

УДК 619: 578. 825: 636.085.3 + 636.085. 57

**Назар Б. І., к. вет. н ©***Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок, м. Львів***ВАЛІДАЦІЯ КІЛЬКІСНОГО МЕТОДУ, НА  
ОСНОВІ АНАЛІЗУВАННЯ НУКЛЕЙНОВИХ КИСЛОТ ДЛЯ  
ВИЯВЛЕННЯ ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНИХ ОРГАНІЗМІВ І  
ПРОДУКТІВ З ЇХ УМІСТОМ**

*Проведено валідацію методики кількісного визначення генетично модифікованих організмів і продуктів з їх умістом. У ході проведення дослідження були визначені основні валідаційні параметри: збіжність (повторюваність), специфічність, точність, правильність, ступінь відповідності та близькості, відтворюваність методу, лінійність, робастність. Отримані результати свідчать про те, що наведена методика відповідає сучасним критеріям до аналітичних методик кількісного визначення і дозволяє об'єктивно визначити вміст генетично модифікованих організмів і продуктів з їх умістом.*

Термін валідація (англ. Validation) використовується в різних сферах діяльності людини в кількох розуміннях. Ключовим моментом валідації є порівняння реальних вимог з задекларованими для досягнення певної мети, визнання будь-чого законним, дійсним. Валідація – це процедура, що дає високу міру упевненості в тому, що конкретний метод (в межах встановлених параметрів) володіє збіжністю (повторюваністю) і послідовно приводить до очікуваних результатів, встановлених критеріїв прийнятності з метою доказу і надання документального свідчення. Валідація аналітичних методів полягає у визначенні: збіжності (повторюваності), специфічності, точності, правильності, ступеня відповідності та близькості, відтворюваності, (міжлабораторній відтворюваність), лінійності, робастності і інших метрологічних характеристик. Відповідно до ISO 9000:2005 валідацією є підтвердження на основі подання об'єктивних свідчень того, що вимоги, призначені для конкретного використання або застосування, точно і в повному обсязі виконані, а мета досягнута.

Вимоги до процедури валідації аналітичних методик викладені в ряді документів ВООЗ, прийнятих в 90-х роках ХХ століття, і в Державній Фармакопеї України. Аналітична методика повинна давати результати, не обтяжені значущою систематичною помилкою при достатній збіжності результатів як у тих лабораторіях, в яких аналітична методика була належним

чином передана, так і в тих, які отримали тільки зразки препарату та аналітичні нормативні документи (АНД).

**Матеріали і методи.** У ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок, у лабораторіях контролю кормових добавок та преміксів, а також інструментальних методів, котрі мають лабораторії ПЛР, було проведено валідацію (в подальшому В.) кількісного методу виявлення вмісту ГМ джерела у дослідних зразках з внесенням досліджуваних компонентів (соєвого шроту лінії GTS 40-3-2) у кількості 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 5,0 % методом полімеразно ланцюгової реакції в реальному часі з використанням принципів, викладених у ДСТУ ISO 21570:2005. Обидві лабораторії отримали набір праймерів, еталонів та екстракт ДНК сої GTS 40-3-2. Було розроблено основний план валідації методу виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їх умістом, який вказував, які об'єкти підлягають В., визначав характер і масштаби випробування щодо кожного об'єкта, описував у загальних рисах методики випробувань та протоколи, функціональні обов'язки персоналу, встановлював обов'язки щодо складання звітів та вимоги до документування роботи і результатів. У валідаційних звітах з окремих операцій робили посилання на протоколи В. конкретного аналізу, узагальнювали одержані результати вимірювань, пояснювали знайдені відхилення, наводили рекомендації щодо їх виправлення та поліпшення.

