

Кросс-валидация методик количественного определения феназепама и его активного метаболита в плазме крови человека при различной экстракции

А. И. Платова¹, И. И. Кузьмин¹, Д. В. Иващенко², И. И. Мирошниченко¹✉

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр психического здоровья» (ФГБНУ НЦПЗ). 115522, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 34

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 125993, Россия, г. Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1

✉ Контактное лицо: Мирошниченко Игорь Иванович. E-mail: igormir41@gmail.com

ORCID: А. И. Платова – <https://orcid.org/0000-0002-9682-4623>;

И. И. Кузьмин – <https://orcid.org/0000-0002-9326-4683>;

Д. В. Иващенко – <https://orcid.org/0000-0002-2295-7167>;

И. И. Мирошниченко – <https://orcid.org/0000-0003-4950-5336>.

Статья поступила: 06.10.2023

Статья принята в печать: 11.10.2024

Статья опубликована: 11.10.2024

Резюме

Введение. При проведении терапевтического лекарственного мониторинга (ТЛМ) часто возникает ситуация, когда концентрацию лекарственного средства измеряют разными методами или в разных лабораториях. Для объединения и анализа данных, полученных с помощью разных методов, необходимо выполнять перекрестную валидацию (кросс-валидацию). Применяемым для этого статистическим подходам уделяется недостаточное внимание.

Цель. Выполнить кросс-валидацию разных методик количественного определения феназепама (ФЕН) и 3-гидроксифеназепама (3-ОН-ФЕН) с помощью анализа Бленда – Альтмана.

Материалы и методы. Концентрации ФЕН и 3-ОН-ФЕН в плазме крови пациентов ($n = 100$) с синдромом отмены алкоголя были измерены с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС). В каждом образце содержание обоих аналитов измеряли двукратно с помощью двух разных методик: твердофазной экстракции (SPE, от *англ.* «solid phase extraction») и жидкостной экстракции с поддержкой (SLE, от *англ.* «supported liquid extraction»). Обе методики до начала эксперимента прошли полную валидацию. Кросс-валидация проводилась по завершении эксперимента с использованием данных от испытуемых образцов. Для оценки правильности (accuracy) и прецизионности (precision) использовали анализ Бленда – Альтмана. Для выявления систематической ошибки между методиками также применяли регрессионный анализ Деминга.

Результаты и обсуждение. Для обоих аналитов были получены регрессионные зависимости между концентрациями, измеренными разными методами пробоподготовки. 95%-й доверительный интервал (ДИ) коэффициентов обоих уравнений включал единицу, а 95%-й ДИ свободного члена включал ноль. 95%-й ДИ геометрического среднего индивидуальных отношений SLE/SPE находился в пределах допустимого диапазона (0,87; 1,15). Данные результаты подтверждают отсутствие влияния количественной методики на измерение концентрации обоих аналитов. 66,7%-й ДИ относительной погрешности между двумя измерениями находился в допустимых пределах (–0,2; 0,2), не превышая 20%-й диапазон от их среднего значения. Это подтверждает приемлемую прецизионность между методиками. Вычисленные доверительные интервалы отражены на диаграммах аналитического смещения по Бленду – Альтману.

Заключение. Применяемые в работе статистические подходы подтвердили сопоставимость результатов разных методик пробоподготовки. Описанный в работе статистический алгоритм с применением диаграмм аналитического смещения по Бленду – Альтману, помимо кросс-валидации, может успешно применяться для оценки правильности и прецизионности при валидации и оценке приемлемости аналитического цикла, а также при повторном анализе испытуемых образцов.

Ключевые слова: феназепам, 3-оксифеназепам, хроматография, масс-спектрометрия, кросс-валидация, метод Бленда – Альтмана, регрессия Деминга, правильность, прецизионность

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. А. И. Платова – разработка плана и проведение статистического анализа, интерпретация полученных результатов, составление статьи. И. И. Мирошниченко – постановка задачи. И. И. Кузьмин – измерение концентрации искомых веществ. Д. В. Иващенко – терапевтический лекарственный мониторинг.

Для цитирования: Платова А. И., Кузьмин И. И., Иващенко Д. В., Мирошниченко И. И. Кросс-валидация методик количественного определения феназепама и его активного метаболита в плазме крови человека при различной экстракции. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(4):212–222. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1924>

Cross-validation of methods for the quantitative determination of phenazepam and its active metabolite in human blood plasma at various extractions

Angelina I. Platova¹, Ivan I. Kuzmin¹, Dmitriy V. Ivaschenko², Igor I. Miroshnichenko¹✉

¹ Federal State Budgetary Scientific Institution "Mental Health Research Center". 34, Kashirskoe shosse, Moscow, 115522, Russia

² Russian Medical Academy of Continuous Professional Education. 2/1, Barrikadnaya str., Moscow, 125993, Russia

✉ **Corresponding author:** Igor I. Miroshnichenko. **E-mail:** igormir41@gmail.com

ORCID: Angelina I. Platova – <https://orcid.org/0000-0002-9682-4623>;

Ivan I. Kuzmin – <https://orcid.org/0000-0002-9326-4683>;

Dmitriy V. Ivaschenko – <https://orcid.org/0000-0002-2295-7167>;

Igor I. Miroshnichenko – <https://orcid.org/0000-0003-4950-5336>.

Received: 06.10.2023

Accepted: 11.10.2024

Published: 11.10.2024

Abstract

Introduction. In conducting of therapeutic drug monitoring (TDM), often such situation arises where the drug concentration has measured by different methods or in different laboratories. To combine and analyze the data obtained with different methods, it is necessary to perform cross-validation procedure. Insufficient attention is paid to the statistical approaches used for this purpose.

Aim. Performing cross-validation of different analytical methods for the quantitative determination of phenazepam (PHEN) and 3-hydroxyphenazepam (3-OH-PHEN) using the Bland – Altman analysis.

Materials and methods. PHEN and 3-OH-PHEN concentrations in the blood plasma of patients ($n = 100$) with alcohol withdrawal syndrome were measured using high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). The quantification of both analytes in each sample was measure twice by two different methods: solid phase extraction (SPE) and supported liquid extraction (SLE). Both methods have been fully validated before the experiment began. Cross-validation was performed at the end of the experiment using data from study samples. The Bland – Altman analysis was used to evaluate accuracy and precision. Deming regression was also used to identify a systematic error between measurement results.

Results and discussion. The regression equations have been obtained between concentrations both analytes measured by different sample preparation methods. 95 % confidence intervals (CI) of the regression coefficients of both equations included one, and 95 % CI of the intercepts included zero. 95 % CI of the geometric mean of the individual SLE/SPE ratios was within the acceptable range (0.87; 1.15). These results confirm the absence of the influence of quantitative methods on the measurement of both analytes concentration. 66.7 % CI of the percent difference between two measurements was within acceptable limits (–0.2; 0.2), not exceeding 20 % of the range of their mean value. This confirms the acceptable precision between the methods. The estimated CIs were displayed in the Bland – Altman plots.

