

Применение государственных стандартных образцов и тестовых смесей для поверки и калибровки средств измерений, используемых в биологических исследованиях

Е. В. КУЛЯБИНА*, Т. В. КУЛЯБИНА**

* Всероссийский научно-исследовательский институт метрологической службы, Москва, Россия, e-mail: kuliabina@vniims.ru

** Всероссийский научно-исследовательский институт метрологии им. Д. И. Менделеева, С.-Петербург, Россия

Рассмотрены вопросы поверки и калибровки средств измерений, используемых в биологических исследованиях. Показано, что сравнение результатов калибровки по стандартным образцам состава и свойств веществ, находящихся в растворах, с результатами измерений вещества в живой биологической матрице представляется некорректным. Предложено создать для поверки и калибровки стандартные образцы на основе биологических матриц.

Ключевые слова: биоаналитические средства измерений, поверка, калибровка, биологическая матрица.

The problems of verification and calibration of measuring instruments used in biological studies were considered. It is shown that the comparison of results of calibration by reference materials of composition and properties of substances in solutions with the results of measurement of substances in living biological matrix is incorrect. The creation of certified reference materials based on biological matrices is proposed.

Key words: biological measuring instruments, verification, calibration, biological matrix.

Биотехнологии относятся к приоритетным направлениям развития науки и техники Российской Федерации и являются одним из видов критических и инновационных технологий. На сегодняшний день в технически передовых странах реализуются приоритетные государственные программы и широкомасштабные проекты (в том числе межгосударственные) по развитию важных технологий [1]. В США к ним относятся биомедицина и охрана окружающей среды, в Великобритании — биохимия, биологические исследования, клиническая медицина, в Германии — биотехнологии и агробиотехнологии, во Франции — биотехнологии и здравоохранение, в Канаде — биометрические технологии, в Японии — защита окружающей среды.

В рамках реализации этих программ создан и продолжает развиваться новый класс средств измерений (СИ), направленных на контроль и проведение биологических анализов. Такими СИ являются амплификаторы, термоциклеры, секвенаторы, геномные анализаторы, биохимические анализаторы, иммунохроматографические анализаторы, масс-спектрометры для определения молекулярных масс пептидов, белков и т. п. При измерениях перечисленными типами СИ определяют содержание веществ в биологической матрице.

Несмотря на то, что задача получения количественной информации решается, вопросы о точности предоставляемых результатов и метрологического обеспечения этого вида измерений остаются открытыми. В России развитие биотехнологий сопровождается аналогичными вопросами. Довольно остро стоит задача обеспечения биоаналитических СИ средствами поверки и калибровки. Возможно проведение указанных процедур по методикам [2], разработанным для СИ, предназначенных для анализа веществ, находящихся в растворах.

По принципу действия большинство биохимических анализаторов относятся к оптико-электронным СИ. При помощи таких СИ проводят косвенные измерения и получают результат. Стандартные образцы (СО) состава и свойств веществ для этих целей, в большинстве, созданы с применением стандартных растворителей — этанола, дистиллированной воды и т. д. Перед проведением измерений в рамках традиционного подхода СИ калибруют по государственным СО (ГСО) содержания анализируемого вещества (аналита) в растворе, далее анализируют, получают результаты, например, в единицах оптической плотности, и по ее значению определяют содержание анализируемого вещества в растворе.

При измерении содержания аналита в биологической матрице калибровку СИ проводят по ГСО аналита в растворе, в то время как анализируют вещество, содержащееся в биологической матрице — плазме, сыворотке крови, моче, слюне. Влияние матрицы при реализации такой процедуры не учитывается. Как показывают результаты исследований, проводимых аналитиками и метрологами [3—7], сравнивать результаты калибровки по СО на основе химических растворов с результатами измерений содержания веществ в живой биологической матрице, по меньшей мере, некорректно. Таким образом, указанный подход не отвечает потребностям метрологического обеспечения новых разрабатываемых биоаналитических СИ и может применяться в ограниченном числе случаев.

Например, для проверки стабильности метрологических характеристик биоаналитического СИ и при проведении анализов содержания веществ в плазме крови, для которых он собственно и предназначен, нужен СО нового поколения, созданный на основе плазмы крови с учетом влияния матрицы.

Разработка СО нового поколения является одним из первостепенных шагов создания системы метрологического обеспечения биоаналитических СИ. В этом направлении работают ведущие метрологические институты мирового сообщества, такие как NIST (США), NPL (Великобритания), PTB (Германия), LNE (Франция), IRMM (ЕС), а в России — ВНИИМ им. Д. И. Менделеева, ВНИИМС.