Для основного устаткування (приладу ПЛР в реальному часі) було заведено журнали, за необхідності записуючи в них всі роботи з В., калібрування, технічного обслуговування, очищення та ремонту, із зазначенням дати та осіб, які виконали ці роботи. У журналах у хронологічному порядку також реєстрували використання найважливішого устаткування. При проведенні валідації використовували концепцію оцінки невизначеності результатів аналізу, що дозволяло критерії прийнятності пов'язати з рівнем довірчої ймовірності, які звичайно використовують в аналітичній хімії (95 %). Для оцінки результатів використовували нормалізовану систему координат. Це дозволяло пред'являти науково обґрунтовані вимоги до параметрів лінійності (коефіцієнт кореляції, залишкове відхилення), до характеристик правильності і прецизійності, робастності та інших, які не залежать від масштабу досліджуваних величин.

На базі ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок було проведено внутрішньолaboratorну відтворюваність (within-laboratory reproducibility), яка відображає здатність методу надавати повторювані результати з незначним статистичним відхиленням під впливом незначних змін (заміна реактивів, зміна температури приміщення, проведення дослідження в інший день, на іншому приладі і т.д.). Перед проведенням контролю внутрішньолaboratorної відтворюваності було встановлено два фактори, які можуть впливати на кінцевий результат дослідження, а саме: заміна реактивів та зміна температура приміщення.

**Результати досліджень.** У результаті проведених досліджень встановлено, що методи відтворювані. Похибка при визначенні концентрації ГМ джерела становила від 15 до 60 %, що достаньо для проведення інтерпретації результатів досліджень даного джерела.

Нами проводились вивчення збіжності (повторюваності, Repeatability) – це характеристика результатів вимірювань, яка відображає близькість один до одного результатів повторних спостережень, проведених в однакових умовах і є мірою коливань вибірки даних навколо центрального значення. Було проведено 10 визначень у приготуєних експериментальних зразках комбікорму та БВМД з внесенням до їхнього складу різного процентного вмісту шроту соєвого, виготовленого із генетично модифікованої сої лінії GTS 40-3-2.

Проведено визначення “специфічності” як здатності однозначно оцінювати аналізовану речовину в присутності інших компонентів, які можуть бути у зразку. Це могли бути домішки, продукти розкладу, допоміжні речовини тощо. Недолік специфічності випробування був компенсований іншим (іншими) додатковими випробуваннями. Специфічність для різних типів випробувань означає проведення ідентифікації — доказ того, що ідентифіковано саме аналізовану речовину.

При проведенні кількісного визначення було підтверджено те, що методика дозволяє точно і правильно встановити вміст або активність саме аналізованої речовини у зразку. При цьому було враховано правильність досліджень, що характеризує ступінь відповідності між відомим справжнім значенням або довідковою величиною і значенням, одержаним за цією методикою. Також враховували точність аналітичної методики, що виражає ступінь близькості (або ступінь розбіжності) результатів для серії вимірювань, виконаних за даною методикою на різних пробах одного й того ж однорідного зразка. Вона розглядалась на трьох рівнях: збіжність, внутрішньо-лабораторна точність і відтворюваність. Точність визначали на вірогідно однорідних зразках. Точність аналітичної методики характеризувалась відхиленням, стандартним відхиленням або відносним стандартним відхиленням для серії вимірювань.

Було досліджено збіжність вимірювань, що характеризує точність методики при її виконанні в одних і тих же умовах (зокрема, одним і тим самим аналітиком або групою аналітиків) протягом невеликого періоду. При вивченні точності було виконано 9 визначень, що охоплювали діапазон застосування методики, та 6 визначень для зразків із вмістом аналізованої речовини, близьким до номінального. Нами встановлювалась внутрішньо-лабораторна точність, котра характеризує вплив внутрішньолабораторних варіацій: різні дні, різні аналітики, різне обладнання і подібні зміни. Крім цього звертали увагу на відтворюваність методу, що характеризує точність у міжлабораторному експерименті, оскільки на стадії розробки методики зазвичай складно провести міжлабораторні дослідження. Для характеристики відтворюваності застосовували прогноз невизначеності методики аналізу, який ґрунтується на фармакопейних вимогах (або вимогах АНД) до обладнання й аналітичного

