

Подход к количественному определению эндогенных веществ в биожидкостях хроматографическим методом с использованием математического аппарата

Смирнов В. В.^{1,2}, Красных Л. М.¹, Раменская Г. В.^{1,2}, Казанбеков С. Б.²

¹ – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

² – ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава Российской Федерации (Сеченовский университет), Москва, Россия

Аннотация. Актуальность исследования: Количественное определение эндогенных веществ является важной задачей в экспериментальной и клинической фармакологии. В случае работы с эндогенными соединениями возникают определённые сложности. Главным из них является невозможность получения такой же биоматрицы без эндогенного соединения для использования в качестве эталонных растворов при построении калибровочных кривых. **Цель:** Цель исследования – разработка математической методики расчёта концентрации эндогенных соединений в биобъектах с помощью хроматографических методов, позволяющей получить статистически достоверную интервальную оценку концентрации эндогенных соединений. **Материалы и методы:** для реализации вычислительной части предложенного алгоритма используется программа инженерных расчётов Mathcad версии 15.0. **Результаты:** Разработана математическая методика расчёта концентрации эндогенных соединений в биобъектах с помощью хроматографических методов, которая позволяет получить статистически достоверную интервальную оценку концентрации эндогенных соединений. Особенностью данной методики является использование исключительно анализируемого биобъекта для проведения количественного определения эндогенных веществ, без использования так называемых «чистых» биобъектов для калибровочных кривых, а также дорогостоящих дейтерированных аналогов маркеров – субстратов изоферментов CYP450 и их метаболитов. Это позволяет сохранить оригинальный биоматричный эффект при снятии хроматограммы. Также используется статистический аппарат для исключения возможных грубых ошибок. Для подтверждения достоверности разработанного метода количественного определения установлена сходимости результатов, полученных данным методом и при использовании дейтерированных стандартов. **Выводы:** Разработана математическая методика расчёта концентрации эндогенных соединений в биобъектах с помощью хроматографических методов, которая позволяет получить статистически достоверную интервальную оценку концентрации эндогенных соединений.

Ключевые слова: CYP3A4; метаболическая активность; фенотипирование; кортизол; критерий Колмогорова; критерий Пирсона; критерий Граббса

Для цитирования:

Смирнов В. В., Красных Л. М., Раменская Г. В., Казанбеков С. Б. Подход к количественному определению эндогенных веществ в биожидкостях хроматографическим методом с использованием математического аппарата. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2021;(2):11–18. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-2-11-18>

Поступила: 18 июля 2021 г. **Принята:** 13 августа 2021 г. **Опубликована:** 10 ноября 2021 г.

An approach to the quantitative determination of endogenous substances in biological fluids by a chromatographic method using a mathematical apparatus

Smirnov VV^{1,2}, Krasnykh LM¹, Ramenskaya GV^{1,2}, Kazanbekov SB²

¹ – FSBI «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

² – FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenovskiy University), Moscow, Russia

Abstract. *Relevance of the study:* The quantification of endogenous substances is an important task in experimental and clinical pharmacology. In the case of working with endogenous compounds, certain difficulties arise. The main one is the impossibility of obtaining the same biomatrix without endogenous compounds for use as standard solutions in the construction of calibration curves. *Purpose:* The aim of our study was to develop a mathematical methodology for calculating the concentration of endogenous compounds in biological objects measured by chromatography, which allows us to obtain a statistically reliable interval estimation of the concentration of endogenous compounds. *Materials and methods:* To implement the computational part of the proposed algorithm, the Mathcad engineering calculation program version 15.0 from PTC (Parametric Technology Corporation) is used, which operates under the family of Windows operating systems (XP, 7, Vista, 8). *Main results:* A mathematical methodology has been developed for calculating the concentration of endogenous compounds in biological objects measured by chromatography, which allows one to obtain a statistically reliable interval estimate of the concentration of endogenous compounds. A feature of this technique is the use of an exclusively analyzed bioobject for quantitative determination of endogenous substances, without the use of so-called “pure” bioobjects for calibration curves, as well as expensive deuterated analogs of markers – substrates of CYP450 isoenzymes and their metabolites. This allows you to maintain the original biomatrix effect when removing the chromatogram. A statistical apparatus is also used to eliminate possible gross errors. To confirm the reliability of the developed method of quantitative determination, the convergence of the results obtained by this method using deuterated standards is established. *Conclusions:* A mathematical methodology has been developed for calculating the concentration of endogenous compounds in biological objects measured by chromatography, which allows one to obtain a statistically reliable interval estimate of the concentration of endogenous compounds. A feature of this technique is the use of only the analyzed bioobject for quantitative determination of endogenous substances, which allows you to maintain the original biomatrix effect when removing the chromatogram.

