<table>
<tr><td></td><td colspan="3">ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России

ЛАБОРАТОРИЯ ТОКСИКОЛОГИИ
(ОТДЕЛ АНАЛИТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ)

НАУЧНОГО ЦЕНТРА
ИННОВАЦИОННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ
С ОПЫТНО-ПРОМЫШЛЕННЫМ ПРОИЗВОДСТВОМ</td></tr>
<tr><td rowspan="3">СОП №:
Х/П-001-2022/4</td><td>Номер версии:</td><td>Число страниц:</td></tr>
<tr><td>4</td><td>7</td></tr>
<tr><td>Дата начала действия версии СОП:</td><td>Дата окончания действия версии СОП:</td></tr>
<tr><td></td><td>08.06.2022</td><td>8.06.2024</td></tr>
<tr><td>Наименование СОП:</td><td colspan="3">Валидация биоаналитической методики и анализ данных</td></tr>
<tr><td colspan="4">Составление, утверждение и пересмотр СОП</td></tr>
<tr><td>Составлено/
пересмотрено:</td><td>_____
подпись</td><td>07.06.2021/
01.06.2022
дата</td><td>Л.А. Смирнова</td></tr>
<tr><td>Проверено:
Руководитель СОК</td><td>_____
подпись</td><td>03.06.2022
дата</td><td>В.Н. Перфилова</td></tr>
<tr><td>Утверждено:
Руководитель испытательного центра</td><td>_____
подпись</td><td>07.06.2022
дата</td><td>Л.И. Бугаева</td></tr>
<tr><td>Форма обучения:</td><td colspan="2">чтение ✓</td><td>практические занятия</td></tr>
</table>

1. НАЗНАЧЕНИЕ СОП

Цель данной стандартной операционной процедуры (СОП) – определить основные этапы валидации биоаналитической методики, проводимой методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, для подтверждения ее надежности при определении концентрации аналита в биологических матрицах (кровь, сыворотка, плазма, моча).

Предназначение. СОП предназначена всем сотрудникам ИЦ, проводящим валидацию методик и анализ данных.

2. НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

1) ГОСТ 31891-2012 ПРИНЦИПЫ НАДЛЕЖАЩЕЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКИ (GLP)

3. ОТВЕТСТВЕННОСТЬ

Сотрудники, которым предназначена СОП, должны следовать описанным в ней правилам валидации биоаналитических методик.

3.1. Сотрудник лаборатории (лаборант), несет ответственность за:

- приготовление аналитических растворов

3.2. Исследователь несет ответственность за:

-валидацию методики

-внесение записей в полном объеме, четко и разборчиво.

3.3. СОК, руководитель ИЦ, руководитель исследования несут ответственность за:

-контроль соблюдения правил соблюдения валидации

4. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

СОП применима в лаборатории токсикологии (аналитический отдел) при проведении валидации методик для эффективной работы сотрудников ИЦ.

5. ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Первичные данные исследования (raw data): Оригиналы записей и документов испытательного центра или их заверенные копии, отражающие результаты наблюдений и процедуры, проведенные во время исследования.

6. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

СОП - стандартная операционная процедура

GLP - Good Laboratory Practice

СОК – служба обеспечения качества

ВС-внутренний стандарт

ВЭЖХ – высокоэффективный жидкостный хроматограф

7. ПРИМЕНЯЕМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ/ИНСТРУМЕНТЫ/РЕАКТИВЫ:

7.1. ВЭЖХ хроматограф Shimadzu с флуоресцентным детектором (компьютеризированная система № 1), ВЭЖХ хроматограф Shimadzu с диодноматричным детектором (компьютеризированная система №2);

7.2. Колонка SUPELCOSIL LC-18 (5мкм; 150 мм х 4,6мм);

7.3. Ацетонитрил УФ 210;

7.4. Буферные системы;

7.5. Компьютер;

7.6. Приложения СОП.

