

**М.Б. Калитовська**

старший викладач кафедри фармації та біології  
Львівський національний університет ветеринарної медицини  
та біотехнологій імені С.З. Гжицького,  
м. Львів, Україна

## ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КАДМІЮ У КРОВІ

**Анотація.** У статті проведено валідацію методики спектрофотометричного визначення кадмію у крові за параметрами лінійності, правильності та збіжності. Установлено, що методика задовільняє ці вимоги.

**Ключові слова:** лінійність, правильність, збіжність, кадмій, кров.

Під час розроблення будь-якого нового методу визначення досліджуваної речовини виникає необхідність експериментального доказу того, що ця методика придатна для розв'язання поставлених завдань. Цю проблему вирішує валідація аналітичної методики, що включає такі основні характеристики, як точність, правильність, збіжність, лінійність і межа кількісного виявлення [1, с. 58–67; 2, с. 187–214; 3, с. 18–21; 4, 52–54; 5, с. 56–63; 6, с. 1–5].

Точність аналітичної методики передбачає ступінь близькості (або ступінь розкиду) результатів для серії вимірів, одержаних за цією методикою на різних пробах одного й того самого однорідного зразка. Правильність характеризує ступінь відповідності між відомим справжнім значенням і значенням, одержаним експериментально за цією методикою. Збіжність характеризує точність методики під час виконання її в однакових умовах протягом невеликого проміжку часу. Лінійність – здатність методики давати величини, прямо пропорційні концентрації (кількості) аналізованої речовини в досліджуваному зразку. Межа кількісного визначення для аналітичної методики являє собою мінімальну кількість досліджуваної речовини в зразку, яка може бути кількісно визначена з потрібною правильністю й точністю.

Для проведення валідації аналітичної методики спектрофотометричного визначення кадмію у крові ми проводили експеримент за такою методикою.

**Методика визначення іонів кадмію у крові.** Готували серії зразків крові по 2 мл, у які вводили 45,0–225,0 мкг іонів кадмію, що відповідає вмісту 22,5, 45,0, 67,5, 90,0 та 112,5 мкг/мл. Через 1 добу до кожного зразка додавали по 1 мл дистильованої води й відцентрифугували рідку фазу на центрифугі зі швидкістю 3000 об./хв. протягом 10 хв. Відбирали рідку фазу в мірні циліндри для визначення точного об'єму.

По 1 мл кожного зразка пропускали через сорбційний патрон зі швидкістю 5 крапель за хвилину. Цеоліт, що містився в сорбційному патроні (0,60 г), попередньо промивали 1 мл 1 М хлоридної кислоти та 2 мл універсального буферного розчину Бріттона-Робінсона з рН 5,2. Висота сорбційної колонки – 10 мм, ширина – 6 мм. Після пропускання плазми сорбційні патрони промивали 0,5–1 мл дистильованої води.

Десорбцію проводили в динамічних умовах водно-метанольним розчином 0,1 М калію хлориду (1:1), об'ємом 15 мл. Швидкість пропускання елюенту через сорбційний патрон становила 10 крапель за хвилину. В аліквоті елюату визначали кількість десорбованих іонів кадмію. До 4 мл елюату додавали 1,7 мл дистильованої води, 5 мл аміачного буферного розчину з рН 10,0 та 0,3 мл 0,05% розчину сульфарсазону. Вимірювали світловбирання одержаного розчину на спектрофотометрі СФ-56 при довжині хвилі 510 нм (товщина робочого шару кювети – 10 мм).

Уміст кадмію в досліджуваних зразках крові розраховували за такою формулою:

$$m_{Cd^{2+}} = m_{ал.} \cdot V_{ел.} \cdot V_{р.ф.} / 0,66 \cdot V_{ал.}$$

де  $m_{Cd^{2+}}$  – кількість кадмію, визначеного в зразку крові, мкг;

$m_{ал.}$  – кількість десорбованих іонів кадмію, визначених в аліквоті елюату, мкг;

$V_{ел.}$  – об'єм елюату, мл;

$V_{р.ф.}$  – об'єм відібраної рідкої фази крові, мл;

0,66 – коефіцієнт поправки на процес твердофазної екстракції;

$V_{ал.}$  – об'єм елюату, відібраний для спектрофотометричного визначення, мл.

Відсоток визначення кадмію відносно введених іонів металу розраховували за формулою:

$$Z = (m_{\text{експ.}} / m_{\text{введ.}}) 100,$$

де  $Z$  – відсоток визначення іонів кадмію в зразку, %;

$m_{\text{експ.}}$  – маса кадмію, визначена експериментально;

$m_{\text{введ.}}$  – маса кадмію, введена у кров.