Keywords: CYP3A4; metabolic activity; phenotyping; cortisol; Kolmogorov criterion; Pearson test; Grubbs test

For citations:

Smirnov VV, Krasnykh LM, Ramenskaya GV, Kazanbekov SB. An approach to the quantitative determination of endogenous substances in biological fluids by a chromatographic method using a mathematical apparatus. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2021;(2):11–18. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-2-11-18>

Received: July 18, 2021. **Accepted:** August 13, 2021. **Published:** November 10, 2021

Введение / Introduction

Количественное определение эндогенных веществ является актуальной задачей в диагностике заболеваний, определении метаболической активности, определении маркеров патологических состояний. В данной работе количественное определение наиболее актуально для определения активности изофермента цитохрома P450 методом фенотипирования с использованием эндогенных субстратов, таких как кортизол, пинолин, холестерин и др.

Для количественного определения с помощью инструментального физико-химического хроматографического метода преимущественно используется два подхода к обработке данных, а именно: метод абсолютной градуировки (калибровки) и метод внутреннего стандарта. Причём и тот, и другой метод практически предполагает построение калибровочной кривой, эталонные растворы которых необходимо хроматографировать в строго идентичных условиях, что и анализируемый образец. К таким условиям относятся: температура, давление, параметры прибора и колонки, подвижная и неподвижная фазы, растворитель, методика пробоподготовки и прочее.

Сложность определения концентрации эндогенного соединения в биообъекте с использованием хроматографического метода заключается в невозможности получения такой же биоматрицы без эндогенного соединения для использования в качестве эталонных растворов при построении калибровочных кривых (рис. 1).

Для решения данных вопросов необходимо разработать соответствующую методику. В связи с этим, целью данного исследования была разработка математической методики расчёта концентрации эндогенных соединений в биообъектах, измеренных методом хроматографии, позволяющую получить статистически достоверную интервальную оценку концентрации эндогенных соединений.

Количественное определение эндогенных веществ является важной задачей в экспериментальной и клинической фармакологии, что подтверждается большим количеством работ в данном направлении, например [1, 2].

При количественном определении методом хроматографии в фармакологии используется два подхода к обработке данных: метод абсолютной градуировки (калибровки) и метод внутреннего стандарта. Оба метода предполагают построение калибровочной кривой, эталонные растворы которых необходимо хроматографировать в одинаковых условиях с анализируемым образцом.

В случае работы с экзогенными соединениями, как правило, сначала разрабатывается методика количественного определения вещества в водном или спиртовом растворе (но не в биожидкости). Далее разрабатывается методика количественного определения экзогенного вещества непосредственно в биожидкости, например, в плазме крови, на так называемой «чистой» плазме. Такая методика состоит из двух частей. Во-первых, разрабатывается методика пробоподготовки, основной целью которой является

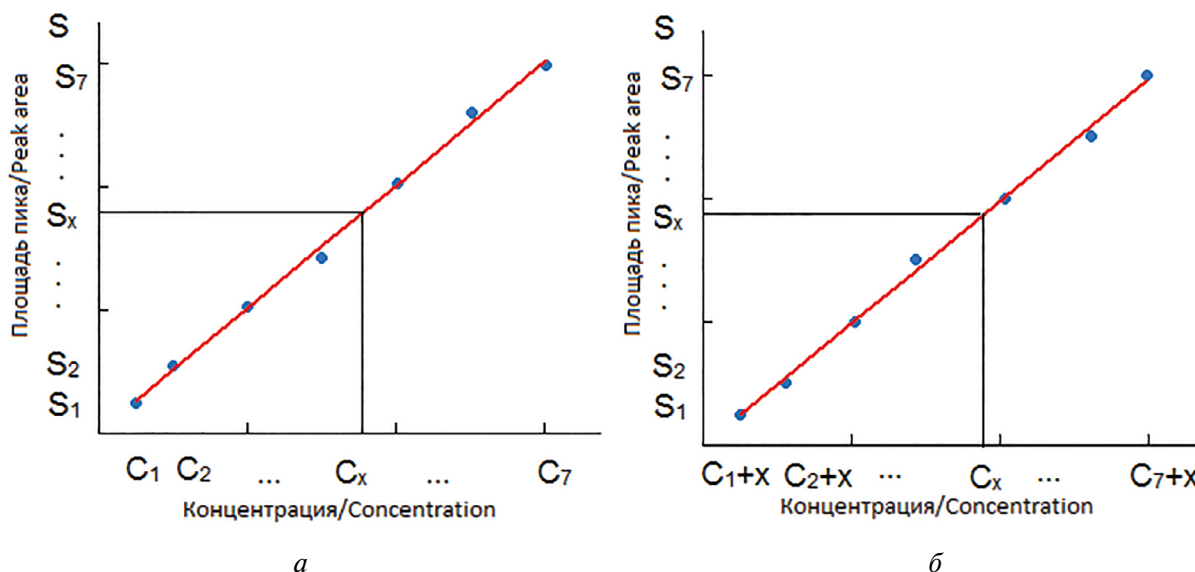


Рис. 1. Калибровочная кривая для экзо- (а) и эндогенного (б) вещества
Figure 1. Calibration curve for exo- (a) and endogenous (b) substances