8. ПРОЦЕДУРА ВЫПОЛНЕНИЯ

Основными характеристиками биоаналитической методики, необходимыми для подтверждения ее приемлемости и надежности аналитических результатов, являются селективность, нижний предел количественного определения, функция отклика и калибровочный диапазон, точность, прецизионность, влияние матрицы, стабильность аналитов в биологической матрице, стабильность аналитов и внутреннего стандарта

при хранении, в рабочих растворах и в экстрактах в течение всего периода хранения и обработки.

8.1.Приготовление стандартных образцов.

Для приготовления калибровочных стандартов, образцов для контроля качества и образцов стабильности с целью проведения валидации методики анализа исследуемых образцов к холостой биологической матрице, используя растворы стандартных образцов, добавляют исследуемые аналиты. В дополнение к этому при обработке образцов для хроматографических методов допускается добавлять соответствующий внутренний стандарт (ВС).

Для подтверждения чистоты и представления сведений об условиях хранения, сроке годности, номере серии стандартного образца необходим сертификат его анализа.

Если пригодность ВС подтверждена, например, отсутствием аналитического влияния как самой субстанции, так и ее примесей, в отношении ВС использование сертифицированных стандартов не требуется, в сертификатах анализа нет необходимости.

8.2. Специфичность/селективность (selectivity)

Специфичность – это способность методики безусловно определять действующее вещество в присутствии компонентов, которые могут содержаться в пробе. Для определения специфичности методики проводят анализ не менее 6 образцов чистой биологической жидкости. Параллельно проводят анализ чистой биологической жидкости, к которой предварительно прибавляют стандартный раствор определяемого вещества или веществ (и внутреннего стандарта, если это применимо) в таком количестве, чтобы его содержание в пробе находилось в предполагаемом диапазоне концентраций фармакокинетической кривой. Также анализируют стандартный раствор определяемого вещества и при необходимости – внутреннего стандарта. На всех хроматограммах образцов чистой биологической жидкости не должно наблюдаться пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания определяемого вещества и внутреннего стандарта, которое определяют по хроматограммам стандартного раствора.

8.3 Предел количественного определения (lower limit of quantification, upper limit of quantification)

Нижнему пределу количественного определения соответствует минимальная концентрация определяемого вещества в биологической жидкости, для которой величины относительного стандартного отклонения и относительной погрешности не превышают 20% на уровнях inter-day (within-run) и intra-day (between-run).

8.4. Линейность/калибровочная кривая (calibration curve)

Линейность – это способность методики (в пределах определенного диапазона) получать результаты, прямо пропорциональные концентрации (количеству) действующего вещества в пробе. Для определения линейности проводят анализ не менее 6 образцов (обычно 6-8) чистой биологической жидкости, к каждому из которых предварительно прибавляют стандартный раствор определяемого вещества (и внутреннего стандарта, если это применимо) в таком количестве, чтобы содержание определяемого вещества в полученных растворах соответствовало предполагаемому диапазону концентраций фармакокинетической кривой (калибровочные образцы), причем данный диапазон должен включать в себя предполагаемый ПКО. Кроме того, проводят анализ пробы чистой биологической жидкости, к которой не прибавляют ЛС (холостая проба), и чистой биологической жидкости с прибавлением внутреннего

стандарта (нулевая проба). При построении калибровочной кривой используют пригодные статистические методы (например, регрессионный анализ), причем нулевая точка в расчет не принимается. Для оценки приемлемости линейности в уравнение калибровочной кривой подставляют средние значения площадей пиков калибровочных образцов и рассчитывают отклонения полученных значений концентраций от фактических. Величина относительной погрешности рассчитанных концентраций от фактических для точки, соответствующей ПКО, не должна превышать 20%, для остальных точек – 15%. В случае, если несколько (в рамках вышеуказанных условий) калибровочных стандартов не соответствуют критерию приемлемости, то необходимо повторно рассчитать уравнение калибровочной кривой, при этом выпадающие результаты не учитывают.

