

УДК 661.12:658.562:615.07

В.Е. Доброва, Л.Н. Малоштан, Е.В. Должикова

Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ В ПРОБАХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ ГЛЮКОЗООКСИДАЗНЫМ МЕТОДОМ С ПОМОЩЬЮ АНАЛИЗАТОРА-ФОТОМЕТРА БИОХИМИЧЕСКОГО «BPC BioSED»

Рассмотрены процедура валидации биоаналитической методики определения глюкозы с помощью биохимического анализатора. Проведена аттестация данной методики в Проблемной лаборатории морфофункциональных исследований Национального фармацевтического университета. Рассмотрены тесты, применяемые при этом, и приведены результаты экспериментальных оценок. Доказано, что методика определения глюкозы в биопробах с помощью анализатора-фотометра биохимического «BPC BioSED» соответствует регламентированным характеристикам и критериям, а измеренные с помощью нее параметры соответствуют должным.

Ключевые слова: валидационная процедура, биоаналитическая методика, критерии соответствия, неопределенность измерений.

Ведение

В соответствии с требованиями стандарта ГОСТУ ISO/IEC 17025 (п. 5.4.5) каждая исследовательская лаборатория (ИЛ) должна подтверждать правильность использования стандартизированных методов исследований. Необходимо оценивать пригодность методов, разработанных в лаборатории и не стандартизированных, а также стандартизированных методов, используемых вне сферы их прямого назначения или при их модификации [1]. Эти требования обуславливают необходимость проведения валидации (оценки пригодности) методов, используемых в ИЛ.

Анализ литературных источников показал, что для оценки пригодности химико-аналитических методов разработано достаточное количество стандартизированных методик и регламентов, в то время как валидация биоаналитических методик не имеет четких методических рекомендаций и положений [2 – 4].

Основной материал

Учитывая требования стандарта ГОСТУ ISO/IEC 17025 и актуальность поставленных задач, в Проблемной лаборатории морфофункциональных исследований Национального фармацевтического университета (ПЛМИ НФаУ) была разработана валидационная процедура для оценки пригодности биоаналитических методик. Руководствуясь этой процедурой проведена валидация методики определения глюкозы в пробах биологической жидкости глюкозооксидазным методом с помощью анализатора-фотометра биохимического «BPC BioSED».

Цель валидации:

1) подтверждение на базе объективных доказательств того, что методика удовлетворяет установленным критериям, а измеренные с помощью нее параметры соответствуют должным;

2) определение характеристик методики: стандартной неопределенности, расширенной стандартной неопределенности.

Задачи валидации:

- 1) детализировать требования к данной биоаналитической методике;
- 2) определить характеристики методики;
- 3) проверить соответствие методики установленным требованиям;
- 4) в случае выявления несоответствий определить их причины и пути устранения.

Перечень тестов, выбранных для проведения валидации. В качестве основных тестов для проведения валидации данной методики внутри одной лаборатории были выбраны следующие: определение специфичности методики, оценка внутрилабораторной сходимости и воспроизводимости, правильности методики, ее линейности и определение неопределенности измерений. Для каждого из этих тестов определены критерии приемлемости.

Для исключения грубых ошибок при обработке результатов измерений проводилась проверка выборки на однородность. В соответствии с методиками, предложенными в ДФУ [2] выпадающие из выборки варианты исключались.

Определение специфичности методики. Специфичность – характеризует способность методики однозначно определять компонент в присутствии других, ожидаемых компонент. Эту характеристику определяют по ряду измерений, проведенных на чистом образце (образцах) и по ряду измерений, проведенных на образце (образцах) в присутствии других компонент (примесей).

Согласно [5] ферментативные глюкозооксидазно-пероксидазные методы с колориметрическим завершением являются более специфичными, чем неферментативные.

