



## **Критерии приемлемости линейной зависимости при проведении валидации УФ-спектрофотометрических методик количественного определения в судебно-токсикологическом анализе**

<sup>1</sup>Национальный фармацевтический университет, г. Харьков,  
<sup>2</sup>Харьковская медицинская академия последипломного образования,  
<sup>3</sup>ГП «Укрвакцина» МЗ Украины, г. Киев

**Ключевые слова:** валидация исследований, УФ-спектрофотометрия, доксиламин.

Статья посвящена разработке подходов к валидации методик количественного определения для судебно-токсикологического анализа и вопросам формирования критериев приемлемости для валидационного параметра «линейность/калибровочная модель». С целью разработки стандартизированной процедуры валидации УФ-спектрофотометрических методик количественного определения аналитов в биологических жидкостях для судебно-токсикологического анализа сформированы критерии и порядок оценки приемлемости линейности, которые апробированы на примере количественного определения доксиламина в крови. Оценку приемлемости параметров линейной зависимости предложено проводить в 2 этапа – для прямых, полученных с использованием модельных растворов (без матрицы), и калибровочных образцов соответственно.

### **Критерії прийнятності лінійної залежності при проведенні валидації УФ-спектрофотометричних методик кількісного визначення в судово-токсикологічному аналізі**

Л. Ю. Клименко, Г. П. Петюнин, С. М. Трут, В. П. Мороз

Стаття присвячена розробці підходів до валидації методик кількісного визначення для судово-токсикологічного аналізу і питанням формування критеріїв прийнятності для валидаційного параметра «лінійність/калібрувальна модель». З метою розробки стандартизованої процедури валидації УФ-спектрофотометричних методик кількісного визначення аналітів у біологічних рідинах для судово-токсикологічного аналізу сформовано критерії та порядок оцінювання прийнятності лінійності, які апробували на прикладі кількісного визначення доксиламіну у крові. Прийнятність параметрів лінійної залежності запропоновано оцінювати у два етапи – для прямих, що отримані з використанням модельних розчинів (без матриці), і калібрувальних зразків відповідно.

**Ключові слова:** валидація досліджень, УФ-спектрофотометрія, доксиламін.

*Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2014. – № 2 (15). – С. 15–22*

### **Acceptability criteria for linear dependence in validating UV-spectrophotometric methods of quantitative determination in forensic and toxicological analysis**

L. Yu. Klimenko, G. P. Petyunin, S. M. Trut, V. P. Moroz

**Aim.** The criteria and order of acceptability estimation of linearity tested by the example of doxylamine quantitative determination in blood have been formed with a view to develop standardized procedure of validation for UV-spectrophotometric methods of analytes quantitative determination in biological fluids used in forensic and toxicological analysis.

**Conclusion.** It has been suggested to estimate the acceptability of parameters of linear dependence in two stages – for the lines obtained using model solutions (without matrix) and calibration samples respectively.

**Key words:** Validation Studies, Ultraviolet Spectrophotometry, Doxylamine.

*Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2014; № 2 (15): 15–22*

Наличие фундаментальных работ в области валидации аналитических методик для целей фармацевтического анализа заставляет задуматься о разработке стандартизованных процедур валидации методик, использующихся в судебно-токсикологическом анализе.

Статья является продолжением работы авторов [1–5] в области разработки подходов к валидации методик количественного определения для судебно-токсикологического анализа и посвящена вопросам формирования критериев приемлемости для валидационного параметра «линейность/калибровочная модель».

#### **Цель работы**

Анализ существующих подходов к оценке приемлемости выбранной для характеристики методики

калибровочной модели в соответствии с требованиями международных руководств [6–9] и, соответственно, формирование собственных критериев для оценки приемлемости линейной зависимости при проведении валидации УФ-спектрофотометрических методик количественного определения для судебно-токсикологического анализа, а также апробация предложенных подходов на примере УФ-спектрофотометрической методики количественного определения доксиламина в крови.

#### **Материалы и методы исследования**

**Рабочие растворы:** 1000,0 мг доксиламина сукцината вносили в мерную колбу емкостью 250,0 мл, растворяли в воде очищенной и доводили объем раствора этим же растворителем до метки (стандартный раствор 1,

концентрация 4000 мкг/мл). В 7 мерных колб емкостью 100,0 мл вносили из бюретки 32,50; 30,00; 25,00; 20,00; 15,00; 10,00 и 5,00 мл стандартного раствора доксиламина сукцината 1 соответственно и доводили объемы растворов водой очищенной до метки (рабочие растворы 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7 соответственно, концентрация – 1300, 1200, 1000, 800, 600, 400 и 200 мкг/мл соответственно).

*Модельные растворы:* 100,0 мг доксиламина сукцината вносили в мерную колбу емкостью 500,0 мл, растворяли в 0,1 моль/л растворе кислоты хлористоводородной и доводили объем раствора этим же растворителем до метки (стандартный раствор 2, концентрация 200 мкг/мл). В 7 мерных колб емкостью 100,0 мл вносили из бюретки 26,00; 24,00; 20,00; 16,00; 12,00; 8,00 и 4,00 мл стандартного раствора доксиламина сукцината 2 соответственно и доводили объемы растворов 0,1 моль/л раствором кислоты хлористоводородной до метки (модельные растворы 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7 соответственно, концентрация – 52, 48, 40, 32, 24, 16 и 8 мкг/мл соответственно).