получение максимального количества определяемого вещества в подходящем растворителе, то есть подбираются операции и материалы для достижения оптимального процента экстракции вещества, который в надлежащих практиках, как правило, составляет 70–80 % и более. Во-вторых, разрабатывается методика хроматографирования, целью которой является непосредственное количественное определение: выбор метода обработки результатов, выбор внутреннего стандарта (если используется метод внутреннего стандарта), выбор рабочих растворов и калибровочных стандартов, подбор параметров хроматографирования и прочее.

В случае работы с эндогенными соединениями возникают определённые сложности. Кроме указанных ранее, следует отметить, что отсутствует «чистая» плазма, то есть такая же плазма без соединения. Эту проблему в основном решают получением «чистых» или модельных биожидкостей путём разного рода очисток, в процессе которых происходит очистка не только от интересующего эндогенного соединения, но и от других веществ, влияющих на общий уровень базовой линии при хроматографировании, на неидентичность условий пробоподготовки модельных и анализируемых образцов.

Материалы и методы / Materials and methods

Средства ПО / Software

Для реализации вычислительной части предложенного алгоритма используется программа инженерных расчётов Mathcad версии 15.0 от корпорации РТС (Parametric Technology Corporation), которая функционирует под управлением семейства операционных систем Windows (XP, 7, Vista, 8). Главными достоинствами Mathcad и его колоссальным преимуществом перед другими расчётными средствами являются лёгкость и наглядность программирования задачи, отображение сложных математических выражений в том виде, в каком они обычно записываются на листе бумаги, то есть отсутствие специального языка программирования, простота использования, возможность создания средствами Mathcad высококачественных технических отчётов с таблицами, графиками и текстом.

В данной работе разработана математическая методика количественного определения эндогенных веществ хроматографическим методом (рис. 2).

Пробоподготовка и хроматографирование / Sample preparation and chromatography

Методика пробоподготовки и хроматографирования соответствует методике Смирнова В.В. [3].

Рассмотрим различные блоки предлагаемого алгоритма более подробно.

Генерация выборочной совокупности концентраций / Generation of a concentrations sample set

После хроматографирования двух совокупностей проб — серии стандартных разведений в органическом

растворителе и серии стандартных концентраций в нативной плазме, экстрагируемых впоследствии в органический растворитель — имеем данные, представленные в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Измерения серии стандартных разведений

Table 1

Measurements of a series of standard dilutions

Известные концентрации из серии стандартных разведений в органическом растворителе C'	Площадь пиков на хроматограмме S'
C'_1	S'_1
C'_2	S'_2
...	...
C'_i	S'_i
...	...
C'_m	S'_m

Таблица 2

Измерения серии стандартных концентраций в нативной плазме

Table 2

Measurements of a series of standard concentrations in native plasma

Неизвестные концентрации в нативной плазме вещества А, извлечённого в органический растворитель C	Площадь пиков на хроматограмме S
$(x + C_0)z_0$	S_0
$(x + C_1)z_1$	S_1
$(x + C_2)z_2$	S_2
...	...
$(x + C_i)z_i$	S_i
...	...
$(x + C_n)z_n$	S_n

В табл. 1 и 2 концентрации C'_i и C_i (при $m = n$) могут быть одинаковыми, а концентрация C_0 , как правило, равна нулю.

Найдем среднее значение неизвестной концентрации \bar{x} вещества А в нативной плазме и среднее значение % экстракции \bar{z} .

Предположим $z_0 = z_1 = \dots = z_i = \dots = z_n = z$, тогда для 0-го и 1-го измерения:

$$\frac{(x + C_0)z_0}{(x + C_1)z_1} = \frac{S_0}{S_1} \Rightarrow \frac{(x + C_0)z}{(x + C_1)z} = \frac{S_0}{S_1} \Rightarrow (x + C_0)S_1 = (x + C_1)S_0 \Rightarrow$$

$$x(S_1 - S_0) = C_1S_0 - C_0S_1 \Rightarrow x = \frac{C_1S_0 - C_0S_1}{S_1 - S_0}.$$

Обозначим $x = x_{01}$.

