ун-та (науч. журн.). Сер. естеств. наук. – 2014. – №1/1 (126). – С. 241 – 247. (*Особистий внесок – розробка схеми проведення експерименту, участь в узагальненні експериментальних даних*).
27. Development and validation of the methods of captopril spectrophotometric determination in blood by the reaction with the Ellman reagent / L. Yu. Klimenko, Z. V. Showkova, O. Ye. Mykytenko, A. G. Kaplaushenko // Актуал. питання фар-

- мац. і мед. науки та практики. – 2014. – №3 (16). – С. 8 – 13. (*Особистий внесок – постановка завдання, розробка схеми проведення експерименту, участь в узагальненні та обговоренні експериментальних даних*).
28. Klimenko, L. Yu. Development and validation of the HPLC-procedures of phenytoin determination in blood in the variant of the method of standard / L. Yu. Klimenko, V. S. Bondar, O. St. Tarasova // Упр., економіка та забезп. якості в фармації. – 2014. – №5 (37). – С. 4 – 10. (*Особистий внесок – розробка схеми проведення експерименту, участь в узагальненні експериментальних даних*).
 29. Klimenko, L. Yu. Development and validation of the HPLC-procedure of metoclopramide determination in blood / L. Yu. Klimenko, V. P. Moroz, T. A. Kostina // Упр., економіка та забезп. якості в фармації. – 2014. – №6 (38). – С. 42 – 50. (*Особистий внесок – постановка завдання, розробка схеми проведення експерименту, участь в узагальненні та обговоренні експериментальних даних*).
 30. Разработка и валидация методик экстракционно-фотометрического определения трамадола в крови / Л. Ю. Клименко, Э. Ю. Ахмедов, Н. А. Прохоренко // Вестн. Тадж. нац. ун-та (науч. журн.). Сер. естеств. наук. – 2015. – №1/1 (156). – С. 254 – 263. (*Особистий внесок – розробка схеми проведення експерименту, участь в узагальненні та обговоренні експериментальних даних*).
 31. Клименко, Л. Ю. Розроблення та валідація методик визначення фенітоїну в сечі методом газорідинної хроматографії / Л. Ю. Клименко, В. С. Бондар, О. В. Гуменюк // Фармац. журн. – 2015. – №1. – С. 96 – 104. (*Особистий внесок – постановка завдання, розробка схеми проведення експерименту, участь в узагальненні та обговоренні експериментальних даних*).
 32. Дослідження ізолювання каптоприлу із сечі / З. В. Шовкова, В. В. Болотов, С. І. Мерзлікін, Л. Ю. Клименко // Актуал. пробл. транспорт. медицини: навколиш. середовище; проф. здоров'я; патологія. – 2010. – №3 (21), додаток. – С. 85 – 88. (*Особистий внесок здобувача – розробка схеми проведення експерименту, участь у проведенні досліджень та узагальненні експериментальних даних*).
 33. Дослідження ізолювання донормілу із крові / І. М. Іванчук, В. В. Болотов, Л. Ю. Клименко, О. В. Гуменюк // Актуал. пробл. транспорт. медицини: навколиш. середовище; проф. здоров'я; патологія. – 2010. – №3 (21), додаток. – С. 67 – 70. (*Особистий внесок здобувача – розробка схеми проведення експерименту, участь у проведенні досліджень та узагальненні експериментальних даних*).
 34. Розробка методик ізолювання донормілу з біологічних рідин організму / І. М. Іванчук, В. В. Болотов, Л. Ю. Клименко, З. В. Шовкова // Мед. хімія. – 2011. – Т. 13, №2 (47). – С. 121 – 124. (*Особистий внесок здобувача – розробка схеми проведення експерименту, участь в узагальненні експериментальних даних*).
 35. Деклараційний патент на винахід 48652 А Україна, МПК 7 G01N27/30. Мембрана твердоконтактного іоноселективного електрода для визначення концентрації іонів трамадолу / Болотов В. В., Зареченський М. А., Ахмедов Е. Ю., Клименко Л. Ю. – №2001117487; заявл. 02. 11. 01; опубл. 15. 08. 02, Бюл. №8. – 6 с. (*Особистий внесок здобувача – постановка завдання, теоретичне обґрунтування експерименту, участь в узагальненні експериментальних даних*).
 36. Патент на винахід 89862 Україна, МПК (2009) G01N30/90 (2006.01), G01N31/20. Спосіб селективного виявлення первинних, вторинних та третинних аліфатичних амінів / Болотов В. В., Іванчук І. М., Клименко Л. Ю., Ахме-