*Раствор сравнения:* 400,0 мг доксиламина сукцината вносили в мерную колбу емкостью 100,0 мл, растворяли в 0,1 моль/л растворе кислоты хлористоводородной и доводили объем раствора этим же растворителем до метки (стандартный раствор 3, концентрация 4000 мкг/мл). В мерную колбу емкостью 100,0 мл вносили из бюретки 18,00 мл стандартного раствора доксиламина сукцината 3 и доводили объем раствора 0,1 моль/л раствором кислоты хлористоводородной до метки (стандартный раствор 4, концентрация 720 мкг/мл). В мерную колбу емкостью 50,0 мл вносили 2,00 мл стандартного раствора доксиламина сукцината 4 и доводили объем раствора 0,1 моль/л раствором кислоты хлористоводородной до метки (раствор сравнения, концентрация – 28,8 мкг/мл).

*Калибровочные образцы:* 3 серии по 7 образцов (20,00 мл) модельной крови (матрица), полученной от 3 различных источников, в которые введено по 1,00 мл рабочих растворов 1–7 соответственно.

*Анализируемые растворы:* полученные по валидируемой методике [3] растворы для калибровочных образцов.

Измеряли оптическую плотность анализируемых растворов, модельных растворов и раствора сравнения по 3 раза с выниманием кюветы при длине волны 262 нм на спектрофотометре СФ-46 в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве компенсационного раствора использовали 0,1 моль/л раствор кислоты хлористоводородной.

### Результаты и их обсуждение

Ранее [5] мы проанализировали различные подходы к выбору аналитического диапазона применения и условий проверки линейности при проведении валидации биоаналитических методик, изложенные в международных документах: «Guidance for Industry: Bioanalytical method validation» (U.S. FDA, 2001) [6], «Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology» (SWGTOX, 2012) [7], «Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological

Specimens» (UNODC, 2009) [8] и «Guideline on validation of bioanalytical methods» (EMA, 2011) [9].

Как предлагают названные руководства оценивать полученные калибровочные модели, и в частности линейные зависимости, и на основании каких значений они предлагают принимать решение о пригодности данных моделей для дальнейшего использования валидируемой методики?

Нужно сказать, что ни один из указанных документов не приводит никаких конкретных цифр для параметров, характеризующих линейную зависимость, позволяющих оценить ее приемлемость. Лишь руководство UNODC [8] говорит о желательности того, чтобы коэффициент корреляции  $r$  составлял не менее 0,99. При этом сразу же оговаривается, что и методики с коэффициентом корреляции менее 0,99 могут быть пригодны для решения поставленных задач, поэтому одного только коэффициента корреляции недостаточно для доказательства, что существующая линейная зависимость является приемлемой, но дальше этого руководство не идет – конкретные предложения по определению дополнительных параметров линейности отсутствуют.

Руководство FDA [6] предлагает с этой целью рассчитывать так называемые «back-calculated» концентрации образцов, использованных для построения калибровочной модели, и выдвигает к ним такие требования:

- отклонение рассчитанной концентрации от номинальной для стандартного образца, соответствующего нижнему пределу количественного определения (НПКО), не должно превышать 20%;
- отклонения для стандартных образцов, отличных от НПКО, не должны превышать 15%.

При этом как минимум 4 из 6 стандартных образцов должны удовлетворять приведенным критериям, включая НПКО и стандартный образец самой высокой концентрации.

Руководство ЕМА [9] предлагает использовать такой же подход с такими же требованиями к отклонениям рассчитанных концентраций калибровочных образцов от их номинальной концентрации, но уже как минимум 75% стандартных образцов (но не менее 6 концентрационных уровней) должны удовлетворять данному критерию. В случае использования повторов критерию должны удовлетворять как минимум 50% калибровочных образцов. При этом разрешается отбрасывать значения измерений и концентрационные уровни, если они не удовлетворяют данным требованиям, и пересчитывать калибровочную модель заново без отброшенных значений. Если отбрасывается верхний или нижний концентрационный уровень, то исключается и вся последовательность измерений.

Кроме того, данный документ требует указывать параметры полученной калибровочной кривой – угол наклона и отрезок, отсекаемый от оси ординат – для всех приемлемых кривых, полученных в процессе валидации (но не менее трех). Однако в нем не приведены критерии для оценки такой приемлемости.

В руководстве SWGTOX [7] вводится критерий для

принятия решения о переходе от обработки кривой методом наименьших квадратов к методу взвешенных наименьших квадратов либо другой удовлетворительной нелинейной модели, но он весьма размытый – наличие значимой разницы между дисперсиями для самых низких и самых высоких концентрационных уровней. Какую разницу можно считать значимой, в документе не обсуждается. Предлагается также оценивать коэффициент корреляции (требования к его значению отсутствуют), но подчеркивается, что только этого недостаточно. Как вариант рассматривается визуальная оценка линейной модели с использованием графика остатков – случайное распределение остатков вокруг нулевой линии свидетельствует о приемлемости линейной модели.