Conclusion. The statistical approaches used in the work have confirmed the reproducibility of the results of different sample preparation methods. In addition to cross-validation, the statistical algorithm from this paper using Bland – Altman analysis can be successfully employed to assess accuracy and precision during bioanalytical method validation and evaluation of the acceptance of analytical runs, as well as to determine the level of reproducibility of incurred samples.

Keywords: phenazepam, 3-oxyphenazepam, chromatography, mass spectrometry, cross validation, Bland Altman analysis, Deming regression, accuracy, precision

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Angelina I. Platova developed a plan and carried out statistical analysis, interpreted the obtained results, participated in the preparation of the article. Igor I. Miroshnichenko has set the purpose. Ivan I. Kuzmin has measured the concentration of the desired substances. Dmitriy V. Ivaschenko has conducted TDM.

For citation: Platova A. I., Kuzmin I. I., Ivaschenko D. V., Miroshnichenko I. I. Cross-validation of methods for the quantitative determination of phenazepam and its active metabolite in human blood plasma at various extractions. *Drug development & registration*. 2024;13(4):212–222. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1924>

ВВЕДЕНИЕ

Валидация биоаналитических методик может быть полной, частичной или перекрестной (кросс-валидация) [1]. Полную валидацию проводят при разработке новой методики [2]. Частичная валидация необходима при переносе методики в другую лабораторию, замене оборудования, изменении аналитического диапазона, изменении типа биообразца или биологического вида, замене антикоагулянта, изменении пробоподготовки, условий хранения и так далее. Причем объем частичной валидации может ограничиваться лишь оценкой прецизионности и правильности внутри цикла или быть представлен проведением полной валидации¹. Так или иначе, вышеперечисленные изменения условий количественного определения могут приводить к возникновению сложной взаимосвязи между методиками, которая усугубляется при трансфере методики в другую лабораторию. Отсюда очевидна важность управления жизненным циклом любой методики, обеспечивающего четкое документирование взаимосвязи между ее различными модификациями [3].

Кросс-валидация требуется при необходимости объединения и/или сопоставления данных в следующих случаях: данные собраны с использованием различных, полностью валидированных методов в рамках одного или разных исследований; данные получены в разных лабораториях с использованием одного биоаналитического метода² [4]. Наиболее часто такая необходимость возникает при проведении ТЛМ. Суть кросс-валидации заключается в установлении эквивалентности методов, а точнее, воспроизводимости результатов выполненных с их помощью измерений. При этом применяемым для выполнения кросс-валидации статистическим подходам уделяется недостаточное внимание.

Современные международные и отечественные методические рекомендации по выполнению валидации подразумевают следующее. Кросс-валидация по возможности должна проводиться до анализа испытуемых образцов путем измерения одного и того же набора образцов контроля качества (QC) на низком, среднем и высоком уровнях аналитического диапазона по крайней мере в трех экземплярах. При этом полученные с помощью разных методик средние значения правильности не должны различаться более чем на $\pm 15\%$.

¹ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Доступно по: <https://www.alt.ru/tamdoc/16sr0085/> Ссылка активна на 06.10.2023.

² ICH M10 on bioanalytical method validation – Scientific guideline. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation-scientific-guideline>. Accessed: 15.01.2024.

Что касается исследуемых образцов, они должны охватывать диапазон концентраций, измеренных обеими методиками или в обеих лабораториях ($n \geq 30$). Причем погрешность между этими измерениями должна укладываться в диапазон 20 % от их среднего значения не менее чем для 67 % повторов³ [4]. Иными словами, сравнение правильности методик рекомендовано проводить с использованием образцов QC, сравнение прецизионности результатов измерений – с использованием исследуемых образцов. Тем не менее, очевидно, что для кросс-валидации необходимо сравнивать обе эти основные валидационные характеристики. Однако возможность провести кросс-валидацию до начала эксперимента зачастую может отсутствовать, особенно в ТЛМ, например при смене оборудования или расходников для экстракции. В этом случае кросс-валидацию можно выполнить уже в ходе эксперимента путем повторного анализа испытуемых образцов. Для этого важно располагать статистическим алгоритмом для сравнения и правильности, и прецизионности методик с целью получения исчерпывающей оценки сопоставимости выполненных с их помощью измерений.

Для иллюстрации процедуры кросс-валидации с использованием исследуемых образцов был выбран проект ТЛМ феназепама. Феназепам (бромдигидрохлорфенилбензодиазепин, ФЕН) – препарат для лечения психических расстройств, алкогольной зависимости и наркомании, судорожных приступов и других неврологических заболеваний [5, 6]. К сожалению, препарат не столь безобиден и зачастую употребляется не по назначению [7]. В организме человека ФЕН подвергается интенсивной биотрансформации с образованием активного метаболита 3-гидроксифеназепама (3-ОН-ФЕН) [8–10]. Фармакологический эффект ФЕН определяется в конечном итоге суммарным содержанием родительского вещества и 3-ОН-ФЕН, то есть так называемой активной фракцией (АМ, от *англ.* «active moiety») ФЕН. Разработанные и валидированные методики количественного определения ФЕН и 3-ОН-ФЕН были подробно описаны в нашей предыдущей публикации [11]. Эти методики отличались методом пробоподготовки: в одном случае применяли твердофазную экстракцию (SPE), в другом – жидкостную экстракцию с поддержкой (SLE). Для оценки сопоставимости результатов повторных измерений ФЕН и 3-ОН-ФЕН, выполненных с помощью разных методик, были использованы все полученные от пациентов образцы.

Для сравнения результатов измерений, полученных с помощью разных методик, использовали принципы и правила, общепринятые как для оценки соот-

³ ICH M10 on bioanalytical method validation – Scientific guideline. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation-scientific-guideline>. Accessed: 15.01.2024.

ветствия между методами и кросс-валидации, так и для оценки результатов повторного анализа образцов в рамках одной методики [3, 12–17].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Аналитическая часть

Методика определения подробно изложена в нашей публикации [11]. Вкратце, для измерений концентрации использовали жидкостной хроматограф UltiMate 3000 (Dionex, США), совмещенный с квадрупольным масс-спектрометром TSQ Quantiva (Thermo Fisher Scientific, США). Разделение образцов проводили на колонке Hypersil GOLD™ (3,5 мкм, внутренний диаметр 50 × 2,1 мм, Thermo Fisher Scientific, США). Для экстракции использовали патроны AccuBond SPE ODS-C18 (Agilent Technologies, США) и HyperSep™ SLE (Thermo Fisher Scientific, США). Анализ хроматограмм выполняли в программном обеспечении Thermo Xcalibur.

Терапевтический лекарственный мониторинг

Образцы были получены у 100 пациентов мужского пола в возрасте $41,5 \pm 8,5$ года, страдающих синдромом отмены алкоголя. Исследование было открытым (без ослепления) и проводилось по проспективному наблюдательному дизайну. Пациенты находились на стационарном лечении в МНПЦ наркологии и получали ФЕН в таблетированной форме в дозе $6,2 \pm 2,1$ мг/сут.

Плазму готовили следующим образом: 5 мл венозной крови помещали в вакутейнеры с ЭДТА с дальнейшим центрифугированием при 2500 g на 15 мин при температуре 4 °C и дальнейшем хранении при температуре –80 °C до проведения анализа в биоаналитической лаборатории.