- дов Е. Ю. – № а 2008 05545; заявл. 29. 04. 08; опубл. 10. 03. 10, Бюл. №5. – 6 с. (*Особистий внесок здобувача – теоретичне обґрунтування експерименту, участь у проведенні досліджень та узагальненні експериментальних даних*).
37. Патент на корисну модель 96004 Україна, МПК G01N27/30 (2006.01). Мембрана твердоконтактного іоноселективного електрода для визначення концентрації іонів кетотифену / Клименко Л. Ю., Мирошниченко Ю. О. – № u 2014 08967; заявл. 08. 08. 14; опубл. 12. 01. 15, Бюл. №1. – 5 с. (*Особистий внесок здобувача – постановка завдання, теоретичне обґрунтування експерименту, участь у проведенні досліджень та узагальненні експериментальних даних*).
 38. Патент на корисну модель 96005 Україна, МПК G01N31/20 (2006.01). Спосіб ізолювання дифеніну із біологічного матеріалу / Бондар В. С., Багуля О. В., Клименко Л. Ю. – № u 2014 08968; заявл. 08. 08. 14; опубл. 12. 01. 15, Бюл. №1. – 3 с. (*Особистий внесок здобувача – теоретичне обґрунтування експерименту, участь у проведенні досліджень та узагальненні експериментальних даних*).
 39. Болотов, В. В. Хіміко-токсикологічний аналіз біологічного матеріалу на донорміл: метод. рек. / В. В. Болотов, І. М. Іванчук, Л. Ю. Клименко. – К., 2009. – 20 с. (*Особистий внесок – розробка схеми проведення експерименту, участь у проведенні досліджень та узагальненні експериментальних даних*).
 40. Болотов, В. В. Хіміко-токсикологічний аналіз біологічного матеріалу на каптоприл: метод. рек. / В. В. Болотов, З. В. Шовкова, С. І. Мерзлікін, В. С. Бондар, Л. Ю. Клименко. – К., 2009. – 24 с. (*Особистий внесок – розробка схеми проведення експерименту, участь в узагальненні експериментальних даних*).
 41. Клименко, Л. Ю. Хіміко-токсикологічний аналіз біологічного матеріалу на кетотифен: метод. рек. 30.14/60.14 / Л. Ю. Клименко, Ю. О. Мирошниченко, В. В. Болотов. – К., 2014. – 24 с. (*Особистий внесок – розробка схеми проведення експерименту, участь в узагальненні експериментальних даних*).
 42. Клименко, Л. Ю. Стандартизована процедура валідації методик кількісного визначення аналітів в біологічних рідинах у варіанті методу калібрувального графіка для застосування в аналітичній токсикології: метод. рек. 103.15/246.15 / Л. Ю. Клименко, Г. П. Петюнін. – К., 2015. – 40 с. (*Особистий внесок – постановка завдання, теоретичне обґрунтування процедури валідації та оцінки прийнятності, підготовка та написання методичних рекомендацій*).
 43. Клименко, Л. Ю. Стандартизована процедура валідації методик кількісного визначення аналітів в біологічних рідинах у варіанті методу стандарту для застосування в аналітичній токсикології: метод. рек. 104.15/247.15 / Л. Ю. Клименко, Г. П. Петюнін. – К., 2015. – 39 с. (*Особистий внесок – постановка завдання, теоретичне обґрунтування процедури валідації та оцінки прийнятності, підготовка та написання методичних рекомендацій*).
 44. Клименко, Л. Ю. Стандартизована процедура валідації методик кількісного визначення аналітів в біологічних рідинах у варіанті методу добавок для застосування в аналітичній токсикології: метод. рек. 105.15/248.15 / Л. Ю. Клименко, Г. П. Петюнін. – К., 2015. – 36 с. (*Особистий внесок – постановка завдання, теоретичне обґрунтування процедури валідації та оцінки прийнятності, підготовка та написання методичних рекомендацій*).
 45. Клименко, Л. Ю. Кількісне визначення зопіклону в біологічних рідинах методом високоефективної рідинної хроматографії: метод. рек. 107.15/249.15 /

- Л. Ю. Клименко, В. С. Бондар, З. В. Шовкова. – К., 2015. – 23 с. (*Особистий внесок – розробка схеми проведення експерименту, участь у проведенні досліджень та узагальненні експериментальних даних*).
46. Клименко, Л. Ю. Кількісне визначення метоклопраміду в біологічних рідинах методом високоефективної рідинної хроматографії: метод. рек. 108.15/250.15 / Л. Ю. Клименко, В. П. Мороз, О. Є. Микитенко. – К., 2015. – 23 с. (*Особистий внесок – розробка схеми проведення експерименту, участь у проведенні досліджень та узагальненні експериментальних даних*).
 47. Клименко, Л. Ю. ТанDEMна УФ-спектрофотометрична/екстракційно-фотометрична методика кількісного визначення зопіклону в біологічних рідинах: метод. рек. 109.15/251.15 / Л. Ю. Клименко, Т. А. Костіна, І. М. Іванчук. – К., 2015. – 30 с. (*Особистий внесок – розробка схеми проведення експерименту, участь у проведенні досліджень та узагальненні експериментальних даних*).
 48. Клименко, Л. Ю. Кількісне визначення трамадолу в біологічних рідинах методом високоефективної рідинної хроматографії: метод. рек. 110.15/252.15 / Л. Ю. Клименко, Е. Ю. Ахмедов, Н. О. Прохоренко. – К., 2015. – 23 с. (*Особистий внесок – розробка схеми проведення експерименту, участь у проведенні досліджень та узагальненні експериментальних даних*).
- Крім наведених публікацій, результати дисертаційних досліджень опубліковано ще у 27 тезах доповідей.