Отечественные разработки [10, 11] в области валидации методик анализа лекарственных средств предусматривают весьма четкие и однозначные критерии приемлемости линейной зависимости в рамках разработанных стандартизованных процедур валидации.

Поэтому для формирования критериев приемлемости полученных линейных зависимостей при проведении валидации УФ-спектрофотометрических методик количественного определения для судебно-токсикологического анализа предлагаем опираться на упомянутые разработки и, в частности, на подходы к валидации методик в варианте метода калибровочного графика, изложенные в [10]. Выбор метода калибровочного графика продиктован преимущественным ориентированием всех изученных международных руководств [6–9] на работу именно этим методом.

В работе [5] предложили такую процедуру подтверждения линейности УФ-спектрофотометрических методик количественного определения аналитов в биологических жидкостях, применяемых в судебно-токсикологическом анализе:

- применение нормализованных координат (нормализация по раствору сравнения, оптическая плотность которого корректируется на величину recovery);
- диапазон применения – 25–125%, 25–150%, 25–175%; за 100% принимаем среднюю токсическую либо летальную концентрацию аналита в биологической жидкости;
- количество концентрационных уровней –  $g = 5, 6$  или  $7$  (в зависимости от выбранного диапазона применения) с постоянным шагом 25%;
- количество «повторов» – параллельных экспериментов – для каждого концентрационного уровня определяется на основании результатов расчета величины  $s_{\text{ном},r}$ , оценка приемлемости которой проводится по критерию:

$$s_{\text{ном},r}(\text{sample}) \leq \max s_{\text{ном},r} = 0,707 \cdot \max \Delta_{As} \cdot \sqrt{n} / t(95\%, n-1) \quad (1)$$

- каждый параллельный эксперимент проводят в рамках отдельной последовательности/дня на образцах биологической матрицы, полученной из одного источника;
- расчет параметров линейной зависимости проводится для каждой последовательности (within-run

(within-day) линейность) и по средним значениям параллельных опытов (between-run (between-day) линейность).

Согласно [10], полная неопределенность результатов анализа  $\Delta_{As}$  для метода калибровочного графика определяется несколькими факторами, среди которых главные:

- неопределенность, связанная с калибровочной прямой,  $\Delta_{cal}$ ; она вызвана неопределенностью параметров  $a$  и  $b$  калибровочной прямой  $Y_i = b \cdot X_i + a$ ; характеристикой этой неопределенности является остаточное стандартное отклонение  $RSD_0$ , которому соответствует доверительный интервал

$$\Delta_{cal} = t(95\%, g-2) \cdot RSD_0, \quad (2)$$

- величина которого не должна превышать максимально допустимую неопределенность калибровки  $\max \Delta_{cal}$ ; отсюда можно получить требования к  $RSD_0$ :

$$RSD_0 \leq \max RSD_0 = \max \Delta_{cal} / t(95\%, g-2); \quad (3)$$

- неопределенность, связанная непосредственно с испытуемым образцом,  $\Delta_{sample}$ ; она вызвана неопределенностью измерения его оптической плотности и пробоподготовки.

Поэтому полную неопределенность методики можно записать в виде [10, 11]:

$$\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{cal}^2 + \Delta_{sample}^2} \leq \max \Delta_{As} = 20\% [8]. \quad (4)$$

В работе [10] для нормирования величин  $\Delta_{cal}$  и  $\Delta_{sample}$  предложен подход, основанный на предположении их равенства:

$$\max \Delta_{cal} = \max \Delta_{sample}. \quad (5)$$

Тогда:

$$\max \Delta_{cal} = \max \Delta_{sample} \leq \max \Delta_{As} / \sqrt{2} = 0,707 \cdot \max \Delta_{As}, \quad (6)$$

$$RSD_0 \leq \max RSD_0 = 0,707 \cdot \max \Delta_{As} / t(95\%, g-2), \quad (7)$$

Определив диапазон применения методики, мы можем рассчитать  $RSD_{\text{range}}$  [11]:

$$RSD_{\text{range}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^g (X_i - \bar{X})^2}{g-1}}, \quad (8)$$

и, подставив полученные значения  $RSD_{\text{range}}$  и  $RSD_0$  в формулу [11]:

$$R_c = \sqrt{1 - \frac{RSD_0^2}{RSD_{\text{range}}^2}}, \quad (9)$$

получить требования к величине коэффициента корреляции  $R_c$ .

Результаты расчетов значений неопределенности анализа испытуемого образца  $\max \Delta_{sample}$ , остаточного стандартного отклонения  $\max RSD_0$  и коэффициента корреляции  $\min R_c$  для предложенных вариантов диапазонов применения методики приведены в *таблице 1*.