Статистический анализ

Наличие различия в результатах измерений, выполненных разными методами, определяли с помощью Т-критерия Уилкоксона (для парных выборок).

Характер и величину систематической ошибки между измерениями, выполненными разными методами, оценивали с использованием ортогональной регрессии Деминга [18]. Этот метод регрессионного анализа учитывает случайный характер ошибки измерений для обоих методов и рекомендован современным руководством по валидации Европейского медицинского агентства¹.

Оценку правильности и прецизионности между измерениями, выполненными разными методами, проводили с помощью анализа Бленда – Альтма-

на. Для этого в качестве референтной была выбрана методика с SPE.

Статистический и графический анализ выполнялся в среде R с использованием пакетов: readxl, tidyverse, dplyr, ggplot2, stargazer, ggpubr, deming.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты ТЛМ показали значительный разброс уровня АМ ФЕН, что подчеркивает важность проведения лекарственного и терапевтического мониторинга при назначении этого препарата (рисунок 1).

Описательные статистики и тесты сравнения парных выборок недостаточно информативны для решения вопроса о степени сопоставимости концентраций, измеренных с помощью разных методик. Так, тестирование различий между парными выборками с помощью критерия Уилкоксона, позволяя обнаруживать систематический сдвиг между измерениями, выполненными двумя разными методами, все же не дает ответа на вопрос о степени их соответствия, определяемой разбросом индивидуальных отличий в каждом отдельном случае (таблица 1).

Таблица 1. Сравнение результатов измерений концентрации ФЕН и 3-ОН-ФЕН (нг/мл), измеренной разными методиками

Table 1. Comparison of PHEN and 3-OH-PHEN concentrations (ng/ml) measured by using different methods

Статистические параметры Statistical parameters	3-ОН-ФЕН 3-OH-PHEN		ФЕН PHEN	
	SLE	SPE	SLE	SPE
N	100	100	100	100
Среднее Average	57,3	58,2	216,1	216
SD Standard deviation	42,6	45,1	144,7	146,7
Минимум Minimum	6,7	6,9	2	1,8
25-й процентиль 25th percentile	33,7	33,3	112,8	109,8
Медиана Median	46,1	47,9	199,5	187,1
75-й процентиль 75th percentile	68,7	69	274,2	292,2
Максимум Maximum	289,4	330	901	862
Р-величина (критерий Уилкоксона) P-value (Wilcoxon test)	0,118		0,41	

Для оценки сопоставимости количественных методов обычно применяют регрессионный анализ по Пассингу – Баблоку (непараметрический анализ) или ортогональную регрессию Деминга. В нашей работе

¹ ICH M10 on bioanalytical method validation – Scientific guideline. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation-scientific-guideline>. Accessed: 15.01.2024.

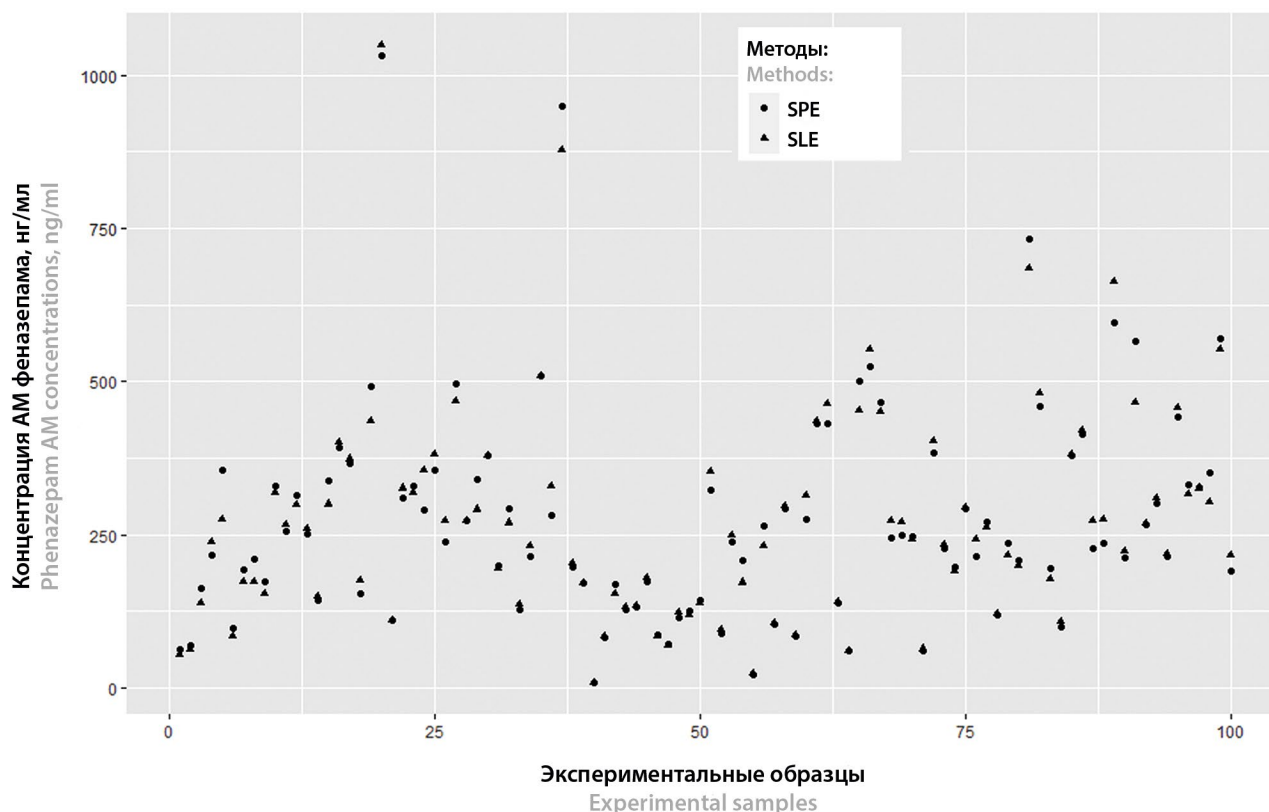


Рисунок 1. Диаграмма рассеяния уровня активной фракции феназепама (ФЕН и 3-ОН-ФЕН), измеренного при различных методах экстракции

Figure 1. Scatter plot of the phenazepam active moiety (PHEN+3OH-PHEN) levels measured by different extraction methods

выбор был сделан в пользу анализа Деминга, учитывающего случайный характер ошибки измерения для обоих методов.

95%-й ДИ свободного члена регрессии Деминга для обоих аналитов включал 0,00, а коэффициент регрессии (наклон прямой) – 1,00, что подтверждает отсутствие систематической ошибки между методами (рисунок 2).

Коэффициент детерминации (r^2) как показатель качества регрессионной модели отражает долю общей вариации зависимой переменной, объясненную независимой переменной, но не отражает степень согласия между ними (см. раздел «Материалы и методы»). Поэтому для целей кросс-валидации этот показатель не имеет смысла.