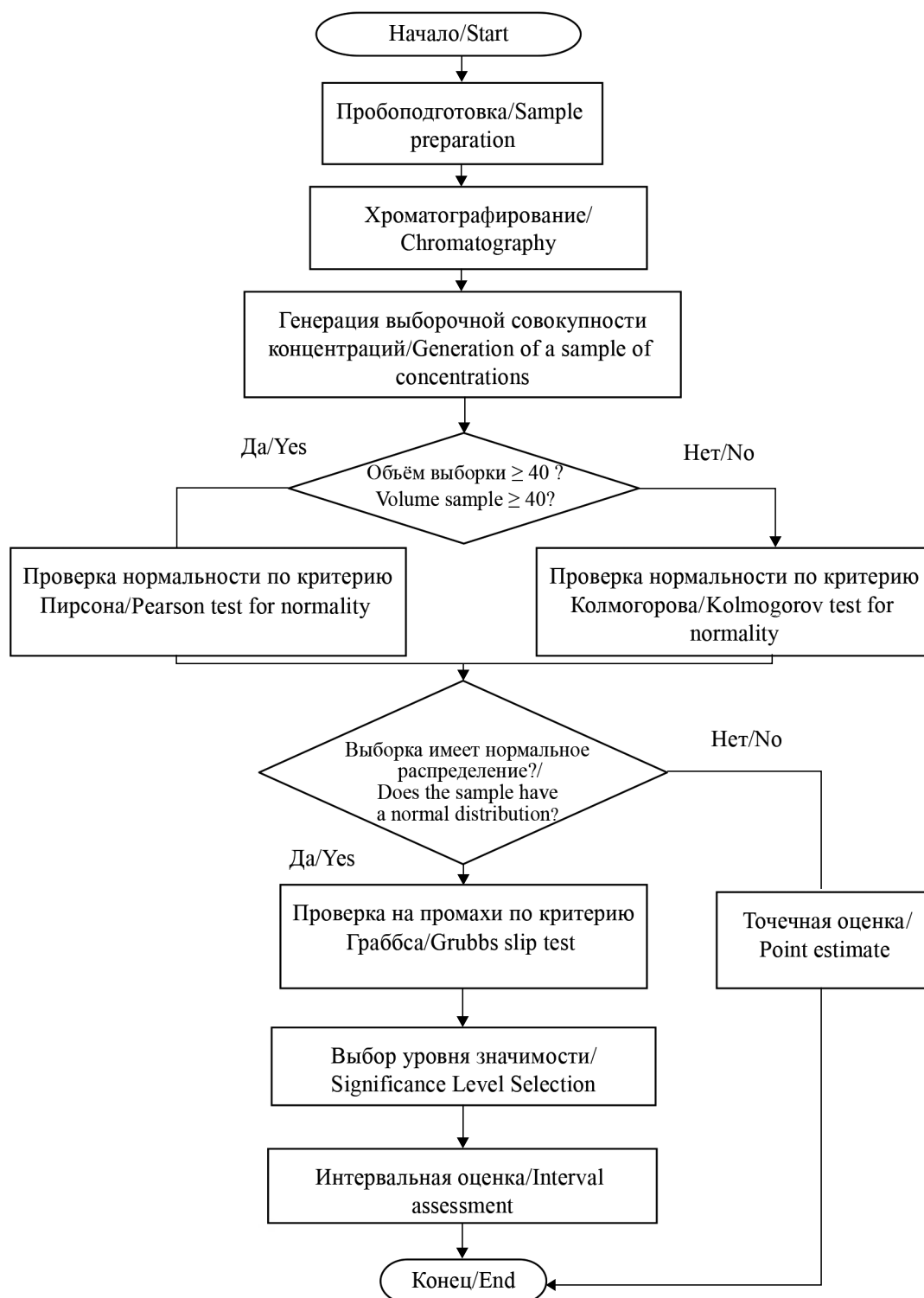


Рис. 2. Алгоритм количественного определения эндогенных веществ в биообъектах хроматографическим методом
Figure 2. Algorithm for quantitative determination of endogenous substances in biological objects by chromatographic method

Для i -го и $(i + 1)$ -го измерения

$$\frac{(x + C_i)z_i}{(x + C_{i+1})z_{i+1}} = \frac{S_i}{S_{i+1}} \Rightarrow x = x_{i,i+1} = \frac{C_{i+1}S_i - C_iS_{i+1}}{S_{i+1} - S_i}.$$

Вообще, для

$$\forall i, j : i \in \{0, \dots, n-1\}, j \in \{1, \dots, n\}, i < j \Rightarrow \Rightarrow \frac{(x + C_i)z_i}{(x + C_j)z_j} = \frac{S_i}{S_j} \Rightarrow x_{ij} = \frac{C_jS_i - C_iS_j}{S_j - S_i}.$$

Условие $i < j$ ограничивает дублирование данных, поскольку $x_{ij} = x_{ji}$.