Содержащиеся в плазме (сыворотке) крови мочевая кислота, глутатион, креатинин и другие вещества не мешают определению глюкозы энзимным методом (лишь аскорбиновая кислота и цистеин в больших концентрациях могут оказывать влияние на ход анализа). Следовательно, данная методика является специфичной. Предел обнаружения данной методики составляет 0,056 ммоль/л

Оценка внутрилабораторной сходимости и воспроизводимости. С целью оценки внутрилабораторной сходимости и воспроизводимости были выбраны три фактора, которые могут оказать наибольшее влияние на результаты измерений и их качество:

- 1) оператор-лаборант, проводящий эксперимент;
- 2) повторение серий наблюдений через некоторый промежуток времени одним оператором;
- 3) тест – набор, который используют в данной методике.

Для проверки влияния первого фактора были выбраны четыре оператора-лаборанта одинаковой квалификации и проведено четыре серии наблюдений на стандартном образце глюкозы $C_{ст} = 10$ ммоль/л. С учетом требований ДФУ [2] в каждой серии было проведено не меньше чем по три измерения.

Оценка внутрилабораторной сходимости и воспроизводимости по фактору оператор-лаборант проводилась по критерию Кохрена:

$$G_B = S_{\max}^2 / \sum_{j=1}^L S_j^2 \quad (1)$$

Критическое значение статистики $G_{кр}$ при доверительной вероятности $p = 95\%$ для L – независимых оценок (количество серий), каждая из которых имеет $(n - 1)$ степень свободы, табулировано.

Критерий приемлемости:

$$G_B < G_{кр} \quad (2)$$

тогда дисперсии в сериях S_1^2, \dots, S_L^2 считаются равными и принадлежащими к одной генеральной совокупности.

Расчетная оценка составила $G_B = 0,079433 / 0,153866 = 0,5162$, что меньше табличного значения критерия Кохрена $G(n = 4, f = 2) = 0,7679$. Следовательно, дисперсии однородны, и данная методика имеет внутрилабораторную сходимость по исследуемому фактору. Для оценки внутрилабораторной сходимости и воспроизводимости по фактору оператор-лаборант было рассчитано среднее квадратическое отклонение (СКО) внутрилабораторной сходимости данной методики:

$$\sigma_r \approx S_r = \sqrt{\sum_{j=1}^L S_j^2 / L} \quad (3)$$

которое составило $\sigma_r \approx S_r = 0,196129$.

Далее определен предел сходимости (допустимое расхождение между результатами параллель-

ных измерений):

$$r = Q(p, n) \cdot \sigma_r \quad (4)$$

При $Q(p, n) = 3,31$, где $n = 3$, $p = 0,95$, величина предела сходимости составила $r = 0,649188$.

Рассчитано общее среднее:

$$\bar{\bar{X}} = \sum_{j=1}^L \bar{X}_j / L \quad (5)$$

которое составило $\bar{\bar{X}} = 10,83$ и междусерийное СКО

$$S_B = \sqrt{\sum_{j=1}^L (\bar{X}_j - \bar{\bar{X}})^2 / (L - 1)} \quad (6)$$

$$S_B = 0,114147,$$

а также СКО результатов в условиях внутрилабораторной воспроизводимости

$$S_R = \sqrt{S_B^2 + S_r^2 / n} \quad (7)$$

$$S_R = 0,160785.$$

Конечным параметром, который рассчитывается при оценке внутрилабораторной сходимости по фактору оператор – лаборант, является предел внутрилабораторной воспроизводимости

$$R = Q(p, n) \cdot S_R \quad (8)$$

Данный показатель составил $R = 0,532199$.

Для проверки влияния второго фактора проведены три серии наблюдений стандартном образце глюкозы $C_{ст} = 10$ ммоль/л в разное время работы анализатора-фотометра биохимического «BPC BIOSED». Расчеты оценочных показателей проводились в соответствии с методикой, примененной для проверки влияния первого фактора.