Для оценки возможности применения метода Бленда – Альтмана сначала тестировали гипотезу о нормальности распределения разности log-преобразованных значений концентрации, измеренной методами SPE и SLE, а также относительной погрешности результатов измерений. Линии на гистограммах распределения показывают нормальное распределение. Нормальность распределения указанных вели-

чин для ФЕН и 3-ОН-ФЕН была подтверждена с помощью теста Шапиро – Уилка (полученные р-величины были больше 0,05) (рисунок 3).

Результаты сравнения правильности и прецизионности методик количественного определения ФЕН и 3-ОН-ФЕН представлены в виде графиков Бленда – Альтмана (рисунок 4). На всей протяженности измеряемого диапазона 95%-й ДИ линии регрессии отношения результатов измерений от их геометрического среднего включает 1,00 (рисунок 5 А и В), а 95%-й ДИ линии регрессии относительной погрешности результатов измерений от их среднего включает 0,00 (рисунок 5 С и D), что означает отсутствие связи величин отношения результатов измерений и их относительной погрешности с уровнем концентрации. С учетом логнормального распределения величины отношения результатов измерений диаграмма Бленда – Альтмана представляет собой не разность результатов измерений против их средних арифметических, а отношение результатов измерений против их средних геометрических (рисунок 4 А и В).

95%-й ДИ геометрического среднего отношения результатов измерений SLE/SPE показаны на диаграм-

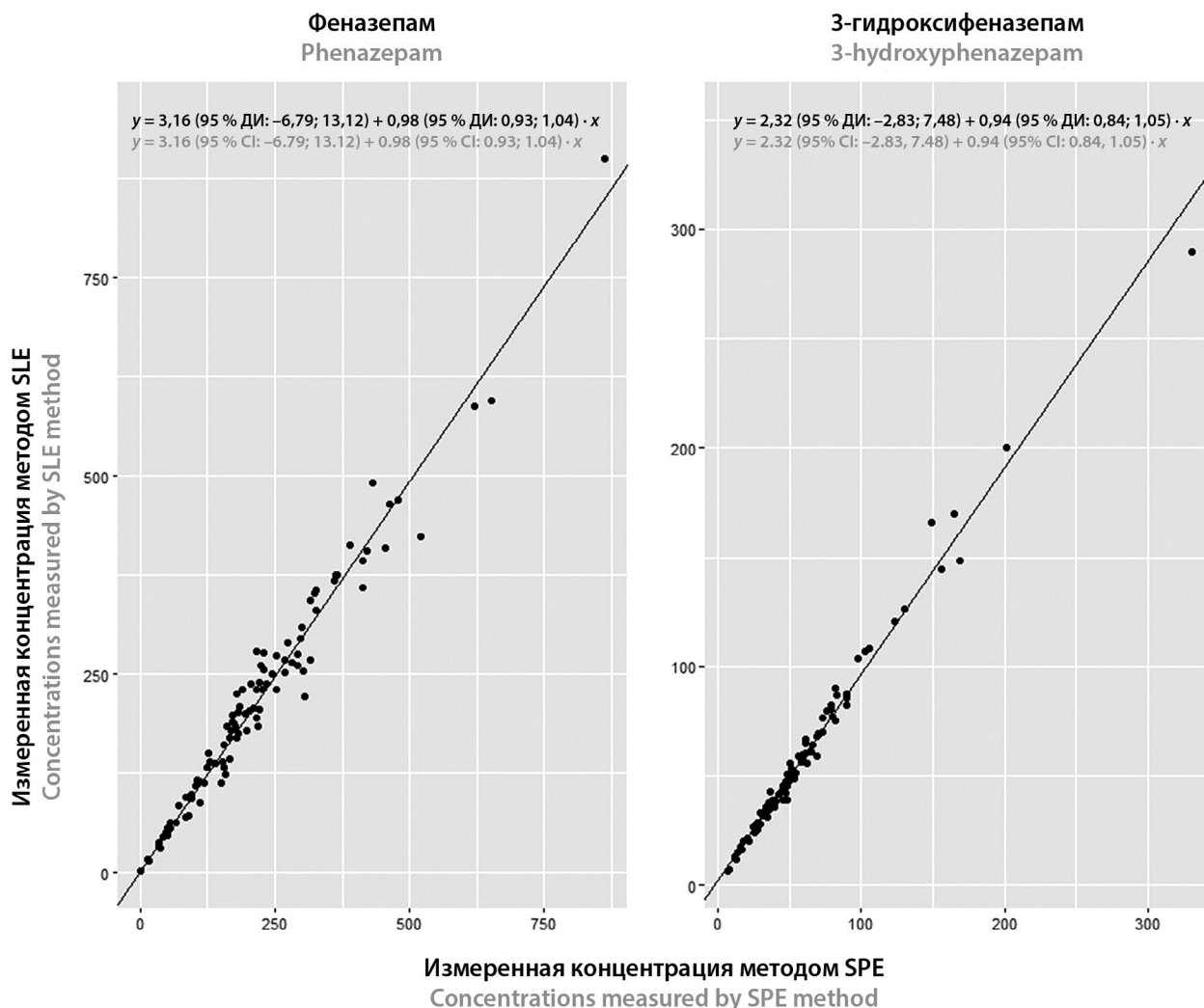


Рисунок 2. Регрессионные зависимости по Демингу между концентрациями, измеренными с помощью SLE и SPE
Figure 2. Deming regressions of measured by SLE and SPE concentrations

мах А и В пунктирной линией, сплошными линиями выделены геометрическое среднее и приемлемые для него границы.

Интервалы согласия показаны на диаграммах С и D точечными линиями, сплошные линии отражают

границы согласия и среднее относительной погрешности измерений. Заливка отображает 95%-й ДИ линии регрессии.

Рассчитанные диапазоны правильности и прецизионности лежат в допустимых границах, что позво-

Таблица 2. Кросс-валидация разных методик количественного определения ФЕН и 3-ОН-ФЕН

Table 2. Cross-validation of different methods of PHEN and 3-OH-PHEN quantitative determination

Аналит Analyt	ФЕН PHEN	3-ОН-ФЕН 3-OH-PHEN	Допустимый диапазон Acceptable range
Правильность: геометрическое среднее (95%-й ДИ) отношения SLE/SPE, % Accuracy: geometric mean of SLE/SPE ratio (95 % CI), %	100,48 (98,23; 102,78)	98,98 (97,67; 100,31)	(87;115)
Прецизионность: интервал согласия Precision: limits of agreement	0,005 (-0,11; 0,12)	-0,01 (-0,08; 0,06)	(-0,20; 0,20)