Вычисленные значения неизвестных концентраций можно представить в виде матрицы $(n + 1) \times (n + 1)$:

$$\|x_{ij}\|_{(n+1) \times (n+1)} = \begin{pmatrix} 0 & x_{01} & x_{02} & \dots & x_{0n} \\ 0 & 0 & x_{12} & \dots & x_{1n} \\ & & \ddots & \ddots & \vdots \\ & 0 & & \ddots & x_{n-1n} \\ & & & & 0 \end{pmatrix}.$$

Всего количество значащих x_{ij} равно $N = \sum_{k=1}^n k = \frac{n(n+1)}{2}$, т. е. имеется выборка случайной величины

ξ_x объёмом $N = \frac{n(n+1)}{2}$ (рис. 3).

На основе этой матрицы неизвестных концентраций получаем выборочное среднее значение по выборке:

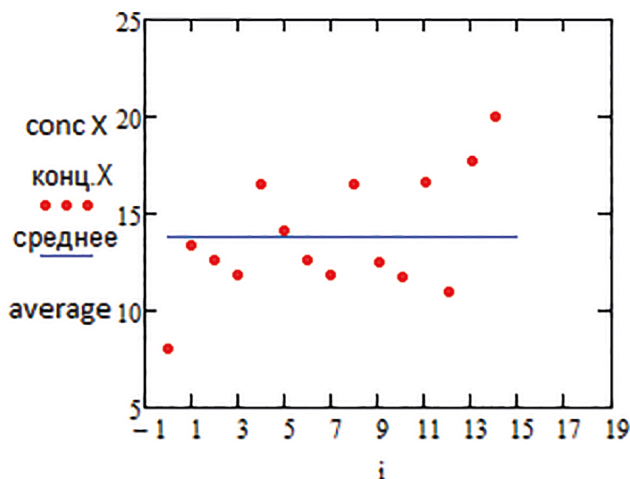


Рис. 3. Пример генеральной совокупности неизвестных концентраций
Figure 3. An example of a population of unknown concentrations

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_i \sum_{j, i < j} x_{ij} = \frac{2}{n(n+1)} \sum_i \sum_{j, i < j} x_{ij}.$$

Также получаем выборочное среднее квадратичное отклонение (СКО) по выборке:

$$s_x = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_i \sum_{j, i < j} (x_{ij} - \bar{x})^2} = \sqrt{\frac{2}{n(n+1)-2} \sum_i \sum_{j, i < j} (x_{ij} - \bar{x})^2}.$$

Теперь, зная значение \bar{x} , можно найти среднее значение % экстракции \bar{z} . Для этого используем соотношения с известными концентрациями из серии стандартных разведений.

Для 0- и 1-го отсчётов

$$\frac{(\bar{x} + C_0)z_0}{C'_1} = \frac{S_0}{S'_1} \Rightarrow z_0 = z_{01} = \frac{S_0C'_1}{(\bar{x} + C_0)S'_1}$$

...

Для 0-го и j -го отсчётов

$$\forall j \in \{1, \dots, m\} \Rightarrow \frac{(\bar{x} + C_0)z_0}{C'_j} = \frac{S_0}{S'_j} \Rightarrow z_{0j} = \frac{S_0C'_j}{(\bar{x} + C_0)S'_j}.$$

Получаем выборку случайной величины ξ_z объёмом m , для которой можно посчитать среднее значение.

$$z_{01}, z_{02}, \dots, z_{0j}, \dots, z_{0m} \Rightarrow \bar{z}_0 = \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m z_{0j}$$

$$\forall i, j : i \in \{0, \dots, n\}, j \in \{1, \dots, m\} \Rightarrow \frac{(\bar{x} + C_i)z_i}{C'_j} = \frac{S_i}{S'_j} \Rightarrow z_{ij} = \frac{S_iC'_j}{(\bar{x} + C_i)S'_j}$$

$$z_{i1}, z_{i2}, \dots, z_{ij}, \dots, z_{im} \Rightarrow \bar{z}_i = \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m z_{ij}$$

Выборку z_{ij} можно представить в виде матрицы $(n + 1) \times m$

$$\|z_{ij}\|_{(n+1) \times m} = \begin{pmatrix} z_{01} & z_{02} & \dots & z_{0m} \\ z_{11} & z_{12} & \dots & z_{1m} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ z_{n1} & z_{n2} & \dots & z_{nm} \end{pmatrix}.$$

Таким образом, имеется выборка случайной величины ξ_z объёмом $m(n + 1)$.