Данным критериям должны удовлетворять линейные зависимости, полученные и для каждой последовательности (within-run (within-day) линейность), и по средним значениям параллельных опытов (between-run (between-day) линейность).

**Критические значения валидационных характеристик линейности  
для предложенных диапазонов применения методики в варианте метода калибровочного графика**

Диапазон, шаг, $g$	$\max \Delta_{As}$	$\max \Delta_{cal} = \max \Delta_{sample}$	$RSD_{range}$	$t(95\%, g - 2)$	$\max RSD_0$	$\min R_c$
25–125% ( $g = 5$ )	20,00%	14,14%	39,53	2,3534	6,01	0,9884
25–150% ( $g = 6$ )			46,77	2,1318	6,63	0,9899
25–175% ( $g = 7$ )			54,01	2,0150	7,02	0,9915

Разработку методик количественного определения аналитов в биологических жидкостях на первом этапе проводят на модельных растворах (без матрицы) – строят линейную зависимость, рассчитывают параметры линейности и т. д. Этот процесс также должен быть каким-то образом регламентирован и должны быть выработаны критерии приемлемости линейной зависимости, полученной с использованием модельных растворов.

Что касается непосредственно процедуры подтверждения линейности по модельным растворам, то она должна быть максимально приближена к таковой для калибровочных образцов с использованием матрицы. Предлагаем такой порядок действий:

- применение нормализованных координат (нормализация по раствору сравнения);
- диапазон применения – 25–125%, 25–150%, 25–175%; за 100% принимаем среднюю токсическую либо летальную концентрацию аналита в биологической жидкости;
- модельные растворы готовят с использованием растворителя, в котором проводят спектрофотометрирование для калибровочных образцов; концентрация аналита в модельных растворах соответствует его концентрации в конечных спектрофотометрируемых растворах для калибровочных образцов при условии нулевых потерь;
- количество концентрационных уровней –  $g = 5, 6$  или  $7$  (в зависимости от выбранного диапазона применения) с постоянным шагом 25%;
- оптическую плотность модельных растворов измеряют в рамках одной последовательности по 3 раза с выниманием кюветы и используют для расчетов средние значения.

Неопределенность, связанная с калибровочной прямой,  $\Delta_{cal}$  для методик количественного определения аналитов в биологических жидкостях определяется:

- неопределенностью, связанной с процедурой пробоподготовки калибровочных образцов,  $\Delta_{calibrator\ preparation}$ ;
- неопределенностью, связанной с отклонениями от линейности калибровочной прямой, построенной

по модельным растворам;

- $\Delta_{cal}^{model}$ ; характеристика этой неопределенности – остаточное стандартное отклонение  $RSD_0^{model}$ , которому соответствует доверительный интервал:

$$\Delta_{cal}^{model} = t(95\%, g - 2) \cdot RSD_0^{model} \quad (10)$$

- его величина не должна превышать максимально допустимую неопределенность калибровки по модельным растворам  $\max \Delta_{cal}^{model}$ ; отсюда можно получить требования к  $RSD_0^{model}$ :

$$RSD_0^{model} \leq \max RSD_0^{model} = \max \Delta_{cal}^{model} / t(95\%, g - 2). \quad (11)$$

Поэтому полную неопределенность, связанную с калибровочной прямой,  $\Delta_{cal}$  можно записать в виде [11]:

$$\Delta_{cal} = \sqrt{(\Delta_{cal}^{model})^2 + \Delta_{calibrator\ preparation}^2} \leq \max \Delta_{cal} = 14,14\%. \quad (12)$$

Для нормирования величины  $\Delta_{cal}^{model}$  можно предложить 2 подхода.

*Подход 1:* неопределенность, связанная с процедурой пробоподготовки калибровочных образцов, равна неопределенности калибровочной прямой, построенной по модельным растворам, т. е.:

$$\max \Delta_{cal}^{model} = \max \Delta_{calibrator\ preparation} \quad (13)$$

Тогда:

$$\max \Delta_{cal}^{model} = \max \Delta_{calibrator\ preparation} \leq \max \Delta_{cal} / \sqrt{2} = 0,707 \cdot \max \Delta_{cal}. \quad (14)$$

$$RSD_0^{model} \leq \max RSD_0^{model} = 0,707 \cdot \max \Delta_{cal} / t(95\%, g - 2). \quad (15)$$

*Подход 2:* неопределенность калибровочной прямой, построенной по модельным растворам, незначима по сравнению с общей неопределенностью калибровочной прямой, т. е.:

$$\Delta_{cal}^{model} \leq \max \Delta_{cal}^{model} = 0,32 \cdot \max \Delta_{cal}, \quad (16)$$

$$RSD_0^{model} \leq \max RSD_0^{model} = 0,32 \cdot \max \Delta_{cal} / t(95\%, g - 2). \quad (17)$$

Определив диапазон применения методики, рассчитав  $RSD_{range}$  и воспользовавшись формулой (9), можем получить требования к величине коэффициента корреляции  $R_c^{model}$  для обоих подходов.