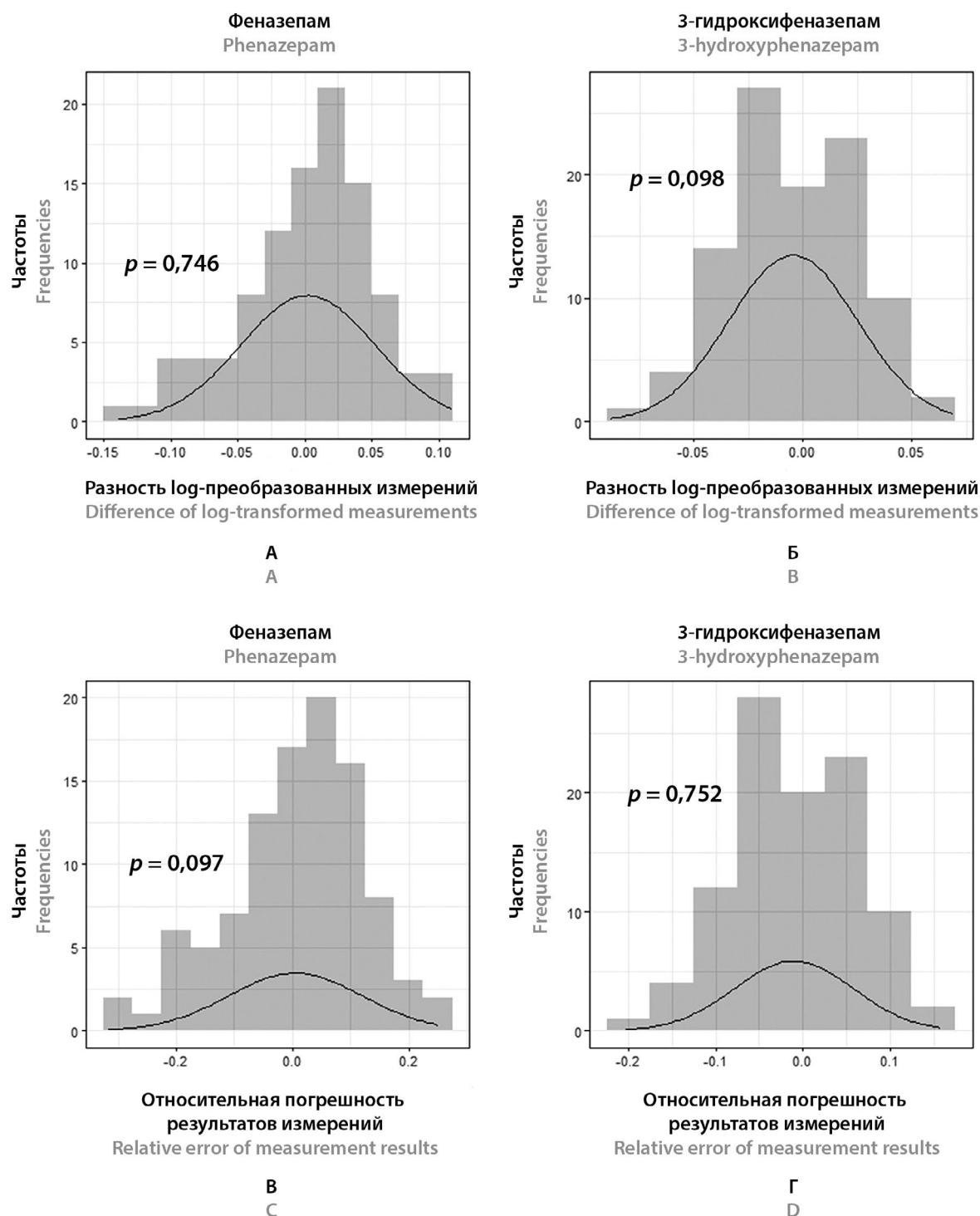


Рисунок 3. Гистограммы частотного распределения разности log-преобразованных значений концентрации ФЕН и 3-ОН-ФЕН (А и В), а также относительной погрешности результатов измерений

Figure 3. Histograms of frequency distribution of differences between log-transformed PHEN and 3-OH-PHEN concentrations (A and B), as well as of the relative error of the measurement results

ляет рассматривать сравниваемые методики как взаимозаменяемые (таблица 2).

Практическая значимость кросс-валидации заключается в том, что она подтверждает получение сопоставимых значений концентрации в одном и

том же образце при разных аналитических подходах [18]. Кросс-валидация проводилась в ряде работ: для результатов, полученных с использованием ВЭЖХ-МС/МС на разных приборах, при сравнении методов масс-спектрометрии и иммуноферментного