В отчете необходимо описать параметры калибровочной кривой (для линейной регрессии: наклон и свободный член). В дополнение к этому, наряду с рассчитанными средними значениями точности необходимо представить экспериментально рассчитанные концентрации калибровочных стандартов. В отчете необходимо представить все имеющиеся или приемлемые кривые (но не менее трех), полученные в ходе валидации.

8.5. Прецизионность и правильность (precision and accuracy)

Прецизионность и правильность методики определения лекарственного вещества в биологической жидкости определяют на двух уровнях – в течение 1 рабочего дня (inter-day accuracy и inter-day precision) и в течение нескольких (не менее 2) рабочих дней (intra-day accuracy и intra-day precision). При использовании хроматографа с автосамплером допустимо проводить определение прецизионности и правильности в пределах одной хроматографической последовательности (within-run accuracy и within-run precision) и между хроматографическими последовательностями (between-run accuracy и between-run precision). Прецизионность и правильность методики определяют на одних и тех же пробах. Для этого проводят анализ не менее 4 образцов чистой биологической жидкости, к каждому из которых предварительно прибавляют стандартный раствор определяемого вещества и внутреннего стандарта в таком количестве, чтобы содержание определяемого вещества в полученных растворах находилась на уровне нижний порог клинического определения (НПКО), 3-кратного значения НПКО, верхней границе (75% от верхней точки линейного диапазона) и середине (50%) линейного диапазона.

Правильность и прецизионность внутри цикла определяют путем анализа внутри одного цикла не менее 5 образцов одной концентрации для не менее чем четырех различных концентраций и рассчитывают по калибровочной кривой концентрации определяемого вещества в биологической жидкости.

Для валидации правильности и прецизионности между циклами необходимо оценить НПКО, низкий, средний и высокий образцы для конечной концентрации (КК) из не менее чем трех проанализированных циклов, проведенных в течение не менее чем двух различных дней.

Прецизионность и правильность методики характеризуют величины относительного стандартного отклонения и относительной погрешности, соответственно. Данные значения не должны превышать 20% для точки, соответствующей ПКО, и 15% - для остальных точек на уровнях inter-day (within-run) и intra-day (between-run).

8.6. Линейность отклика

Степень разведения образцов не должна влиять на точность и прецизионность. По возможности, линейность отклика необходимо подтвердить путем добавления к матрице аналита в концентрации, выше ВПКО, и разведением полученного образца холостой матрицей (проводят не менее пяти определений на фактор разведения). Точность и прецизионность должны находиться в пределах установленных границ, т.е. ±15 %, линейность отклика должна перекрывать все разведения, используемые в отношении исследуемых образцов.

Линейность отклика можно оценить в рамках частичной валидации.

8.7. Стабильность(stability)

Определение стабильности проводят с целью подтверждения, что ни один из этапов анализа, включая хранение образцов, не влияет на концентрацию определяемого вещества в пробе. При полной валидации биоаналитической методики рекомендуется проводить следующие испытания на стабильность: - стабильность исходного и рабочих растворов стандартного вещества и внутреннего стандарта (stock solution stability);

- стабильность определяемого вещества в биологической жидкости после заморозки и разморозки (freeze and thaw stability). Данную характеристику определяют после, по крайней мере, 3 циклов заморозки и разморозки;

- длительная стабильность определяемого вещества в биологической жидкости при хранении в морозильнике (long term stability). Данную характеристику определяют в течение периода времени, соответствующего длительности одного исследования;

- кратковременная стабильность определяемого вещества в биологической жидкости и пробах (экстракте и т.д.) при комнатной температуре (short term stability). Данную характеристику определяют в течение 4 - 24 часов;

- стабильность приготовленных проб, в т.ч. при хранении в автосамплере (post-preparative stability). Данную характеристику определяют в течение периода, соответствующего времени хранения хроматографической последовательности в автосамплере.