Результаты расчетов значений неопределенности калибровки по модельным растворам  $\max \Delta_{cal}^{model}$ , остаточного стандартного отклонения  $\max RSD_0^{model}$  и коэффициента корреляции  $\min R_c^{model}$  для предложенных вариантов диапазонов применения методики и обоих подходов приведены в *таблице 2*.

Таблица 2

**Критические значения валидационных характеристик линейности по модельным растворам  
для предложенных диапазонов применения методики в варианте метода калибровочного графика**

Диапазон, шаг, $g$	$\max \Delta_{cal}$	$RSD_{range}$	$t(95\%, g - 2)$	Подход 1			Подход 2		
				$\max \Delta_{cal}^{model}$	$\max RSD_0^{model}$	$\min R_c^{model}$	$\max \Delta_{cal}^{model}$	$\max RSD_0^{model}$	$\min R_c^{model}$
25–125% ( $g = 5$ )	14,14%	39,53	2,3534	10,00%	4,25	0,9942	4,52%	1,92	0,9988
25–150% ( $g = 6$ )		46,77	2,1318		4,69	0,9950		2,12	0,9990
25–175% ( $g = 7$ )		54,01	2,0150		4,96	0,9958		2,24	0,9991

Данным критериям должны удовлетворять линейные зависимости, полученные с использованием модельных растворов.

Апробацию предложенных подходов к оценке приемлемости линейных зависимостей, полученных с использованием калибровочных образцов и модельных растворов, проводили на примере УФ-спектрофотометрической методики количественного определения доксиламина в кро-

ви [3]; за 100% принимали летальную концентрацию доксиламина в крови [13] – 25 мг/л (что соответствует 36 мг/л доксиламина сукцината).

В таблицах 3–5 приведены результаты измерения значений оптической плотности калибровочных образцов и модельных растворов. Фактические концентрации доксиламина сукцината в крови и в модельных растворах, а также соответствующие им значения оптической плотности нормализованы предложенным выше способом.

Таблица 3

Результаты измерения оптической плотности модельных растворов доксиламина сукцината

№ модельного раствора	Теоретическая концентрация доксиламина сукцината в модельном растворе		Фактическая концентрация доксиламина сукцината в модельном растворе ( $C_{st} = 28,8$ мкг/мл)		Оптическая плотность ( $A_{st} = 0,801$ )	Найдено в % к стандартной оптической плотности $Y_i^{model}$ , %
	$X_{i,theor}^{model}$ , %	$C_{i,theor}^{model}$ , мкг/мл	$C_{i,fact}^{model}$ , мкг/мл	$X_{i,fact}^{model}$ , %		
1	25	7,20	8,00	27,78	0,226	28,21
2	50	14,40	16,00	55,56	0,444	55,43
3	75	21,60	24,00	83,33	0,657	82,02
4	100	28,80	32,00	111,11	0,890	111,11
5	125	36,00	40,00	138,89	1,121	139,95
6	150	43,20	48,00	166,67	1,348	168,29
7	175	50,40	52,00	180,56	1,421	177,40

Таблица 4

Результаты измерения оптической плотности калибровочных образцов для УФ-спектрофотометрической методики количественного определения доксиламина в крови без предварительной ТСХ-очистки

№ образца крови	Теоретическая концентрация доксиламина в крови		Теоретическая концентрация доксиламина сукцината в крови $C_{i,theor}$ , мкг/мл	Фактическая концентрация доксиламина сукцината в крови $C_{i,fact}$ , мкг/мл ( $C_{st} = 36$ мкг/мл)	Фактическая концентрация доксиламина сукцината в крови $X_{i,fact}$ , %	Оптические плотности				Найдено в % к стандартной оптической плотности $Y_i$ , % ( $A_s = \frac{A_{reference} \cdot R}{100} = 0,532$ )			
	$X_{i,theor}$ , %	$C_{i,theor}$ , мкг/мл				1-й день	2-й день	3-й день	$\bar{A}$	1-й день	2-й день	3-й день	$\bar{Y}$
1	25	6,25	9,00	10,00	27,78	0,222	0,195	0,205	0,207	41,73	36,65	38,53	38,91
2	50	12,50	18,00	20,00	55,56	0,368	0,347	0,352	0,356	69,17	65,23	66,17	66,92
3	75	18,75	27,00	30,00	83,33	0,545	0,526	0,537	0,536	102,44	98,87	100,94	100,75
4	100	25,00	36,00	40,00	111,11	0,662	0,644	0,654	0,653	124,44	121,05	122,93	122,74
5	125	31,25	45,00	50,00	138,89	0,795	0,779	0,783	0,786	149,44	146,43	147,18	147,74
6	150	37,50	54,00	60,00	166,67	0,986	0,970	0,979	0,978	185,34	182,33	184,02	183,83
7	175	43,75	63,00	65,00	180,56	1,021	1,008	1,015	1,015	191,92	189,47	190,79	190,79

Таблица 5

Результаты измерения оптической плотности калибровочных образцов для УФ-спектрофотометрической методики количественного определения доксиламина в крови с предварительной ТСХ-очисткой