Пусть также вектор средних по строчкам значений запишем:

$$\|\bar{z}_i\| = \begin{pmatrix} \bar{z}_0 \\ \bar{z}_1 \\ \vdots \\ \bar{z}_n \end{pmatrix}.$$

Откуда выборочное среднее значение % экстракции определяется по формуле:

$$\bar{z} = \frac{1}{n+1} \sum_{i=0}^n \bar{z}_i = \frac{1}{n+1} \sum_{i=0}^n \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m z_{ij} = \frac{1}{m(n+1)} \sum_{i=0}^n \sum_{j=1}^m z_{ij}.$$

Также получаем выборочное СКО % экстракции:

$$s_z = \sqrt{\frac{1}{m(n+1)-1} \sum_i \sum_j (z_{ij} - \bar{z})^2}.$$

Проверка нормальности распределения

Далее распределение полученных выборок необходимо проверить на нормальность. Для этого выдвигаются и проверяются основная (H_0) и альтернативная (H_1) гипотезы.

H_0 : Значения измерений концентрации эндогенного вещества подчиняются нормальному закону распределения;

H_1 : Значения измерений концентрации эндогенного вещества не подчиняются нормальному закону распределения.

Для выбора критерия проверки предлагается руководствоваться таким параметром, как объём выборки. Если объём выборки менее 40, то можно использовать непараметрический критерий Колмогорова, в противном случае (объём выборки от 40 и более), согласно рекомендации, используется параметрический критерий Пирсона.

Непараметрический критерий Колмогорова строится на основании выборочной функции распределения $F(x)$, которая для вариационного ряда выборки $x_1 \leq x_2 \leq \dots \leq x_i \leq \dots \leq x_N$ равна:

$$F(x) = \begin{cases} 0, & x < x_1 \\ \frac{i}{N}, & x_i \leq x \leq x_{i+1}, i \in \{1, N-1\} \\ 1, & x < x_N \end{cases}$$

Проверяется степень различия выборочной $F(x)$ и гипотетической $F_0(x)$ функций распределения. В качестве меры отклонения считается максимальная по модулю разница между этими функциями:

$$D = \max |F(x) - F_0(x)|.$$

По теореме Колмогорова оценивается вероятность того, что расхождение между гипотетической и выборочной функцией распределения будет иметь полученное значение D . Теорема Колмогорова выглядит следующим образом:

$$\lim_{N \rightarrow \infty} P(\sqrt{N} D < \lambda) = k(\lambda),$$

где: $k(\lambda)$ — функция Колмогорова.

Таким образом, для проверки по критерию Колмогорова заданной выборки на нормальность, необходимо:

- 1) выбрать число интервалов для x и их границы;
- 2) определить для этих интервалов значения выборочной $F(x)$ и гипотетической $F_0(x)$ функций распределения;
- 3) определить максимальный модуль отклонения D этих функций по всем интервалам;
- 4) посчитать значение критерия для нашей конкретной выборки

$$\lambda = D\sqrt{N};$$

- б) задаться уровнем значимости α для проверки гипотезы;

- 7) посчитать критическое значение λ_α из формулы:

$$\lim_{N \rightarrow \infty} P(\lambda < \lambda_\alpha) = k(\lambda_\alpha) = 1 - \alpha;$$

- 8) сравнить значение критерия и критического значения.

Если $\lambda < \lambda_\alpha$, то гипотеза H_0 принимается с уровнем значимости α , т. е. делается вывод о нормальности закона распределения. Если $\lambda \geq \lambda_\alpha$, то гипотеза H_0 отвергается с уровнем значимости α .

Критерий Пирсона / Pearson's criterion

Параметрический критерий Пирсона строится на основании выборочной функции плотности вероятности.

Проверяется степень различия выборочной и гипотетической вероятностных функций. В качестве меры отклонения считается взвешенная сумма квадратов отклонений между выборочной и гипотетической вероятностными функциями:

$$Z = N \sum_{i=1}^r \frac{1}{p_i} \left(\frac{v_i}{N} - p_i \right)^2.$$

Распределение данной величины в случае нормального распределения выборки подчиняется закону хи-квадрат χ^2 . На этом и основан критерий Пирсона.

Таким образом, для проверки по критерию Пирсона заданной выборки на нормальность, необходимо:

- 1) выбрать число интервалов для x и их границы;
- 2) определить для этих интервалов значения выборочной $\frac{v_i}{N}$ и гипотетической p_i вероятностных функций;

- 3) посчитать значение критерия для нашей конкретной выборки;

- 4) задаться уровнем значимости α для проверки гипотезы;

- 5) определить критическое значение $\chi^2_{\alpha, r-1}$ с $r-1$ степенями свободы, где r — количество интервалов, l — количество параметров, которые оцениваются из выборки (для нормального распределения их 2 — среднее и СКО);

- б) сравнить значение критерия и критического значения.