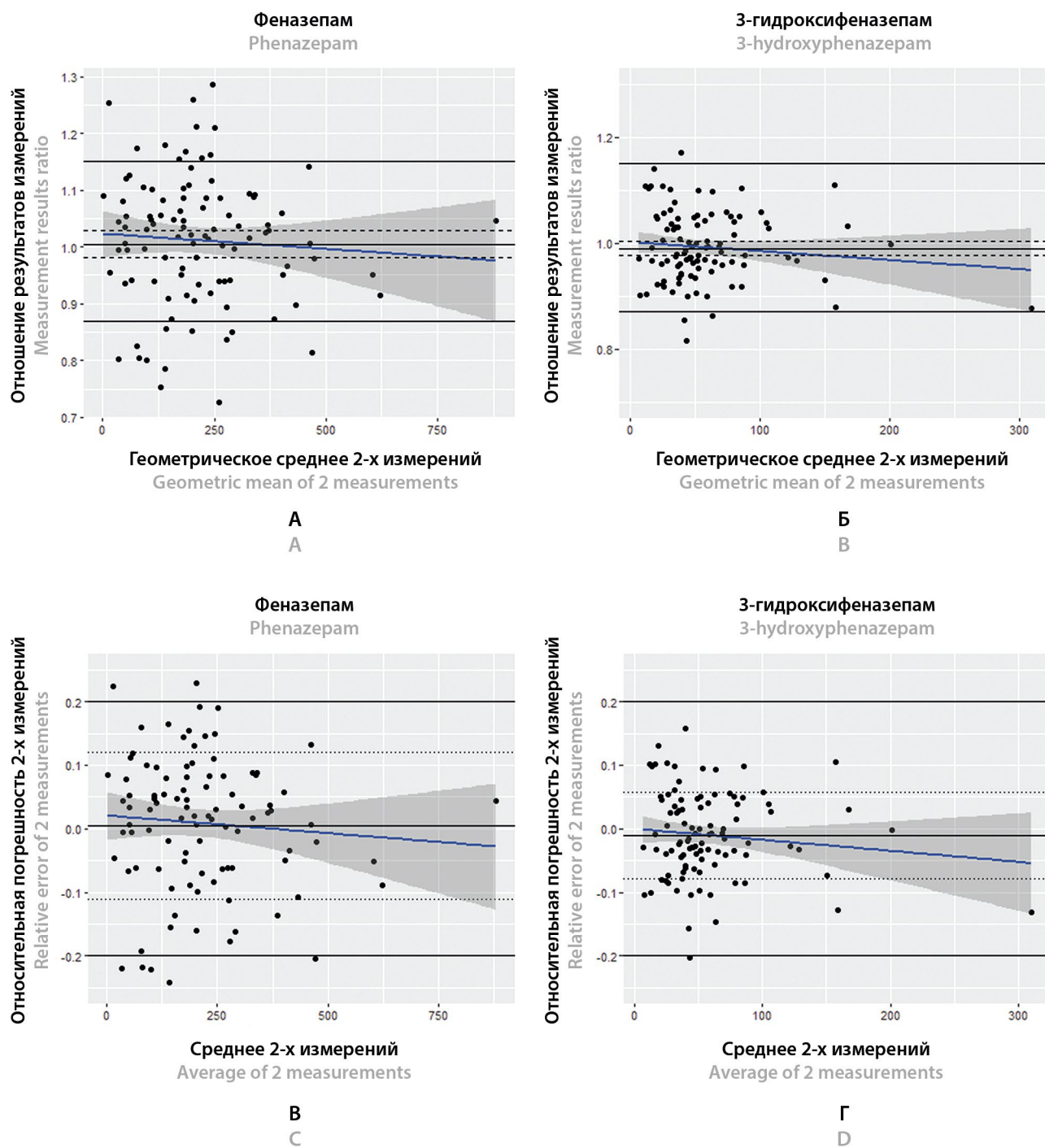


Рисунок 4. Диаграммы аналитического смещения Бленда – Альтмана

Figure 4. Bland – Altman plots of analytical displacement

анализа, а также сравнении двух методов пробоподготовки (микрокапилляры и метод сухих пятен) [19–21]. Потребность в межлабораторной валидации также может возникать при получении сомнительного качества первичных результатов [22].

Стоит отметить, что допустимый диапазон и методы оценки правильности и прецизионности при процедуре кросс-валидации идентичны требованиям,

предъявляемым к повторному анализу образцов (incurred samples), а также критериям приемлемости аналитического цикла¹ [19].

¹ ICH M10 on bioanalytical method validation – Scientific guideline. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation-scientific-guideline>. Accessed: 15.01.2024.

Обычно для анализа Бленда – Альтмана предусматривается не менее 30 образцов, чтобы выборки не были малыми. В нашем эксперименте в анализ на соответствие результатов измерений с помощью различных методик вошли все испытуемые образцы эксперимента (100 образцов), то есть была получена репрезентативная выборка.

Неприемлемость корреляционного анализа. Правильность. Оценка систематической ошибки между методиками. Полученные с помощью различных методик средние значения правильности для образцов QC не должны различаться более чем на $\pm 15\%$ ¹. Если правильность определять как величину процентной меры $A \cdot 100\%/x$, то, исходя из условия выше,

получаем, что средняя величина $\frac{A \cdot 100\%/x}{B \cdot 100\%/x} = A/B$

должна находиться в интервале (0,87; 1,15), где x – истинное значение концентрации; A – величина концентрации, измеренная методом А; B – величина концентрации, измеренная методом В. Границы интервала несимметричны, так как основаны на равенствах: $1/0,87 = 1,15$ и, наоборот, $1/1,15 = 0,87$. Для того чтобы показать приемлемую правильность при кросс-валидации, сначала находят среднее отношение результатов двух измерений, вычисляют его 95%-й ДИ и подтверждают, что этот ДИ находится в пределах от 0,87 до 1,15. Очевидно, если данные требования применимы при повторном измерении образцов QC, они также могут применяться и для испытуемых образцов.

Принято считать, что остаточные концентрации лекарств в крови подчиняются логнормальному распределению. Поэтому величину различия между измеренными концентрациями (A/B) подвергали лог-преобразованию (по основанию 10^2): $\log(A/B) = \log A - \log B$, удостоверившись, что эта величина подчиняется нормальному распределению (тест Шапиро – Уилка), и вычисляли ее среднее ($\bar{d}$) и стандартное отклонение (SD).

Далее вычисляли геометрическое среднее для каждого образца $\text{Mean}_{\text{geom.}} = \sqrt{A \cdot B}$.

После обратной операции – потенцирования – вычисляли среднее геометрическое для величины

A/B , $10^{\bar{d}}$, и его 95%-й ДИ, $10^{\bar{d} \pm t_{\alpha/2, n-1} \cdot SD/\sqrt{n}}$, где n – размер выборки (в нашем случае $n = 100$); $t_{\alpha/2, n-1}$ – критическое значение t -статистики (распределения Стьюдента) с уровнем значимости α ($1 - 0,95 = 0,05$) и числом степеней свободы $n - 1$.

Такая процедура оценки различия результатов измерений двух методов отражает метод Бленда – Альтмана, а ее результат представляется в виде одноименной диаграммы рассеяния, по оси X которой откладывается среднее геометрическое каждого повторных измерений, а по Y – их отношение [12, 13, 16, 23].

Прецизионность. Границы согласия. Погрешность между двумя значениями испытуемых образцов должна укладываться в диапазон 20 % от их среднего значения не менее чем для 67 % повторностей³. Это требование согласуется с правилом «4-6-20» [15], означающим, что отклонения для 4 из 6 образцов (2/3) при повторном измерении должны лежать в пределах 20 % различий. Известно, что при нормальном распределении случайной величины 66,6 % (т.е. 2/3) ее значений будет находиться в диапазоне (среднее $\pm t_{\alpha/2, n-1} \cdot SD$). Так как для вероятности 66 % критическое значение $t_{\alpha/2, n-1} = 0,9542 \approx 1$, этот диапазон будет следующим: среднее $\pm 1 \cdot SD$. Другими словами, 66,6%-й ДИ относительной погрешности между измерениями разных методик составит: среднее относительной погрешности $\pm 1 \cdot SD$. Исходя из регуляторных требований, получаем, что 67%-й ДИ величины $2(A - B)/(A + B)$ не должен пересекать границы $(-0,2; 0,2)$. Этот интервал также называют границами согласия [13].

Для наглядного представления прецизионности между методиками на диаграмме Бленда – Альтмана по оси X откладывается среднее двух измерений, а по Y – их относительная погрешность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты кросс-валидации двух методик количественного определения ФЕИ и 3-ОН-ФЕИ показали, что величины правильности и прецизионности находятся в допустимых диапазонах (0,85; 1,15) и $(-0,20; 0,20)$ соответственно.

Применение регрессии Деминга стоит рассматривать как дополнительный метод тестирования соответствия результатов измерений разными методами.

Подробно описанный в работе статистический подход может применяться при проведении кросс-валидации, а также повторном анализе испытуемых об-

¹ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Доступно по: <https://www.alt.ru/tamdoc/16sr0085/> Ссылка активна на 06.10.2023.

² Исходя из свойств логарифмов, при любом основании (за исключением 0 и 1) будет получена величина, подчиняющаяся нормальному закону распределения. Поэтому выбор основания при логарифмировании логнормальной величины не имеет существенного значения, тем не менее наиболее часто в качестве основания при лог-преобразовании используют экспоненту или число 10.

³ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Доступно по: <https://www.alt.ru/tamdoc/16sr0085/> Ссылка активна на 06.10.2023.

разцов. Необходимо отметить универсальность данного подхода: кросс-валидация успешно применяется для анализа эффективности алгоритма машинного обучения на новых наборах данных, на которых искусственный интеллект не обучался [24].