№ образца крови	Теоретическая концентрация доксиламина в крови		Теоретическая концентрация доксиламина сукцината в крови $C_{i,theor}$ , мкг/мл	Фактическая концентрация доксиламина сукцината в крови $C_{i,fact}$ , мкг/мл ( $C_{st} = 36$ мкг/мл)	Фактическая концентрация доксиламина сукцината в крови $X_{i,fact}$ , %	Оптические плотности				Найдено в % к стандартной оптической плотности $Y_i$ , % ( $A_s = \frac{A_{reference} \cdot R}{100} = 0,510$ )			
	$X_{i,theor}$ , %	$C_{i,theor}$ , мкг/мл				1-й день	2-й день	3-й день	$\bar{A}$	1-й день	2-й день	3-й день	$\bar{Y}$
1	25	6,25	9,00	10,00	27,78	0,159	0,147	0,151	0,152	31,18	28,82	29,61	29,80
2	50	12,50	18,00	20,00	55,56	0,297	0,295	0,287	0,293	58,24	57,84	56,27	57,45
3	75	18,75	27,00	30,00	83,33	0,415	0,420	0,410	0,415	81,37	82,35	80,39	81,37
4	100	25,00	36,00	40,00	111,11	0,583	0,579	0,573	0,578	114,31	113,53	112,35	113,33
5	125	31,25	45,00	50,00	138,89	0,704	0,698	0,695	0,699	138,04	136,86	136,27	137,06
6	150	37,50	54,00	60,00	166,67	0,882	0,874	0,877	0,878	172,94	171,37	171,96	172,16
7	175	43,75	63,00	65,00	180,56	0,937	0,931	0,929	0,933	183,73	182,55	182,16	182,94

Таблица 6

**Метрологические характеристики калибровочных прямых  $Y = b \cdot X + a$ ,  
полученных с использованием модельных растворов доксиламина сукцината**

Аналитический диапазон применения методики		Характеристика					
		$b^{model}$	$s_b^{model}$	$a^{model}$	$s_a^{model}$	$RSD_0^{model}$	$R_c^{model}$
$D = 25 - 125\%$ ( $g = 5$ )		1,005	0,011	-0,407	1,022	0,974	0,9998
Критерий приемлемости	подход 1	-	-	-	-	$\leq 4,25$	$\geq 0,9942$
	подход 2	-	-	-	-	$\leq 1,92$	$\geq 0,9988$
$D = 25 - 150\%$ ( $g = 6$ )		1,011	0,008	-0,805	0,874	0,939	0,99987
Критерий приемлемости	подход 1	-	-	-	-	$\leq 4,69$	$\geq 0,9950$
	подход 2	-	-	-	-	$\leq 2,12$	$\geq 0,9990$
$D = 25 - 175\%$ ( $g = 7$ )		0,995	0,012	0,321	1,498	1,724	0,9996
Критерий приемлемости	подход 1	-	-	-	-	$\leq 4,96$	$\geq 0,9958$
	подход 2	-	-	-	-	$\leq 2,24$	$\geq 0,9991$

Таблица 7

**Метрологические характеристики калибровочных прямых  $Y = b \cdot X + a$   
для УФ-спектрофотометрической методики количественного определения доксиламина  
в крови без предварительной ТСХ-очистки**

Аналитический диапазон применения методики		Характеристика					
		$b$	$s_b$	$a$	$s_a$	$RSD_0$	$R_c$
$D = 25-125\%$ ( $g = 5$ )	1-й день	0,975	0,038	16,234	3,507	3,344	0,9977
	2-й день	0,991	0,040	11,029	3,687	3,515	0,9976
	3-й день	0,987	0,045	12,929	4,161	3,967	0,9969
	среднее	0,985	0,041	13,365	3,769	3,593	0,9974
Критерий приемлемости		-	-	-	-	$\leq 6,01$	$\geq 0,9884$
$D = 25-150\%$ ( $g = 6$ )	1-й день	1,009	0,032	14,006	3,446	3,702	0,9980
	2-й день	1,023	0,032	9,007	3,439	3,694	0,9981
	3-й день	1,021	0,036	10,713	3,846	4,131	0,9976
	среднее	1,017	0,033	11,242	3,546	3,809	0,9979
Критерий приемлемости		-	-	-	-	$\leq 6,63$	$\geq 0,9899$
$D = 25-175\%$ ( $g = 7$ )	1-й день	0,993	0,026	15,102	3,146	3,621	0,9983
	2-й день	1,007	0,026	10,084	3,132	3,605	0,9984
	3-й день	1,005	0,028	11,808	3,453	3,974	0,9980
	среднее	1,002	0,026	12,309	3,210	3,694	0,9983
Критерий приемлемости		-	-	-	-	$\leq 7,02$	$\geq 0,9915$

Таблица 8

**Метрологические характеристики калибровочных прямых  $Y = b \cdot X + a$  для УФ-спектрофотометрической  
методики количественного определения доксиламина в крови с предварительной ТСХ-очисткой**