Полезным опытом в создании СО нового поколения, обеспечивающих контроль работоспособности СИ, применяемых для биологических анализов, и стабильность его характеристик, являются разработки ученых Института хроматографии «ЭкоНова» (Новосибирск), ВНИИМС. Так, для обеспечения достоверных результатов идентификации и количественного определения сложных органических соединений в разные годы [8] были разработаны тестовые смеси, которые, по сути, являлись аналогами СО, применяемых для калибровки.

Тестовые смеси являются многокомпонентными СО, где по каждому из компонентов делают вывод о функционировании всех узлов хроматографической системы. Разработанная в 2006 г. тестовая смесь представляет смесь следующих веществ: бромид калия, уридина, орто-Нитроанилина, мета-Нитроанилина, кофеина. Характеристики данной смеси приведены в табл. 1 [8].

Таблица 1

Характеристики тестовой смеси, разработанной в 2006 г.

Наименование компонента	Массовая концентрация, мг/мл	Границы относительной погрешности, %, ($P = 0,95$)
Калия бромид	0,2	$\pm 1,5$
Уридин	0,2	$\pm 1,5$
Кофеин	1,0	$\pm 1,3$
мета-Нитроанилин	0,1	$\pm 1,8$
орто-Нитроанилин	0,1	$\pm 1,8$

Тестовая смесь БД-2012 состоит из йодида калия, пирена, орто-Нитроанилина, мета-Нитроанилина и кофеина (табл. 2).

Таблица 2

Характеристики смеси БД-2012

Наименование компонента	Массовая концентрация, мг/мл	Границы относительной погрешности, %, ($P = 0,95$)
Калия йодид	0,2	$\pm 1,2$
Пирен	0,2	$\pm 1,0$
Кофеин	2,2	$\pm 0,8$
мета-Нитроанилин	0,2	$\pm 1,2$
орто-Нитроанилин	0,2	$\pm 1,1$

Каждый компонент тестовой смеси БД-2012 предназначен для контроля следующих характеристик основных узлов хроматографа:

йодид калия — для контроля свободного объема колонки;

пирен — для контроля точности настройки длины волны УФ-детектора во всем диапазоне длин волн; функционирования насосов, работы смесителя;

орто-Нитроанилин — для контроля точности настройки детектора в диапазоне 210—300 нм; отклонения градиента элюирования от заданной формы; качества упаковки колонки, влияющего на форму пика (асимметрия пика); работы инжектора (точность дозирования образца);

мета-Нитроанилин — для контроля значения величины рН-элюента;

кофеин — для контроля линейности детектора.

В результате калибровки с использованием тестовой смеси становится возможным применять все хроматографы данного типа для анализа большого числа веществ без традиционной градуировки. Приведенный подход возможно окажется наилучшим при создании СО нового поколения.

Создание СО на основе живой матрицы является сложной, многопараметрической задачей, которая должна учитывать процессы изменения основного (анализируемого) компонента, связанного с влиянием самой матрицы. Влияние таких процессов на количественное и качественное значение параметров СО требует проведения глубоких, фундаментальных исследований.

Другим влияющим фактором на решение задачи создания СО на основе живой матрицы является вопрос стандартизации самой матрицы. Реализация такого решения также является темой отдельного исследования, например, призванного решить создание либо модели тканей и жидкостей живого человека, либо предпринять попытки консервации собственно живых тканей.

Литература

1. **Final Report Study of Measurement Service and Comparison Needs for an International Measurement Infrastructure for the Biosciences and Biotechnology: Input for the BIPM Work Programme.** BIPM, 2011.

2. **ММ 2531—99.** ГСИ. Анализаторы состава веществ и материалов универсальные. Общие требования к методикам поверки в условиях эксплуатации.

3. **Identification** of matrix effects by means of standard addition. Merck KGaA [Электрон. версия]. <http://www.analytical-test-kits.com> (дата обращения 10.08.2013 г.).

4. **Hall Terence G. e. a.** Savage, Identifying and Overcoming Matrix Effects in Drug Discovery and Development [Электрон. версия] http://cdn.intechopen.com/pdfs/29012/InTech-Identifying_and_overcoming_matrix_effects_in_drug_discovery_and_development.pdf (дата обращения 10.08.2013 г.).

5. **Patel D.** Matrix effect in a view of LC-MS/MS: an overview // J. Pharma and Bio Scie. 2011. V. 2. N 1.

6. **Patel A.** Characterization and classification of matrix effects in biological samples analysis [Электрон. версия]. <http://www.slideshare.net/amitpatel745/matrix-effect-7614914> (дата обращения 10.08.2013 г.).

7. **Sieber John R.** Matrix-independent XRF methods for certification of standard reference materials // JCPDS. 2002. V. 45. P. 493—504.

8. **Рутенберг О. Л. и др.** О метрологическом обеспечении баз данных для идентификации и количественного определения УФ-поглощающих веществ методом ВЭЖХ // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2006. Т. 72. № 6. С. 59—64.

Дата принятия 10.10.2013 г.