Результати визначень наведено в таблиці 1.

Таблиця 1

Результати визначення вмісту кадмію у крові

№ з/п	Уведено у кров Cd <sup>2+</sup> , мкг/мл	Уведено у кров Cd <sup>2+</sup> , мкг	Визначено у крові Cd <sup>2+</sup> , мкг	Визначено Cd <sup>2+</sup> , %	Визначено Cd <sup>2+</sup> (середнє значення), %
1	22,5	45,0	44,55	99,00	97,42
			44,55	99,00	
			42,42	94,27	
2	45,0	90,0	86,36	95,96	94,27
			84,09	93,43	
			84,09	93,43	
3	67,5	135,0	133,64	98,99	100,04
			135,76	100,56	
			135,76	100,56	
4	90,0	180,0	176,14	97,86	97,86
			176,14	97,86	
			176,14	97,86	
5	112,5	225,0	223,11	99,16	98,46
			223,11	99,16	
			218,41	97,07	

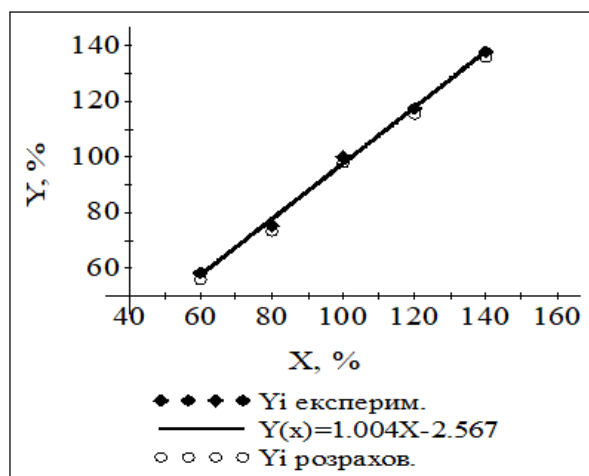


Рис. 1. Графік залежності світловбирання від концентрації введених у кров іонів кадмію в нормалізованих координатах

Валідацію методики проводили за такими параметрами: лінійність, правильність і збіжність спектрофотометричного визначення кадмію у крові.

**Лінійність.** Для дослідження готували серії зразків крові по 2 мл, в які вводили 45–225 мкг іонів кадмію, що відповідає вмісту 22,5, 45,0, 67,5, 90 та 112 мкг/мл. Цей уміст відповідає діапазону 60–140% від токсичної дози металу або ж у концентраційному – 60, 80, 100, 120 та 140%. Через 1 добу проводили експеримент, як описано в методиці визначення кадмію у крові.

Вимірювання аналітичного сигналу (світловбирання) кожного зразку проводили тричі з рандомізацією кювети (кожної 3 рази). Вимірювання проводили на одному приладі в один день. На основі одержаного аналітичного сигналу (світловбирання) розраховували масу кадмію в кожному зразку за формулою, наведеною вище в методиці визначення іонів кадмію у крові. Далі розраховували відсоток визначення іонів кадмію та будували в нормалізованих координатах залежність

аналітичного сигналу (відсотка визначених іонів кадмію) від концентрації введеного металу.

Результати дослідження лінійності цієї методики в нормалізованих координатах представлено на рис. 1 й у таблиці 1.

За допомогою методу найменших квадратів розраховували лінійне рівняння, яке має вигляд:  $Y_i = aX_i + b = 1,004X_i - 2,567$ . Коефіцієнт кореляції ( $R$ ), розрахований за експериментальними даними, становить 0,9987 і є більшим критерію лінійного коефіцієнта кореляції (0,9924), що відповідає вимогам лінійної залежності.

Таблиця 2

## Результати визначення лінійності модельних розчинів крові (у нормалізованих координатах)

№ розчину	Уведено, %	Уведено, мкг/мл	Визначено, %	Визначено (середнє значення), %	$Y_i = ax_i + b$
1	60	22,5	59,40	58,45	56,12
			59,40		
			56,56		
2	80	45,0	76,77	75,42	73,16
			74,75		
			74,75		
3	100	67,5	98,99	100,04	97,87
			100,56		
			100,56		
4	120	90,0	117,43	117,43	115,33
			117,43		
			117,43		
5	140	112,5	138,83	137,85	135,84
			138,83		
			135,90		
Кутовий коефіцієнт лінійної залежності a					1,0040
$S_a$					0,0310
Вільний член лінійної залежності b					2,5670
$S_b$					3,1710
Залишкове стандартне відхилення $S_0$					0,0300
Коефіцієнт кореляції методики r					0,9987
Критичне значення залишкового стандартного відхилення, $RSD_0$					5,56
Критерій лінійного коефіцієнта кореляції R					0,9924

За результатами експериментальних даних параметри лінійної залежності зберігаються на всьому діапазоні концентрацій (60–140%).