Аналитический диапазон применения методики		Характеристика					
		$b$	$s_b$	$a$	$s_a$	$RSD_0$	$R_c$
$D = 25-125\%$ ( $g = 5$ )	1-й день	0,971	0,029	3,688	2,626	2,504	0,9987
	2-й день	0,978	0,023	2,346	2,109	2,011	0,9992
	3-й день	0,970	0,024	2,155	2,205	2,102	0,9991
	среднее	0,973	0,024	2,679	2,204	2,102	0,9991
Критерий приемлемости		-	-	-	-	$\leq 6,01$	$\geq 0,9884$
$D = 25-150\%$ ( $g = 6$ )	1-й день	1,009	0,029	1,231	3,111	3,342	0,9984
	2-й день	1,009	0,023	0,361	2,507	2,693	0,9989
	3-й день	1,012	0,029	-0,564	3,121	3,352	0,9984
	среднее	1,011	0,027	0,268	2,875	3,089	0,9986
Критерий приемлемости		-	-	-	-	$\leq 6,63$	$\geq 0,9899$
$D = 25 - 175\%$ ( $g = 7$ )	1-й день	1,010	0,021	1,158	2,598	2,991	0,9989
	2-й день	1,009	0,017	0,361	2,093	2,409	0,9993
	3-й день	1,012	0,021	-0,572	2,605	2,998	0,9989
	среднее	1,011	0,020	0,220	2,401	2,763	0,9990
Критерий приемлемости		-	-	-	-	$\leq 7,02$	$\geq 0,9915$

Полученные величины  $X_p$ , % и  $Y_p$ , % использованы для построения линейных зависимостей вида  $Y = b \cdot X + a$ , результаты расчета параметров линейности методом наименьших квадратов [12] представлены в *таблицах 6–8*.

Из приведенных в *таблице 6* данных видно, что требования *таблицы 2* к остаточному стандартному отклонению  $RSD_0^{model}$  и коэффициенту корреляции  $R_c^{model}$  выполняются для предложенных вариантов диапазонов применения методики в обоих подходах. Требования *таблицы 1* к остаточному стандартному отклонению  $RSD_0$  и коэффициенту корреляции  $R_c$  для предложенных вариантов диапазонов применения методики также выполняются, о чем свидетельствуют данные *таблиц 7, 8*.

### Выводы

Предлагаем такие критерии и порядок оценки приемлемости линейности УФ-спектрофотометрических методик количественного определения аналитов в биологических жидкостях, применяемых в судебно-токсикологическом анализе:

- оценку приемлемости параметров линейной зависимости проводят в 2 этапа: для прямых, полученных с использованием модельных растворов (без матрицы), и калибровочных образцов соответственно;

- для оценки параметров линейной зависимости, полученной с использованием модельных растворов, предложены два подхода, основанные на предположении равенства неопределенности, связанной с процедурой пробоподготовки калибровочных образцов, и неопределенности калибровочной прямой, построенной по модельным растворам, а также на предположении незначимости неопределенности калибровочной прямой, построенной по модельным растворам. Для обоих подходов предложены критерии приемлемости для остаточного стандартного отклонения  $RSD_0^{model}$  и коэффициента корреляции  $R_c^{model}$ ;
- для оценки параметров линейной зависимости, полученной с использованием калибровочных образцов, предложено исходить из предположения о равенстве неопределенности калибровки и неопределенности измерения оптической плотности и пробоподготовки испытуемого образца. В рамках данного подхода предложены критерии приемлемости для остаточного стандартного отклонения  $RSD_0$  и коэффициента корреляции  $R_c$ . Этим критериям должны удовлетворять параметры within-run (within-day) и between-run (between-day) линейности.

### Список литературы

1. Клименко Л.Ю. Анализ подходов к определению специфичности/селективности при проведении валидации аналитических методик в судебно-токсикологическом анализе / Л.Ю. Клименко, Г.П. Петюнин // Украинский медицинский альманах. – 2013. – Т. 16. – № 1. – С. 47–49.
2. 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. – С. 53–56.
3. 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 // Украинский журнал клінічної та лабораторної медицини. – 2013. – Т. 8. – № 4. – С. 191–199.
4. Validation of UV-spectrophotometric methods of quantitative determination in forensic and toxicological analysis: recovery / [L.Yu. Klimenko, S.M. Trut, G.P. Petyunin, I.M. Ivanchuk] // Фармация Казахстана. – 2013. – № 12. – С. 42–48.
5. Validation of UV-spectrophotometric methods of quantitative determination in forensic and toxicological analysis: linearity and range / [L.Yu. Klimenko, S.M. Trut, G.P. Petyunin, E.Yu. Akhmedov] // Фармацевтический часопис. – 2014. – № 1(30). – С. 41–52.
6. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation / U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). – Washington, DC : U.S. Government Printing Office, 2001. – 22 p.
7. Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology (draft) / Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX). – 2012. – 52 p.
8. Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens / United Nations Office on Drugs and Crime, Laboratory and Scientific Section. – New York : United Nations, 2009. – 70 p.
9. Guideline on bioanalytical method validation / European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). – London, 2009. – 22 p.

