<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>СОП №:</td><td>Номер версии:</td><td colspan="2">Число страниц:</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Х/П-015-2022/3</td><td>3</td><td colspan="2">6</td></tr>
<tr><td>Дата начала действия СОП:</td><td colspan="2">Дата окончания действия СОП:</td></tr>
<tr><td></td><td>08.06.2022</td><td colspan="2">08.06.2022</td></tr>
<tr><td>Наименование СОП:</td><td colspan="3">Валидация методики качественного и количественного определения соединения нейроглутам</td></tr>
<tr><td colspan="4">Составление, утверждение и пересмотр СОП</td></tr>
<tr><td>Составлено/
Пересмотрено:</td><td>_____
подпись</td><td>28.07.2020/
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>08.06.2022
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. Цель

Цель данной стандартной операционной процедуры (СОП) – определить основные этапы валидации методики качественного и количественного определения соединения нейроглутам (глутарон), проводимой методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, для подтверждения ее надежности при определении концен **Предназначение:** СОП предназначена сотрудникам аналитической службы, осуществляющим количественное определение

2. Нормативные ссылки

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

3. Ответственность

Сотрудники, которым предназначена СОП, должны следовать установленным в ней правилам аналитической методики.

4. Область применения

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

5. Термины и определения:

Не применимы

6. Список сокращений

СОП - стандартная операционная процедура
GLP - Good Laboratory Practice
СОК – служба обеспечения качества

7. Применяемое оборудование/инструменты/реактивы:

7.1. КС №1
7.2. Весы
7.3. Дозаторы
7.4. Ацетонитрил
7.5. Этанол
7.6. Однозамещенный калий фосфат
7.7. Центрифуга

8. ВЫПОЛНЕНИЕ СОП:

Биоаналитической методикой называется методика количественного определения лекарственных веществ (ЛВ) и (или) их метаболитов в биологических объектах (цельной крови, плазме, сыворотке, моче и др.) человека и животных [1,2].

Проведение валидации методики

Содержание нейроглутама определяют методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Shimadzu (Япония) с флуоресцентным детектором RF-10Axl, колонка SUPELCOSIL LC-18 (5мкм; 150 мм х 4,6мм).

Для приготовления мобильной фазы используют ацетонитрил (УФ210) (Россия) и буферную систему, состоящую из однозамещенного фосфата калия 50 mМоль, pH 4,65 (Россия) в соотношении 88:12.

Субстанцию глутарона фиксируют при длине волны экстинции 210 нм и длине волны эмиссии 285 нм. Чувствительность метода составляет 1 г/мл. Идентификацию исследуемого вещества и расчет концентрации проводят по методу абсолютных стандартов. Время удерживания для глутарона составляет 7-8 мин.

Метод экстракции глутарона из биологического материала

Извлечение глутарона, а также одновременное осаждение белков из биологических проб производят из плазмы, сыворотки и цельной крови, а также из 20% водных гомогенатов органов и тканей крыс. В качестве экстрагента используют концентрированную соляную кислоту в соотношении с плазмой 1:0,2.

Образцы встряхивают в течение десяти минут в ультразвуковой ванне для преципитации белков и центрифугируют в течение 15 минут при 3000 об/мин на центрифуге Eppendorf, после чего надосадочную жидкость отбирают и вводят в инжектор с объемом петли 20мкл. Степень извлечения для исследуемого вещества составляет 90%.

Расчет аналитических параметров метода ВЭЖХ, используемого для определения нейроглутама в биологических пробах

Для количественного определения вещества используют метод абсолютной калибровки. Зависимость площадей пиков от концентрации нейроглутама анализируют методом регрессионного анализа в диапазоне концентраций от 0,1 до 10 мкг/мл. Калибровочные кривые носят линейный характер, с коэффициентом регрессии (R^2) равным 0,99 (рис. 1). Определяют внутридневные процентные колебания (повторяемость метода), которые не должны превышать 20% в изучаемых диапазонах

концентраций. Междневные процентные колебания (воспроизводимость метода) для изучаемого соединения не должны превышать в основном 10% (Табл. 1).

Определение стабильности нейроглутама при замораживании

При повторном проведении анализа, после 72 часов хранения водных растворов соединения при комнатной температуре, средние абсолютные процентные колебания должны находиться в тех же пределах, показывая стабильность изучаемого вещества. При изучении влияния процессов замораживания и таяния, средние абсолютные процентные колебания для нейроглутама должны находиться в тех же пределах, что определяет стабильность вещества под влиянием данных факторов. Чувствительность метода для изучаемого соединения составляет 1мкг/мл. Средняя ошибка измерения не превышает 10%.