Оценка внутрилабораторной сходимости и воспроизводимости по временному фактору показала, что по критерию Кохрена выборочное значение $G_B = 0,686815$ меньше табличного значения $G_{кр} = G(n = 3, f = 4) = 0,7457$. Следовательно, дисперсии однородны, и данная методика имеет внутрилабораторную сходимость по временному фактору. Для оценки внутрилабораторной сходимости и воспроизводимости по временному фактору рассчитано:

- среднее квадратическое отклонение внутрилабораторной сходимости данной методики

$$\sigma_r \approx S_r = 0,482241;$$

- пределы сходимости при $Q(p, n) = 3,86$ (где $n = 3$, $p = 0,95$): $r = 1,861451$;

- общее среднее $\bar{\bar{X}} = 10,13467$;

- междусерийное СКО $S_B = 0,281015$;

- СКО результатов в условиях внутрилабораторной воспроизводимости $S_R = 0,354233$;

- предел внутрилабораторной воспроизводимости $R = 1,367337$.

Для проверки влияния третьего фактора в качестве исследуемых тест-наборов использовались

тест-наборы: «Реагент» и «FDelisit». Эти тест-наборы наиболее часто применяются в ПМЛФИ НФаУ при проведении определения глюкозы в биологических жидкостях глюкозооксидазным методом. В качестве исследуемого образца использовался стандартный образец глюкозы $C_{ст} = 10$ ммоль/л.

Оценка внутрилабораторной сходимости и воспроизводимости по фактору тест-набор показала, что по критерию Фишера дисперсии однородны ($F_B = S_1^2/S_2^2 = 1,065/0,76 = 3,787841$ (при $S_1 > S_2$) меньше критического значения статистики распределения Фишера $F_{кр} = F_{0,975}(8,8) = 4,43326$). Следовательно, точность данной методики не зависит от типа применяемого при исследовании тест-набора.

Оценка равенства средних значений с помощью критерия Стьюдента ($t = |x_1 - x_2|/S_p = 1,89713$, $T_{кр} = t_{0,975}(16) = 2,472878$, $t < T_{кр}$) показала статистическую незначимость отличий в результатах измерений, полученных с помощью данных тест-наборов. Значит тест-набор «Реагент» и тест-набор «FDelisit» с доверительной вероятностью $p=0,95$ обеспечивают статистически одинаковое определение концентрации глюкозы с помощью аттестуемого метода.

Оценка внутрилабораторной сходимости и воспроизводимости по трем факторам оператор-лаборант, время исследования, тест – набор показала хорошую устойчивость методики по этим параметрам. Точность данной методики не зависит от оператора, времени и типа применяемого при исследовании тест-набора.

Оценка правильности методики. Правильность в пределах лаборатории оценивалась с помощью стандартных образцов [6]. Эксперимент проводился в условиях внутрилабораторной повторяемости и сходимости. Каждая серия измерений проверялась на однородность.

Для стандартных образцов глюкозы $C_{ст1} = 5$ ммоль/л, $C_{ст2} = 10$ ммоль/л, $C_{ст3} = 20$ ммоль/л одним оператором – лаборантом проведено четыре серии наблюдений в разное время работы анализатора-фотометра биохимического «BPC BIOSED». Далее для каждой из трех серий рассчитаны общее среднее по формуле (5) и сделана оценка систематической погрешности $B = \bar{B} = \bar{X} - C$. Для оценки значимости систематической погрешности рассчитано по формуле (6) междусерийное СКО S_B . Проверяют значимость систематической погрешности в сравнении с случайной по критерию Стьюдента:

$$t_B = |\bar{B}| / \sqrt{S_B^2/L + (U/2)^2} \quad (9)$$

Выборочное значение критерия Стьюдента составило $t_B = 2,911808$.

Критическое значение статистики $T_{кр}$ находится как квантиль распределения Стьюдента при доверительной вероятности $p = 0,95$.

Систематическая ошибка не значима, если

$t_B \leq T_{кр}$, тогда аттестуемая методика обеспечивает правильность измерений в пределах лаборатории.

Оценка правильности методики, проведенная с помощью стандартных образцов, показала, что для трех стандартных образцов глюкозы $C_{ст1} = 5$ ммоль/л, $C_{ст2} = 10$ ммоль/л, $C_{ст3} = 20$ ммоль/л систематическая ошибка не значима (по заданному критерию приемлемости). Следовательно, аттестуемая методика обеспечивает правильность измерений в пределах лаборатории.