Если $Z < \chi_{\alpha, r-1}^2$, то гипотеза H_0 принимается с уровнем значимости α , т. е. делается вывод о нормальности закона распределения. Если $Z \geq \chi_{\alpha, r-1}^2$, то гипотеза H_0 отвергается с уровнем значимости α .

Проверка на промаху / Check for outliers

Для обнаружения грубых ошибок (выбросов) можно воспользоваться *критерием Граббса*, в котором проверяются максимальные и минимальные значения выборки, для которых вычисляются следующие значения критерия:

$$G_1 = \frac{|\max(x_{ij}) - \bar{x}|}{S_{\bar{x}}}; \quad G_2 = \frac{|\min(x_{ij}) - \bar{x}|}{S_{\bar{x}}}$$

Критическое значение критерия Граббса G_T является табулированным значением.

Если $G_1 > G_T$, то значение $\max(x_{ij})$ считают промахом и исключают из выборки и дальнейшей обработки результатов измерений. Если $G_2 > G_T$, то значение $\min(x_{ij})$ считают промахом и исключают из выборки и дальнейшей обработки результатов измерений.

Интервальная оценка / Interval estimation

Получим интервальную оценку математического ожидания (неизвестной концентрации x).

$$\mu_x = \mu_{\bar{x}} = \mu; \quad s_{\bar{x}} = \frac{s_x}{\sqrt{N}}; \quad \frac{\bar{x} - \mu}{s_{\bar{x}}} = \frac{\bar{x} - \mu}{s_x} \sqrt{N} \in t_{N-1},$$

где t_{N-1} — распределение Стьюдента с числом степеней свободы $N - 1$.

Зададимся уровнем значимости $\alpha = 1 - P$ или доверительной вероятностью $P = 1 - \alpha$.

Пусть необходимо найти интервал, в котором окажется значение μ_x с вероятностью, например, 90 %, т. е. $p = 0,9$ (или $\alpha = 0,1$).

Возьмём 2 квантиля распределения Стьюдента $t_{N-1, \frac{\alpha}{2}}$ и $t_{N-1, 1-\frac{\alpha}{2}}$ ($t_{N-1, 0.05}$ и $t_{N-1, 0.95}$).

Вероятность того, что случайная величина $\frac{\bar{x} - \mu}{s_x} \sqrt{N}$ находится в интервале от $t_{N-1, \frac{\alpha}{2}}$ до $t_{N-1, 1-\frac{\alpha}{2}}$ равна

$$T(t_{N-1, \frac{\alpha}{2}}) - T(t_{N-1, 1-\frac{\alpha}{2}}) = 1 - \frac{\alpha}{2} - \frac{\alpha}{2} = 1 - \alpha = P = 0,9,$$

т. к. распределение Стьюдента симметрично, то $t_{N-1, \frac{\alpha}{2}} = -t_{N-1, 1-\frac{\alpha}{2}}$

$$P\left(t_{N-1, \frac{\alpha}{2}} < \frac{\bar{x} - \mu}{s_x} \sqrt{N} < t_{N-1, 1-\frac{\alpha}{2}}\right) = 1 - \alpha;$$

$$P\left(-t_{N-1, 1-\frac{\alpha}{2}} < \frac{\bar{x} - \mu}{s_x} \sqrt{N} < t_{N-1, 1-\frac{\alpha}{2}}\right) = 1 - \alpha;$$

$$P\left(-\frac{t_{N-1, 1-\frac{\alpha}{2}} s_x}{\sqrt{N}} < \bar{x} - \mu < \frac{t_{N-1, 1-\frac{\alpha}{2}} s_x}{\sqrt{N}}\right) = 1 - \alpha;$$

$$P\left(-\bar{x} - \frac{t_{N-1, 1-\frac{\alpha}{2}} s_x}{\sqrt{N}} < -\mu < -\bar{x} + \frac{t_{N-1, 1-\frac{\alpha}{2}} s_x}{\sqrt{N}}\right) = 1 - \alpha;$$

$$P\left(\bar{x} - \frac{t_{N-1, 1-\frac{\alpha}{2}} s_x}{\sqrt{N}} < \mu < \bar{x} + \frac{t_{N-1, 1-\frac{\alpha}{2}} s_x}{\sqrt{N}}\right) = 1 - \alpha.$$

Таким образом, доверительный интервал

$$\left[\bar{x} - \frac{t_{N-1, 1-\frac{\alpha}{2}} s_x}{\sqrt{N}}; \bar{x} + \frac{t_{N-1, 1-\frac{\alpha}{2}} s_x}{\sqrt{N}}\right].$$

Абсолютная погрешность

$$\Delta_{\bar{x}} = \frac{t_{N-1, 1-\frac{\alpha}{2}} s_x}{\sqrt{N}} = t_{N-1, 1-\frac{\alpha}{2}} s_{\bar{x}}.$$

Аналогичную обработку и оценку проводят также и для % экстракции.