Клименко Л. Ю. Комплексний підхід до розробки та валідації методик кількісного визначення аналітів у біологічних рідинах в хіміко-токсикологічному аналізі. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія. – Національний фармацевтичний університет МОЗ України, Харків, 2016.

Дисертацію присвячено формуванню комплексного методологічного забезпечення процесу розробки, валідації та легітимізації методик кількісного визначення аналітів у біологічних рідинах для застосування в ХТА.

Запропоновано порядок проведення валідації кількісних біоаналітичних методик: на двох рівнях – з використанням модельних розчинів і зразків матриці – і в три етапи – попередній, основний і додатковий – та передбачено критерії для переходу від одного рівня/етапу до іншого. Запропоновано і обґрунтовано перелік валідаційних параметрів для методик визначення аналітів у біологічних рідинах в ХТА; теоретично і експериментально обґрунтовано процедуру визначення та критерії прийнятності цих параметрів, розраховано їх величини.

Теоретично обґрунтовано та експериментально доведено умови застосування методу стандарту та методу добавок для проведення кількісного визначення аналітів у біологічних рідинах.

Розроблено стандартизовані процедури валідації біоаналітичних методик в ХТА у варіанті методу калібрувального графіка, методу стандарту та методу добавок.

Ключові слова: хіміко-токсикологічний аналіз, валідація, ступінь ізолювання, стабільність, ГРХ, ВЕРХ, ТШХ, УФ/ВИД-спектрофотометрія, екстракційна фотометрія, іонометрія.

Клименко Л. Ю. Комплексный подход к разработке и валидации методик количественного определения аналитов в биологических жидкостях в химико-токсикологическом анализе. – Рукопись.

Диссертация на соискание научной степени доктора фармацевтических наук по специальности 15.00.02 – фармацевтическая химия и фармакогнозия. – Национальный фармацевтический университет МЗ Украины, Харьков, 2016.

Диссертация посвящена формированию комплексного методологического обеспечения процесса разработки, валидации и легитимизации методик количественного определения аналитов в биологических жидкостях для применения в ХТА.

Теоретически обоснован порядок проведения процедуры валидации биоаналитических методик в ХТА, заключающийся в использовании модельных растворов и образцов матрицы в три этапа, применении критериев перехода между уровнями/этапами и критериев приемлемости валидационных параметров и обязательном прогнозе суммарной неопределенности методики.

Предложен и обоснован перечень валидационных параметров для методик определения аналитов в биологических жидкостях в ХТА.

Теоретически обоснован аналитический диапазон применения методик – $D = 25 - 125\%$, $25 - 150\%$, $25 - 175\%$ в нормализованных координатах, количество концентрационных уровней ($g = 5, 6, 7$) и их расположение внутри диапазона применения (с постоянным шагом 25%); за 100% рекомендовано принимать целевую концентрацию аналита в биологической жидкости.

Сформулированы теоретические подходы к процедуре определения специфичности/селективности и степени изолирования аналита из матрицы как к критическим стадиям предварительного этапа валидации, позволяющим оценить возможности последующего применения выбранной процедуры пробоподготовки.

Предложен порядок выполнения основной фазы валидации биоаналитических методик в ХТА, включающий исследование линейности, правильности, и прецизионности. Теоретически обоснованы и экспериментально подтверждены процедуры определения указанных валидационных параметров – на первом этапе исследования выполняют с использованием модельных растворов, на втором этапе исследуют показатели в рамках одной и нескольких аналитических последовательностей с использованием калибровочных и модельных образцов матрицы.

Обоснован порядок проведения дополнительной фазы валидации биоаналитических методик в ХТА, включающей исследование возможностей разведения анализируемых образцов и стабильности аналита в гниющей матрице; обоснованы процедуры определения соответствующих параметров.

Обоснованы и рассчитаны критерии приемлемости валидационных параметров на основе систематического использования принципа незначимости и исходя из положения о равенстве неопределенности построения калибровочного графика и неопределенности анализа исследуемого образца. Для параметров, определенных по модельным растворам, критерии приемлемости рассчитаны в рамках двух подходов – равенства и незначимости неопределенности количественного определения аналита в модельных растворах по сравнению с неопределенностью процедуры пробоподготовки.