Оценка линейности методики. Для определения линейности в пределах рабочего диапазона взято 5 градуировочных проб с концентрациями, охватывающими весь диапазон измерений данной методики: $C_1 = 2$ ммоль/л, $C_2 = 5$ ммоль/л, $C_3 = 10$ ммоль/л, $C_4 = 20$ ммоль/л, $C_5 = 30$ ммоль/л. Оценка линейности методики проводилась в два этапа.

На первом этапе – была проведена проверка однородности дисперсий на границах рабочего диапазона. Для этого проведено 5...10 измерений пробы с концентрацией $C_1 = 2$ ммоль/л и $C_5 = 30$ ммоль/л.

Рассчитаны для $x_1 = C_1 = 2$ ммоль/л и $x_5 = C_5 = 30$ ммоль/л средние значения: $\bar{y}_1 = 1,934286$, $\bar{y}_5 = 30,51857$ и средние квадратические отклонения: $S_1 = 0,257737$, $S_5 = 0,516702$.

По критерию Фишера была проведена проверка однородности дисперсий: рассчитанное выборочное значение критерия $F_B = 4,019068$ меньше критического $F_{кр} = F_{0,975}(6,6) = 4,994909$. Следовательно, дисперсии однородны и метод обеспечивает определение глюкозы в пределах от 2 до 30 ммоль/л с требуемой точностью.

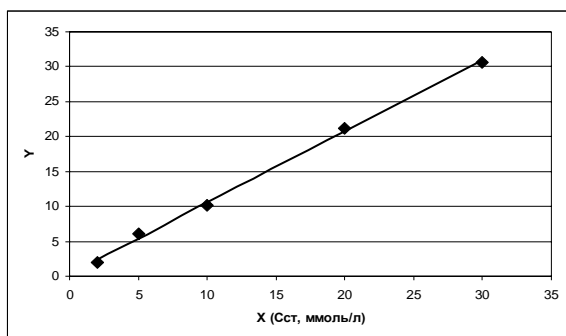
На втором этапе – проведена проверка линейности биоаналитической методики в заданном диапазоне измерений, для чего было сделано 5 серий измерений заданных градуировочных проб. В каждой серии проведено не менее трех повторных измерений.

Оценка линейности методики показала, что по заданному критерию приемлемости линейная характеристика обеспечивает более адекватную аппроксимацию зависимости измеряемой величины от градуировочных концентраций. Рассчитаны параметры линейной зависимости $Y = 0,333969 + 1,019398X$ и построен градуировочный график (рис. 1).

Остаточное средне квадратическое отклонение линейной градуировочной характеристики равно

$$S_{y1} = 1,029459.$$

Расчет неопределенности измерений. Неопределенность измерений определена с помощью метода контроля на базе стандартных образцов (СО) [6, 7]. Для оценки неопределенности измерений был выбран стандартный образец $C_{ст} = 10$ ммоль/л, для которого указана погрешность $u(x_0) = 0,5$. Проведена проверка: являются ли все серии выборками, принадлежащими одной генеральной совокупности, для чего по критерию Кохрена.

Рис. 1. Градуировочный график: $Y = 0,333969 + 1,019398 X$

Рассчитано выборочное значение оценки $G_B = 0,686815$, определено, что это значение меньше критического значения статистики $G_{пр}$ ($G_{кр} = G(0,95;3;4) = 0,7457$). Следовательно, дисперсии в сериях считаем равными, а выборки – принадлежащими к одной генеральной совокупности.

Далее была сделана оценка стандартных неопределенности входных величин $u(x_0)$, $u(B_j)$, $u(e_j)$:

$$u(x_0) = 0,5 \cdot 0,5 = 0,25;$$

$$u(B_j) = 0,281015;$$

$$u(e_j) = 0,215665.$$

Суммарная стандартная неопределенность результата измерения:

$$u_c(y_j) = \sqrt{u^2(x_0) + u^2(B_j) + u^2(e_j)} = 0,433567.$$

Для расчета расширенной неопределенности вычислялось число эффективных степеней свободы по формуле Велча-Саттерсвейта [7].