**Правильність і збіжність.** Визначення проводили в нормалізованих координатах на тих самих зразках, що й лінійність. Визначали концентрації та аналітичний сигнал (відсоток визначених іонів кадмію) в нормалізованих координатах у відсотках до номінальних значень. Розраховували величину:

$$Z_i = (Y_i / X_i) \cdot 100,$$

де  $Z_i$  – відсоток визначення кадмію;

$Y_i$  – маса кадмію, визначена у % до концентрації 100% розчину;

$X_i$  – маса кадмію, введена у % до концентрації 100%.

За одержаними даними проводили статистичну обробку результатів. Результати встановлення правильності та збіжності наведено в таблиці 3.

Таблиця 3

## Установлення правильності та збіжності аналітичної методики

№ розчину	Уведено у % до концентрації 100% ( $X_i$ , %)	Уведено, мкг/мл	Визначено у % до концентрації 100% розчину ( $Y_i$ , %)	Визначено у % до введеного ( $Z_i$ )
1	2	3	4	5
1	60	22,5	59,40	99,00
			59,40	99,00
			56,56	94,27
2	80	45,0	76,77	95,96
			74,75	93,43
			74,75	93,43
3	100	67,5	98,99	98,99
			100,56	100,56
			100,56	100,56
4	120	90,0	117,43	97,86
			117,43	97,86
			117,43	97,86

№ розчину	Уведено у % до концентрації 100% ( $X_p$ , %)	Уведено, мкг/мл	Визначено у % до концентрації 100% розчину ( $Y_p$ , %)	Визначено у % до введеного ( $Z_p$ )
1	2	3	4	5
5	140	112,5	138,83	99,16
			138,83	99,16
			135,90	97,07
Середнє значення $Z$ %				97,61
Відносне стандартне відхилення $S_z$ %				2,40
Відносний довірчий інтервал $\Delta_z$ %				2,78
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta_{ас}$ %				3,20
Систематична похибка $\delta$				2,39
Критерій невизначеності систематичної похибки				2,40
Загальний висновок про методику				коректна

Методика є коректною, оскільки виконуються вимоги:  $\Delta_z \% \leq \max \Delta_{ас} = 3,2\%$ . Систематична похибка цього методу не значна ( $2,39 \leq 2,40$ ).

Запропонована методика спектрофотометричного визначення кадмію у крові відповідає сучасним нормативним документам за такими параметрами, як лінійність, правильність і збіжність.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Валідація аналітичних методик і випробувань / Державна фармакопея України. ДП «Наук.-експертн. фармакоп. центр». 1-е вид. Харків: РІРЕГ, 2001. Доп. 1. 2004. С. 58–67.
2. Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту / Державна фармакопея України. ДП «Наук.-експертн. фармакоп. центр». 1-е вид. Харків: РІРЕГ, 2001. Доп. 1. 2004. С. 187–214.
3. Вишневська Л.І., Вишневська К.О., Хохлова К.О. Валідація методики кількісного визначення флавоїдів воральних краплях Урохол. *Управління, економіка та забезпечення якості фармації*. 2010. № 3. С. 18–21.
4. Розробка та валідація методики кількісного визначення німодипірину в субстанції. *Вопросы фармації. Запорозький медичинський журнал*. 2011. Т. 13. № 1. С. 52–54.
5. Розробка, валідація та апробація методу кількісного визначення нової антиепілептичної сполуки AGB-31 у крові щурів методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2011. № 1. С. 56–63.

**М.Б. Калытовская. Валідація методики спектрофотометричного визначення кадмію в крові. – Стаття.**

**Анотація.** В статтє проведена валідація методики спектрофотометричного визначення кадмію в крові по параметрам лінійности, правильности, сходимости. Установлено, что методика удовлетворяет эти требования.

**Ключевые слова:** линейность, правильность, сходимость, кадмий, кровь.

**M. Kalytovska. Validation of the spectrophotometric determination of Cadmium in blood. – Article.**

**Summary.** Method of spectrophotometric determination of cadmium in blood was developed and validated for following parameters: linearity, accuracy, precision. The method meets the validation criteria for quantification of cadmium in blood samples.

**Key words:** linearity, accuracy, precision, cadmium, blood.