Определение предела количественного определения методик предложено проводить путем комплексной вероятностной и эмпирической оценки как заданной нижней точки на калибровочном графике, координаты которой могут быть измерены с приемлемой прецизионностью и правильностью.

Для прогноза полной неопределенности методики в ХТА выбран оптимальный вариант на основе метода общей допустимой погрешности.

Теоретически и практически обоснована возможность применения метода стандарта и метода добавок для проведения количественного определения аналитов в биологических жидкостях; доказан оптимум использования раствора сравнения как стандарта и добавки ~75% в нормализованных координатах соответственно.

Впервые разработаны стандартизованные процедуры валидации биоаналитических методик в ХТА в варианте метода калибровочного графика, метода стандарта и метода добавок, которые оптимально связаны между собой ради минимизации количества выполняемых экспериментов.

С использованием указанных стандартизованных процедур валидации разработаны, модифицированы и оптимизированы методики количественного определения зопиклона, 2-амино-5-хлорпиридина, кетотифену, доксиламина, трамадола, фенитоина, каптоприла, метронидазола и метоклопрамида в крови и моче с использованием хроматографических, оптических, электрохимических методов анализа и ряда процедур пробоподготовки.

Ключевые слова: химико-токсикологический анализ, валидация, степень изолирования, стабильность, ГЖХ, ВЭЖХ, ТСХ, УФ/ВИД-спектрофотометрия, экстракционная фотометрия, ионометрия.

Klimenko L. Yu. The integrated approach to development and validation of the procedures of analytes quantification in biological fluids for chemical and toxicological analysis. – A manuscript.

Thesis for a Doctor of Pharmaceutical Science degree on the speciality 15.00.02 – pharmaceutical chemistry and pharmacognosy. – National University of Pharmacy, Ministry of Public Health of Ukraine, Kharkiv, 2016.

The thesis is devoted to forming the complex methodological ensuring of the process of development, validation and legitimization of the procedures of analytes quantification in biological fluids for application in chemical and toxicological analysis.

The order of realization of validation for quantitative bioanalytical procedures has been offered: at two levels – with application of model solutions and matrix samples – and in three stages – preliminary, main and additional ones – and the criteria for transition from one level/stage to the next have been provided.

The list of validation parameters has been offered and substantiated for procedures of analytes quantification in biological fluids for chemical and toxicological analysis; the determination procedure and acceptability criteria for the parameters mentioned have been substantiated theoretically and experimentally, their values have been calculated.

The conditions of application of the method of standard and method of additions have been substantiated theoretically and experimentally proved for carrying out analyte quantification in biological fluids.

The validation standardized algorithms for bioanalytical procedures in chemical and toxicological analysis have been developed in the variant of the method of calibration curve, method of standard and method of additions.

Key words: chemical and toxicological analysis, specificity, validation, recovery, stability, GLC, HPLC, TLC, UV/VIS-spectrophotometry, extraction photometry, ionometry.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ВЕРХ	– високоефективна рідинна хроматографія;
ДМД	– діодно-матрична детекція;
ВЕРХ/МС	– високоефективна рідинна хроматографія з мас-спектрометричною детекцією;
ВИД	– видимий;
ГРХ	– газо-рідинна хроматографія;
ДЕЦ	– Державний експертний центр;
ДП	– державне підприємство;
ЕФ	– екстракційна фотометрія;
КЗ	– калібрувальний зразок;
МД	– метод добавок;
МЗ	– модельний зразок;
МКГ	– метод калібрувального графіка;
МКВ	– межа кількісного визначення;
МОЗ	– Міністерство охорони здоров'я;
МР	– модельний розчин;
МС	– метод стандарту;
ПІД	– полум'яно-іонізаційна детекція;
СФ	– абсорбційна спектрофотометрія;
ТШХ	– тонкошарова хроматографія;
ТФ	– твердофазний;
УФ	– ультрафіолетовий;
ФК	– фотоколориметрія;
ХТА	– хіміко-токсикологічний аналіз;
ЕМА	– European Medicines Agency;
FDA	– Food and Drug Administration;
ICH	– International Conference on Harmonisation;
UNODC	– United Nations Office on Drugs and Crime;
SWGTOX	– Scientific Working Group for Forensic Toxicology;
TAE	– total allowable error.

Підписано до друку 04. 01. 2016 р.
Формат 60×84/16. Ум.-друк. арк. 1,9.
Наклад 100 пр. Зам. № б/н.
Надруковано з готового оригінал-макета
у друкарні СПД ФО Степанов В. В.
вул. Ак. Павлова, 311, м. Харків, 61168
Тел.: (057) 751-79-25