ЛИТЕРАТУРА

1. Раменская Г.В., Шохин И.Е., Савченко А.Ю., Давыдова К.С., Кукес В.Г. Обзор требований к валидации биоаналитических методик. *Ремедиум*. 2011;12:60–63.
2. Эпштейн Н.А. Валидация аналитических методик: графические и расчетные критерии для оценки линейности методик на практике. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(2):122–130. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-122-130.
3. Briggs R.J., Nicholson R., Vazvaei F., Busch J., Mabuchi M., Mahesh K.S., Brudny-Kloeppel M., Weng N., Galvinas P.A.R., Duchene P., Hu P., Abbott R.W. Method transfer, partial validation, and cross validation: recommendations for best practices and harmonization from the global bioanalysis consortium harmonization team. *The AAPS Journal*. 2014;16(6):1143–1148. DOI: 10.1208/s12248-014-9650-3.
4. Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry. FDA. Biopharmaceutics; 2018. 44 p.
5. Городничев А.В., Костюкова Е.Г. Место феназепама в современном применении бензодиазепиновых транквилизаторов. *Современная Терапия Психических Расстройств*. 2011;2:26–29.
6. Syrjanen R., Greene S.L., Weber C., Smith J.L., Hodgson S.E., Abouchdid R., Gerostamoulos D., Maplesden J., Knott J., Hollerer H., Rotella J.-A., Graudins A., Schumann J.L. Characteristics and time course of benzodiazepine-type new psychoactive substance detections in Australia: results from the Emerging Drugs Network of Australia – Victoria project 2020–2022. *International Journal of Drug Policy*. 2023;122:104245. DOI: 10.1016/j.drugpo.2023.104245.
7. Акимова В.Д., Барсегян С.С., Плетенева Т.В. Персонализированный характер токсических эффектов на примере массовых несмертельных отравлений феназепамом и другими психоактивными веществами. *Судебно-медицинская экспертиза*. 2024;67(1):47–55.
8. Воронина Т.А., Ларионов В.Б., Головенко Н.Я., Неробкова Л.Н., Гайдуков И.О. Роль 3-оксиметаболита феназепама и леваны в реализации их нейротропного действия. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2014;1:44–49.
9. Ivashchenko D.V., Rudik A.V., Poloznikov A.A., Nikulin S.V., Smirnov V.V., Tonevitsky A.G., Bryun E.A., Sychev D.A. Which cytochrome P450 metabolizes phenazepam? Step by step *in silico*, *in vitro*, and *in vivo* studies. *Drug Metabolism and Personalized Therapy*. 2018;33(2):65–73. DOI: 10.1515/dmpt-2017-0036.
10. Zastrozhin M.S., Skryabin V.Yu., Sorokin A.S., Petukhov A.E., Smirnov V.V., Pankratenko E.P., Grishina E.A., Ryzhikova K.A., Panov A.S., Savchenko L.M., Bryun E.A., Sychev D.A. CYP3A subfamily activity affects the equilibrium concentration of Phenazepam® in patients with anxiety disorders and comorbid alcohol use disorder. *Pharmacogenomics*. 2020;21(7):449–457. DOI: 10.2217/pgs-2019-0071.
11. Мирошниченко И.И., Платова А.И., Кузьмин И.И., Иващенко Д.В. Количественное определение феназепама и его активного метаболита в плазме крови человека при различных процедурах экстракции. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(3):199–207. DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-3-1609.
12. Bland J.M., Altman D.G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *The Lancet*. 1986;1(8476):307–310.
13. Rocci M.L., Devanarayan V., Haughey D.B., Jardieu P. Confirmatory reanalysis of incurred bioanalytical samples. *The AAPS Journal*. 2007;9(3):E336–E143.
14. Kelley M. Incurred sample reanalysis: it is just a matter of good scientific practice. *Bioanalysis*. 2011;3(9):931–932. DOI: 10.4155/bio.10.215.
15. Kringle R. O. An assessment of the 4-6-20 rule for acceptance of analytical runs in bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies. *Pharmaceutical research*. 1994;11(4):556–560. DOI: 10.1023/a:1018922701174.
16. Giavarina D. Understanding Bland Altman analysis. *Biochemia Medica*. 2015;25(2):141–151. DOI: 10.11613/BM.2015.015.
17. Eastwood B.J., Farnen M.W., Iversen P.W., Craft T.J., Smallwood J.K., Garbison K.E., Delapp N.W., Smith G.F. The minimum significant ratio: a statistical parameter to characterize the reproducibility of potency estimates from concentration-response assays and estimation by replicate-experiment studies. *Journal of Biomolecular Screening*. 2006;11(3):253–261. DOI: 10.1177/1087057105285611.
18. Kocur A., Rubik J., Czarnowski P., Czajkowska A., Marszałek D., Sierakowski M., Górka M., Pawiński T. Therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid (MPA) using volumetric absorptive microsampling (VAMS) in pediatric renal transplant recipients: ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analytical method development, cross-validation, and clinical application. *Pharmacological Reports*. 2023;75(4):1026–1042. DOI: 10.1007/s43440-023-00509-w.
19. Mano Yu. Method validation studies and an inter-laboratory cross validation study of lenvatinib assay in human plasma using LC-MS/MS. *Practical Laboratory Medicine*. 2018;12:e00103. DOI: 10.1016/j.plabm.2018.e00103.
20. Marin C., Khoudour N., Millet A., Lebert D., Bros P., Thomas F., Ternant D., Lacarelle B., Guitton J., Ciccolini J., Blanchet B. Cross-Validation of a Multiplex LC-MS/MS Method for Assaying mAbs Plasma Levels in Patients with Cancer: A GPCO-UNICANCER Study. *Pharmaceuticals*. 2021;14(8):796. DOI: 10.3390/ph14080796.
21. Wickremsinhe E.R., Decker R.L., Lee L.B., Lelle E., Carlton L.A., Keller S.Y., Prakash A. Microsampling in pediatric studies: pharmacokinetic sampling for baricitinib (Olumiant™) in global pediatric studies. *Bioanalysis*. 2023;15(11):621–636. DOI: 10.4155/bio-2023-0044.
22. Meyer J.A., DeChenne S., Foerder C.A., Hengel S.M. Bioanalysis of tucatinib and metabolite, and a five-way cross-validation to support clinical pharmacokinetic analysis. *Bioanalysis*. 2022;14(22):1443–1452. DOI: 10.4155/bio-2022-0199.
23. Peris-Vicente J., Esteve-Romero J., Carda-Broch S. Validation of analytical methods based on chromatographic techniques: An overview. In: Anderson J.L., Berthod A., Estévez V.P., Stalcu A.M., editors. *Analytical Separation Science*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2015. P. 1757–1808. DOI: 10.1002/9783527678129.assep064.
24. Yang C., Liu Z., Fang Y., Cao X., Xu G., Wang Z., Hu Z., Wang S., Wu X. Development and validation of a clinic machine-learning nomogram for the prediction of risk stratifications of prostate cancer based on functional subsets of peripheral lymphocyte. *Journal of Translational Medicine*. 2023;21(1):465. DOI: 10.1186/s12967-023-04318-w.