9. Список использованной литературы

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

10. Приложения

Приложение 1
Таблица 1

Показатели воспроизводимости и повторяемости метода количественного определения глутарона с использованием ВЭЖХ в диапазоне линейной зависимости площади хроматографического пика от концентрации растворов (M±m)

Концентрация, мкг/мл	Внутридневные колебания концентрации, мкг/мл			Повторяемость, ±Δ%			Воспроизводимость (ср. ошибка измерения), %
	День 1	День 2	День 3	День 1	День 2	День 3	
0,5	0,69±0,07	0,79±0,15	0,24±0,04	38	58	-52	49,33
1	0,99±0,13	0,99±0,09	0,83±0,11	-1	-1	-17	6,33
10	8,25±1,37	8,12±1,27	7,36±1,03	-17,5	-18,8	-26,4	20,9
50	51,96±7,04	51,99±6,75	53,91±2,8	3,92	3,98	7,82	5,24
200	199,59±17,06	202,53±21,43	199,15±20,84	-0,21	1,27	-0,43	0,64

Приложение 2.

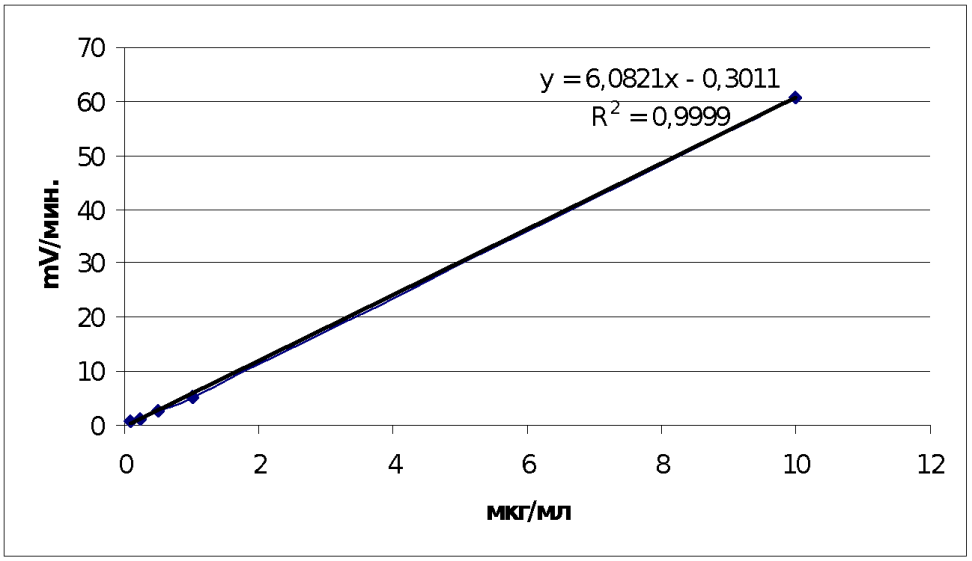

Рис. 1. Зависимость площади под хроматографическим пиком от концентрации глутарона

Обозначения: по оси абсцисс – площадь под хроматографическим пиком, mAU*мин.; по оси ординат – концентрация глутарона мкг/мл .

Лист регистрации изменений СОП Х/П-015-2022/3 от 01.06.2022

№ изм.	№ страницы	№ пункта	Внесенные изменения
1	1	Титульный лист	Изменена кодировка СОП
2	1	2	Добавлено: 2. Нормативные ссылки 1) ГОСТ 31891-2012 ПРИНЦИПЫ НАДЛЕЖАЩЕЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКИ (GLP)
3.	2	3-4	Добавлено: 3. Ответственность Сотрудники, которым предназначена СОП, должны следовать установленным в ней правилам аналитической методики. 4. Область применения СОП применима в лаборатории токсикологии (аналитический отдел) при проведении аналитических исследований для эффективной работы сотрудников ИЦ. 5. Термины и определения: Не применимы 6. Список сокращений СОП - стандартная операционная процедура GLP - Good Laboratory Practice СОК – служба обеспечения качества 7. Применяемое оборудование/инструменты/реактивы: 7.1. КС №1 7.2. Весы 7.3. Дозаторы 7.4. Ацетонитрил 7.5. Этанол 7.6. Однозамещенный калий фосфат 7.7. Центрифуга

Руководитель лаборатории:

«____»_____ _____ г. _____ /_____/

дата подпись расшифровка