Число эффективных степеней свободы равно

$$v_{эф.} = 10,71345 \approx 11.$$

Коэффициент Стьюдента для доверительной вероятности $p = 0,95$ и $v_{эф.} = 11$ равен

$$t_S(p, v_{эф.}) = 2,200985.$$

Расширенная неопределенность:

$$U_p = t_S(p, v_{эф.}) \cdot u_c(y_j) = 0,954275.$$

Выводы

Валидация методики определения глюкозы в биологических жидкостях глюкозооксидазным методом с помощью анализатора-фотометра биохимического «BPC BioSED» доказала, что данная методика имеет рабочие характеристики, соответствующие регламентированным, удовлетворяет установленным критериям, а измеренные с помощью нее параметры соответствуют должным.

В процессе валидации определена стандартная неопределенности измерения и расширенная стандартная неопределенность.

Список литературы

1. ДСТУ ISO/IEC 17025:2006. Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій.

2. Державна фармакопея України/ Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Х.: РЕПІГ, 2001. – 556 с.

3. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. // Center for Drug Evaluation and Research, U.S. Food and Drug Administration, U.S. Department of Health and Human Services, Rockville, Maryland, May 2001.

4. Доброва В.Е., Малоштан Л.Н. Анализ проблем валидации биоаналитических методик, используемых при фармакологических и клинических исследованиях лекарственных средств // Системи обробки інформації. – Х. ХУ ПС. – 2007. – Вип. 6(64). – С. 29-31.

5. Камышиников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. – М.: МЕДпресс-информ, 2004. – С. 425-427.

6. ДСТУ-Н РМГ 61:2006. Метрологія. Показники точності, правильності, прецизійності методик кількісного хімічного аналізу. Методи оцінювання.

7. Коцюба А.М. Оцінювання невизначеності вимірювань за результатами контрольних вимірювань з використанням стандартних зразків // Системи обробки інформації. – Х.: ХУ ПС. – 2007. – Вип. 6(64). – С. 51-53.

Поступила в редколлегию 23.04.2008

Рецензент: д-р техн. наук, проф. И.П. Захаров, Харьковский национальный университет радиоэлектроники, Харьков.

ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ГЛЮКОЗИ У ПРОБАХ БІОЛОГІЧНОЇ РІДИНИ ГЛЮКОЗООКСИДАЗНИМ МЕТОДОМ ЗА ДОПОМОГОЮ АНАЛІЗАТОРА-ФОТОМЕТРА БІОХІМІЧНОГО «BPC BIOSED»

Доброва В.Є., Малоштан Л.М., Довжикова О.В.

В даній роботі розглянуто процедуру валидації біоаналітичної методики визначення глюкози за допомогою біохімічного аналізатора. Проведена атестація цієї методики у Проблемній лабораторії морфофункціональних досліджень Національного фармацевтичного університету. Розглянуто тести, які використовувалися при цьому та надано результати експериментальних оцінок. Доведено, що методика визначення глюкози у біопробах за допомогою аналізатора-фотометра біохімічного «BPC BioSED» відповідає регламентованим характеристикам і критеріям, а виміряні за її допомогою параметри відповідають належним.

Ключові слова: валидаційна процедура, біоаналітична методика, критерії відповідності, невизначеність вимірювань.

VALIDATION OF MEASUREMENT OF GLUCOSE IN BIOLOGICAL LIQUID TEST BY GLUCOSEOXIDAS METHOD WITH BIOCHEMICAL PHOTOMETER «BPC BioSED»

Dobrova V.E., Maloshtan L.N., Dolgicova E.V.

The procedure of validation bioanalytical method of glucose measurement with biochemical photometer are considered. At Problem laboratory of morfofunctional researches of National university of pharmacy the attestation of this method have been done. Using tests and results of researches are present. There are showed that the measurement of glucose in biological liquid test by glucoseoxidas method with biochemical photometer «BPC BioSED» is good and realised reglament characteristics.

Keywords: validation procedure, bioanalytical method, criteria of accordance, vagueness of measurings.