REFERENCES

1. Ramenskaya G. V., SHohin I. E., Savchenko A. Yu., Davidova K. S., Kukes V. G. Comparative requirements to validation of bioanalytical methods. *Remedium*. 2011;12:60–63. (In Russ.)
2. Epshtein N. A. Validation of Analytical Procedures: Graphic and Calculated Criteria for Assessment of Methods Linearity in Practice. *Drug development & registration*. 2019;8(2):122–130. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-122-130.
3. Briggs R. J., Nicholson R., Vazvaei F., Busch J., Mabuchi M., Mahesh K. S., Brudny-Kloeppel M., Weng N., Galvinas P. A. R., Duchene P., Hu P., Abbott R. W. Method transfer, partial validation, and cross validation: recommendations for best practices and harmonization from the global bioanalysis consortium harmonization team. *The AAPS Journal*. 2014;16(6):1143–1148. DOI: 10.1208/s12248-014-9650-3.
4. Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry. FDA. Biopharmaceutics; 2018. 44 p.
5. Gorodnichev A. V., Kostyukova E. G. The place of phenazepam in modern use of benzodiazepine tranquilizers. *Current Therapy of Mental Disorders*. 2011;2:26–29. (In Russ.)
6. Syrjanen R., Greene S. L., Weber C., Smith J. L., Hodgson S. E., Abouchedid R., Gerostamoulos D., Maplesden J., Knott J., Hollerer H., Rotella J.-A., Graudins A., Schumann J. L. Characteristics and time course of benzodiazepine-type new psychoactive substance detections in Australia: results from the Emerging Drugs Network of Australia – Victoria project 2020–2022. *International Journal of Drug Policy*. 2023;122:104245. DOI: 10.1016/j.drugpo.2023.104245.
7. Akimova V. D., Barseganyan S. S., Pleteneva T. V. Personalized character of toxic effects through mass nonlethal poisoning by phenazepam and psychoactive substances. *Forensic Medical Expertise*. 2024;67(1):47–55. (In Russ.) DOI: 10.17116/sudmed20246701147.
8. Voronina T. A., Larionov V. B., Golovenko N. Ya., Nerobkova L. N., Gaidukov I. O. Role of 3-oximetabolite phenazepam and levan in realize their neurotropic efficacy. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2014;1:44–49. (In Russ.)
9. Ivashchenko D. V., Rudik A. V., Poloznikov A. A., Nikulin S. V., Smirnov V. V., Tonevitsky A. G., Bryun E. A., Sychev D. A. Which cytochrome P450 metabolizes phenazepam? Step by step *in silico*, *in vitro*, and *in vivo* studies. *Drug Metabolism and Personalized Therapy*. 2018;33(2):65–73. DOI: 10.1515/dmpt-2017-0036.
10. Zastrozhin M. S., Skryabin V. Yu., Sorokin A. S., Petukhov A. E., Smirnov V. V., Pankratenko E. P., Grishina E. A., Ryzhikova K. A., Panov A. S., Savchenko L. M., Bryun E. A., Sychev D. A. CYP3A subfamily activity affects the equilibrium concentration of Phenazepam® in patients with anxiety disorders and comorbid alcohol use disorder. *Pharmacogenomics*. 2020;21(7):449–457. DOI: 10.2217/pgs-2019-0071.
11. Miroshnichenko I. I., Platova A. I., Kuzmin I. I., Ivaschenko D. V. Quantitative determination of phenazepam and its active metabolite in human blood plasma at different extraction procedures. *Drug development & registration*. 2024;13(3):199–207. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-3-1609.
12. Bland J. M., Altman D. G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *The lancet*. 1986;1(8476):307–310.
13. Rocci M. L., Devanarayan V., Haughey D. B., Jardieu P. Confirmatory reanalysis of incurred bioanalytical samples. *The AAPS Journal*. 2007;9(3):E336–E143.
14. Kelley M. Incurred sample reanalysis: it is just a matter of good scientific practice. *Bioanalysis*. 2011;3(9):931–932. DOI: 10.4155/bio.10.215.
15. Kringle R. O. An assessment of the 4-6-20 rule for acceptance of analytical runs in bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies. *Pharmaceutical research*. 1994;11(4):556–560. DOI: 10.1023/a:1018922701174.
16. Giavarina D. Understanding Bland Altman analysis. *Biochemia Medica*. 2015;25(2):141–151. DOI: 10.11613/BM.2015.015.
17. Eastwood B. J., Farnen M. W., Iversen P. W., Craft T. J., Smallwood J. K., Garbison K. E., Delapp N. W., Smith G. F. The minimum significant ratio: a statistical parameter to characterize the reproducibility of potency estimates from concentration-response assays and estimation by replicate-experiment studies. *Journal of Biomolecular Screening*. 2006;11(3):253–261. DOI: 10.1177/1087057105285611.
18. Kocur A., Rubik J., Czarnowski P., Czajkowska A., Marszałek D., Sierakowski M., Górka M., Pawiński T. Therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid (MPA) using volumetric absorptive microsampling (VAMS) in pediatric renal transplant recipients: ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analytical method development, cross-validation, and clinical application. *Pharmacological Reports*. 2023;75(4):1026–1042. DOI: 10.1007/s43440-023-00509-w.
19. Mano Yu. Method validation studies and an inter-laboratory cross validation study of lenvatinib assay in human plasma using LC-MS/MS. *Practical Laboratory Medicine*. 2018;12:e00103. DOI: 10.1016/j.plabm.2018.e00103.
20. Marin C., Khoudour N., Millet A., Lebert D., Bros P., Thomas F., Ternant D., Lacarelle B., Guitten J., Ciccolini J., Blanchet B. Cross-Validation of a Multiplex LC-MS/MS Method for Assaying mAbs Plasma Levels in Patients with Cancer: A GPCO-UNICANCER Study. *Pharmaceuticals*. 2021;14(8):796. DOI: 10.3390/ph14080796.
21. Wickremsinhe E. R., Decker R. L., Lee L. B., Lelle E., Carlton L. A., Keller S. Y., Prakash A. Microsampling in pediatric studies: pharmacokinetic sampling for baricitinib (Olumiant™) in global pediatric studies. *Bioanalysis*. 2023;15(11):621–636. DOI: 10.4155/bio-2023-0044.
22. Meyer J. A., DeChenne S., Foerder C. A., Hengel S. M. Bioanalysis of tucatinib and metabolite, and a five-way cross-validation to support clinical pharmacokinetic analysis. *Bioanalysis*. 2022;14(22):1443–1452. DOI: 10.4155/bio-2022-0199.
23. Peris-Vicente J., Esteve-Romero J., Carda-Broch S. Validation of analytical methods based on chromatographic techniques: An overview. In: Anderson J. L., Berthod A., Estévez V. P., Stalcu A. M., editors. *Analytical Separation Science*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2015. P. 1757–1808. DOI: 10.1002/9783527678129.assep064.
24. Yang C., Liu Z., Fang Y., Cao X., Xu G., Wang Z., Hu Z., Wang S., Wu X. Development and validation of a clinic machine-learning nomogram for the prediction of risk stratifications of prostate cancer based on functional subsets of peripheral lymphocyte. *Journal of Translational Medicine*. 2023;21(1):465. DOI: 10.1186/s12967-023-04318-w.