10. Гризодуб А.И. Стандартизованная процедура валидации методик атомно-абсорбционного количественного определения лекарственных средств в варианте калибровочного графика / А.И. Гризодуб, О.Л. Левашова, Г.И. Борщевский // Фармаком. – 2011. – № 4. – С. 5–26.
11. Гризодуб А.И. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств / А.И. Гризодуб // Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств : в 3 т. / [под ред. чл.-кор. НАН Украины В.П. Георгиевского]. – Харьков : НТМТ, 2011. – Т. 3. – 520 с.
12. Дерффель К. Статистика в аналитической химии : пер. с нем. / К. Дерффель. – М. : Мир, 1994. – 268 с.
13. Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material / [Eds A.C. Moffat, M.D. Osselton, B. Widdop]. – 4th ed. – London : The Pharm. Press, 2011. – 2609 p.

### References

1. Klimenko, L. Yu., & Petyunin, G. P. (2013) Analiz podkhodov k opredeleniyu specifichnosti/selektivnosti pri provedenii validacii analiticheskikh metodik v sudebno-toksikologicheskom analize [Analysis of approaches to determination of specificity/selectivity when carrying out the validation of analytical methods in forensic and toxicological analysis]. *Ukrainskyi medychnyi almanakh*, 16(1), 47–49. [in Ukrainian].
2. Klimenko, L. Yu., Petyunin, G. P., & Kostina, T. A. (2013) Podhody k opredeleniyu specifichnosti/selektivnosti pri validacii UF-spektrifotometricheskikh metodik kolichestvennogo opredeleniya v sudebno-toksikologicheskom analize [Approaches to determination of specificity/selectivity when validating UV-spectrophotometric methods of quantitative determination in forensic and toxicological analysis]. *Farmaciya Kazakhstana*, 8, 53–56. [in Kazakhstan].
3. Klimenko, L. Yu., Trut, S. M., Petyunin, G. P., & Ivanchuk, I. M. (2013) Modifikaciya i validaciya UF-spektrifotometricheskoy metodiki kolichestvennogo opredeleniya doxylamina v krvi: specifichnost'/selektivnost' [Modification and validation of UV-spectrophotometric method of doxylamine quantitative determination in blood: specificity/selectivity]. *Ukrains'kyi zhurnal klinichnoi ta laboratornoi medytsyny*, 8(4), 191–199. [in Ukrainian].

4. Klimenko, L. Yu., Trut, S. M., Petyunin, G. P., & Ivanchuk, I. M. (2013) Validation of UV-spectrophotometric methods of quantitative determination in forensic and toxicological analysis: recovery. *Farmaciya Kazakhstana*, 12, 42–48. [in Kazakhstan].
5. Klimenko, L. Yu., Trut, S. M., Petyunin, G. P., & Akhmedov, E. Yu. (2014) Validation of UV-spectrophotometric methods of quantitative determination in forensic and toxicological analysis: linearity and range. *Farmatsevtichnyi chasopys*, 30(1), 41–52.
6. (2001) *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). Washington, DC: U.S. Government Printing Office.
7. (2012) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology (draft). Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX).
8. (2009) *Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens*. United Nations Office on Drugs and Crime, Laboratory and Scientific Section. New York: United Nations.
9. (2009) *Guideline on bioanalytical method validation*. European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). London.
10. Gryzodub, O. I., Levashova, O. L., & Borshhevskiy, G. I. (2011) Standartizovannaya procedura validacii metodik atomno-absorbciionnogo kolichestvennogo opredeleniya lekarstvennykh sredstv v variante kalibrovochnogo grafika [Standardized validation procedure for atomic absorption assays of medicines using calibration line]. *Farmakom*, 4, 5–26. [in Ukrainian].
11. Gryzodub, O. I. (2011) Standartizovannyye procedury validacii metodik kontrolya kachestva lekarstvennykh sredstv [Standardized validation procedures for methods of medicines quality control]. *Analiticheskaya khimiya v sozdanii, standartizacii i kontrole kachestva lekarstvennykh sredstv – Analytical Chemistry in the Development, Standardization and Quality Control of Medications*. Kharkiv: HTMT, 2011, (3), 934–1063. [in Ukrainian].
12. Doerffel, K. (1994) *Statistika v analiticheskoy khimii* [Statistics in analytical chemistry]. Moscow: Mir. [in Russian].
13. Moffat, A. C., Osselton, M. D., & Widdop B. (2011) *Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material*. London: Pharmaceutical Press.

**Сведения об авторах:**

Клименко Л.Ю., к. фарм. н., доцент, доцент каф. аналитической химии, Национальный фармацевтический университет, E-mail: lynnne2@ukr.net.

Петюнин Г.П., д. фарм. н., профессор, зав. каф. клинической биохимии, судебно-медицинской токсикологии и фармации, Харьковская медицинская академия последипломного образования.

Трут С.Н., зам. генерального директора, ГП «Укрвакцина» МЗ Украины.

Мороз В.П., к. фарм. н., доцент каф. аналитической химии, Национальный фармацевтический университет.

Надійшла в редакцію 25.02.2014 р.