посуду. Бралась до уваги межа виявлення (МВ) для конкретної аналітичної методики — мінімальна кількість аналізованої речовини у зразку, яка може бути виявлена (при цьому не обов'язково було визначене точне значення). Була встановлена межа кількісного визначення (МКВ) для аналітичної методики — мінімальна кількість аналізованої речовини у зразку, яка може бути кількісно визначена з необхідною правильністю і точністю. МКВ є валідаційною характеристикою методик кількісного визначення низьких концентрацій речовин у зразку і розглядається в основному при визначенні домішок і/або продуктів розкладу. Для визначення МКВ застосовували ті ж підходи, що й для МВ. Крім цього, вивчали лінійність — здатність методики (у межах діапазону застосування) давати величини, прямо пропорційні концентрації (кількості) аналізованої речовини у зразку.

Нами вивчалась робастність методу — здатність аналітичної методики не зазнавати впливу малих заданих (контрольованих) аналітиком змін в умовах виконання методики. Зокрема, вивчали стійкість у часі аналітичних розчинів, час екстракції тощо. Виявили, що на результати досліджень можуть впливати: різниця в досвіді аналітиків; умови навколишнього середовища (температура, вологість), реактиви (різні постачальники). Отримані дані подано в таблиці 1.

Таблиця 1

Дані валідування кількісного визначення специфічної конструкції гена сої лінії GTS 40-3-2

Показники	Масова частка (%)				
	0,1	0,3	0,5	1	5,0
Кількість лабораторій, що приймали участь	2	2	2	2	2
Середнє значення ГМО (відхил від значення)	0,1 +6,1	0,3 +9,7	0,6 +20,0	1,1 +10,2	5,2 +16,3
Стандартний відхил для повторюваності, s	0,018	0,057	0,113	0,386	0,769
Межа повторюваності, r	0,052	0,112	0,278	1,672	1,894
Стандартний відносний відхил для повторюваності	0,018	0,086	0,145	0,186	0,865
Межа відтворюваності, R	0,051	0,187	0,538	1,764	2,678
Відносний стандартний відхил для відтворюваності	12,6	14,4	14,9	11,2	11,1

Зведений валідаційний звіт містив усі дані, результати та оцінку всієї програми з В., а також висновки та пропозиції щодо удосконалення проведених досліджень. Результати, як правило, подавали у вигляді звітів. Згідно з Настановою 42-01-2001, (п. 5.4.), було оформлено письмові методики та протоколи виконаних дій або зроблених висновків з В., що належать до них.

#### Висновки:

Проведено валідацію кількісного методу виявлення вмісту ГМ джерела у дослідних зразках з внесенням досліджуваних компонентів

(соєвого шроту GTS 40-3-2) у кількості 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 5,0 % методом полімеразно ланцюгової реакції у реальному часі з використанням принципів, викладених у ДСТУ ISO 21569-21570:2008.

#### Література

1. Гризодуб А.И. Валидация спектрофотометрических методик количественного анализа лекарственных средств в соответствии с требованиями ГФУ // Фармаком. — 2002. — № 3. С. 26-28;

2. ДСТУ ISO 21570:2008 Продукти харчові. Методи виявлення генетично модифікованих організмів і продуктів з їхнім вмістом. Кількісний метод на основі аналізу нуклеїнової кислоти, Київ: Держспоживстандарт України, 2009. – С. 18, 24.

#### Summary

**STATE SCIENTIFIC-RESEARCH CONTROL INSTITUTE OF  
VETERINARY MEDICAL PRODUCTS AND FODDER ADDITIVES  
THE VALIDATION OF THE QUANTITATIVE METHOD ON THE BASIS  
OF NUCLEIC ACIDS' ANALYSIS FOR DETECTION OF THE  
GENETICALLY MODIFIED OBJECTS AND GMOS COMPRISED  
PRODUCTS**

*Authors have validated the method for GMO quantitation. As a result of research was determined and described following validation parameters: robustness, linearity and precision in the whole range of the method's application. Besides, there have been got results which are evidence of method's conformity to the modern criteria for quantification analytical procedures. These results allow impartially determinate content of genetically modified objects and GMOs comprised products.*

Рецензент – д.с.-г.н., професор Буцяк В.І.