Стабильность исходного и рабочих растворов стандартного вещества и внутреннего стандарта определяют после соответствующего разведения до концентрации, соответствующей диапазону линейности детектора. Для определения других видов стабильности проводят анализ не менее 3 проб (растворов) чистой биологической жидкости, к каждому из которых предварительно прибавляют стандартный раствор определяемого вещества (и внутреннего стандарта, если это применимо) на двух уровнях концентраций, соответствующих нижней (около 3 НПКО) и верхней части калибровочной кривой. Стабильность считается подтвержденной, если величина относительной погрешности рассчитанных значений концентраций от фактических не превышает 15 %.

8.8. Анализ исследуемых образцов

Анализ исследуемых образцов допустимо проводить только после проведения валидации используемой методики. В течение каждого рабочего дня (при проведении анализа на хроматографе без автосамплера) либо в одной хроматографической последовательности (при проведении анализа на хроматографе с автосамплером) необходимо дополнительно анализировать:

- пробу чистой биологической жидкости;

- пробу чистой биологической жидкости с прибавлением внутреннего стандарта, если это применимо;

- не менее 6 проб чистой биологической жидкости с прибавлением определяемого вещества в линейном диапазоне методики (калибровочные стандарты);

- по 2 пробы чистой биологической жидкости (контрольные пробы), к каждой из которых предварительно прибавляют стандартный раствор определяемого вещества и внутреннего стандарта, если это применимо, не менее чем на 3 уровнях концентраций (на нижней границе, верхней границе и середине линейного диапазона методики). Общее количество контрольных образцов, анализируемых в течение 1 рабочего дня (одной хроматографической последовательности), должно составлять не менее 5% от общего количества анализируемых проб.

Результаты анализа серии проб, проанализированных в течение 1 рабочего дня (одной хроматографической последовательности), считаются достоверными, если:

- величина относительной погрешности рассчитанных концентраций калибровочных стандартов от фактических для точки, соответствующей ПКО, не превышает 20%, для остальных точек – 15%. Данному критерию приемлемости должно соответствовать не менее 75% от общего количества калибровочных стандартов, но не менее 6. Если несколько (но не более 25%) калибровочных стандартов не соответствуют критерию приемлемости, то необходимо повторно рассчитать уравнение калибровочной кривой, при этом выпадающие результаты не учитывают. Если выпадающим результатом является проба, соответствующая ПКО, то за ПКО принимают следующую концентрацию калибровочного стандарта;

- величина относительной погрешности рассчитанных значений концентраций от фактических для не менее 4 из 6 контрольных проб и не менее 50% контрольных проб на каждом из уровней концентраций не превышают 15%.

Кроме того, величины относительной погрешности и относительного стандартного отклонения (RSD, %) между рабочими днями или хроматографическими последовательностями для всех контрольных образцов не должны превышать 15%. В случае несоответствия критерия приемлемости необходимо переделать все пробы, проанализированные в данный рабочий день (хроматографическую последовательность).

9. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evolution and Research (CDER). U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2001.

2. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2009.

3. Валиадция аналитических методик для производителей лекарств. Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств, подготовленное Федеральным Союзом Фармпроизводителей Германии (BAH). Пер. Аладышевой Ж.И. и Спицкого О.Р. Под ред. Береговых В.В. – М., Литерра, 2008. – 70 с.

4. ГОСТ 31891-2012 ПРИНЦИПЫ НАДЛЕЖАЩЕЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКИ (GLP).

Лист регистрации изменений СОП № Х/П-001-2022/4 версия 4 от 01.06.2021 г.

№ изм.	№ страницы	№ пункта	Внесенные изменения
1	1	Титульный лист	Изменена кодировка СОП

Руководитель лаборатории:

«____»_____ _____ г. _____ /_____/

дата подпись расшифровка