Заключение / Conclusion

Разработана математическая методика расчёта концентрации эндогенных соединений в биообъектах, измеренной методом хроматографии, которая позволяет получить статистически достоверную интервальную оценку концентрации эндогенных соединений. Особенностью данной методики является использование исключительно анализируемого биообъекта для проведения количественного определения эндогенных веществ, без использования так называемых «чистых» биообъектов для калибровочных кривых. Это позволяет сохранить оригинальный биоматричный эффект при снятии хроматограммы. Также используется статистический аппарат для исключения возможных грубых ошибок.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Участие авторов. Красных Л.М. — оформление рукописи, работа с графическим материалом, редактирование и переработка рукописи; Смирнов В.В. — обоснование концепции исследования, планирование хроматографических и математических исследований, проведение сравнительного анализа, разработка дизайна экспериментального исследования, проведение хроматографических исследований, обобщение результатов исследования, формулировка выводов, интерпретация результатов исследования; Раменская Г.В. — консультация по вопросам планирования

эксперимента и оформления рукописи; Казанбеков С.Б. — анализ и обобщение данных литературы, сбор данных литературы, сбор и систематизация данных, разработка математической модели.

Participation of authors. Krasnykh LM — the manuscript, work with graphic material, manuscript editing and revision; Smirnov VV — substantiation of the research concept, planning of chromatographic and mathematical studies, comparative analysis, development of experimental research design, chromatographic research, generalization of research results, formulation of conclusions, interpretation of research results; Ramenskaya GV — consultation on the planning of the experiment and the design of the manuscript; Kazanbekov S.B. — Analysis and synthesis of literature data, collection of literature data, data collection and systematization, development of a mathematical model.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00003-20-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

Financing. This work was carried out as part of the state assignment of FSBI «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of Russia No. 056-00003-20-00 for conducting applied research (state registration number АААА-А18-118021590049-0).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interests. The authors declare that there is no conflict of interest requiring disclosure in this article.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Смирнов Валерий Валерьевич

Автор, ответственный за переписку

e-mail: vall@mail.mipt.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8232-6682>

д. фармац. н., профессор ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Smirnov Valery V.

Corresponding author

e-mail: vall@mail.mipt.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8232-6682>

D. Sci. in Pharmaceutical, professor FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenovskiy Uneversity), Moscow, Russia

Красных Людмила Михайловна

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3650-6014>

к. б. н. ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва, Россия

Krasnykh Ludmila M.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3650-6014>

Cand. Sci. Biology FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Раменская Галина Владиславовна

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8779-3573>

д. фарм. н., профессор ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Ramenskaya Galina V.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8779-3573>

D. Sci. in Pharmaceutical, professor FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenovskiy Uneversity), Moscow, Russia

Казанбеков Салман Бинямиевич

Аспирант ФГАОУ ВО Первый МГМУ

им. И.М. Сеченова Минздрава России

(Сеченовский Университет), Москва, Россия

Kazanbekov Salman B.

PhD student of FSAEI HE I.M. Sechenov First

MSMU MOH Russia (Sechenovskiy Uneversity),

Moscow, Russia

Литература / References

1. Петухова О.А., Раменская Г.В. Разработка селективной методики количественного определения тиамина в плазме крови. *Бюллетень медицинских Интернет-конференций*, 2013;3(3):607. [Petukhova OA, Ramenskaya GV. Development of a selective method for the quantitative determination of thiamine in blood plasma. *Bulletin of Medical Internet Conferences*. 2013;3(3):607. (In Russ).].

2. Bolton S., Bon Ch. *Pharmaceutical Statistics: Practical and Clinical Applications, Fifth Edition.* / *Drugs and Pharmaceutical Sciences*, New York: Informa Healthcare USA, 2010, 203, 656 p. [Bolton S., Bon Ch.

Pharmaceutical Statistics: Practical and Clinical Applications, Fifth Edition. / *Drugs and Pharmaceutical Sciences*, New York: Informa Healthcare USA, 2010, 203, 656 p.]

3. Смирнов В.В. Разработка методики определения кортизола и 6-бета-гидрокортизола в моче с целью установления активности изофермента СYP 3A4: Дис. канд. фарм. наук. — Москва; 2011 [Smirnov VV. Development of a method for determination of cortisol and 6-beta-hydroxycortisol in urine in order to establish the activity of CYP 3A4 isoenzyme. [dissertation] Moscow; 2011. (In Russ).].