	ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ИННОВАЦИОННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ С ОПЫТНО-ПРОМЫШЛЕННЫМ ПРОИЗВОДСТВОМ ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР		
СОП №:	Номер версии:	Число страниц:	
III/3П-1-025-2022/3	3	7	
	Дата начала действия версии СОП:	Дата окончания действия версии СОП:	
	29.06.2022	29.06.2024	
Наименование СОП:	**Определение каталитической концентрации щелочной фосфатазы в сыворотке крови методом константного времени**		
Составлено/ Пересмотрено	_____ подпись	30.06.2020 / 16.06.2022 дата	А.С. Таран
Проверено: Руководитель СОК	_____ подпись	21.06.2022 дата	В.Н. Перфилова
Утверждено: Руководитель лаборатории	_____ подпись	28.06.2022 дата	Л.И. Бугаева
Форма обучения:	чтение ✓	практические занятия	

1. НАЗНАЧЕНИЕ

ЦЕЛЬ: Цель данной стандартной операционной процедуры (СОП) – описать метод определения концентрации щелочной фосфатазы в крови/плазме при исследовании токсичности новых химических соединений.

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ:

СОП предназначена всем сотрудникам, проводящим *in vitro* изучение биохимических показателей биологических жидкостей.

Сотрудники, работающие с данным методом, должны проводить измерения согласно СОП, вести соответствующую документацию и поддерживать чистоту оборудования.

2. НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

1) Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» (Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 20 ноября 2014 г. № 1700-ст межгосударственный

стандарт ГОСТ 33044—2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 августа 2015 г. Настоящий стандарт идентичен международному документу OECD Guide 1:1998 OECD Principles of good laboratory practice). – М.: Стандартинформ, 2015. – 16 с.

2) Национальный стандарт РФ ГОСТ 31883-2012 «Принципы надлежащей лабораторной практики. Обеспечение качества в соответствии с Принципами GLP» (Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27 декабря 2012 г. N 2151-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 31883—2012 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2013 г. Настоящий стандарт идентичен международному документу OECD series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring - No 4 - Consensus document - Quality assurance and GLP: 1999* (Консенсусный документ по GLP. Обеспечение качества и надлежащая лабораторная практика:1999, N 4 из серии документов Организации экономического сотрудничества и развития (ОЭСР) о принципах GLP и мониторинге соответствия).

3. ОТВЕТСТВЕННОСТЬ

За выполнение данной процедуры должен отвечать квалифицированный сотрудник лаборатории, имеющий подготовку, специальные знания и опыт на уровне, необходимом для реализации своих обязанностей, знакомый с процедурами испытаний, стандартами и системами, используемыми в самом испытательном центре или при проведении работ в интересах испытательного центра

4.ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящая СОП предназначена для использования персоналом испытательного центра.

5. ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Принципы надлежащей лабораторной практики (Good Laboratory Practice (GLP): Система обеспечения качества, имеющая отношение к процессам организации, планирования, порядку проведения и контролю испытаний в области охраны здоровья человека и безопасности окружающей среды, а также оформления, архивирования и представления результатов этих испытаний.

Стандартные операционные процедуры; СОП (standard operating procedures; SOPs): Подробные письменные инструкции, содержащие описание процессов проведения испытаний или другой деятельности, как правило, не представленных детально в планах исследования или руководствах по проведению испытаний, и предназначенные для достижения единообразия при осуществлении определенной деятельности.

6. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

GLP - Good Laboratory Practice (надлежащая лабораторная практика);
СОП–стандартная операционная процедура;
СОК – служба обеспечения качества

7.ПРИМЕНЯЕМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ / ИНСТРУМЕНТЫ

1. Субстрат (4-нитрофенилфосфат 0,92 ммоль/флакон)
2. Буфер (N-метил-D-глюкаминовый буфер 42,6 ммоль/флакон)
3. Стандартный раствор (4-нитрофенол 2,4 ммоль/л)
4. Хлорид натрия
5. Гидроксид натрия
6. Двунатриевая соль этилентриаминтетрауксусной кислоты дигидрата (Комплексон III)
7. Вода дистиллированная
8. Стаканы лабораторные
9. Пробирки центрифужные 10 мл
10. Дозатор поршневой
11. Спектрофотометр СФ-56 APEL PD-303UV (Япония)
12. Кюветы фотометрические объёмом 2 мл
13. Наконечники к дозатору одноразовые
14. Средства индивидуальной защиты (шапка, маска, перчатки, халат).

8. ПРОЦЕДУРА ВЫПОЛНЕНИЯ

8.1 Принцип метода:
Щелочная фосфатаза (щелочная фосфогидролаза моноэстеров ортофосфорной кислоты) расщепляет в N-метил-D-глюкаминовом буфере 4-нитрофенилфосфат с образованием 4-нитрофенола и фосфата. ЩФ активирована хлоридом натрия. Мерой каталитической концентрации фермента является количество освобожденного 4-нитрофенола, который определяют фотометрически методом постоянного времени после остановки ферментативной реакции ингибитором ЩФ, который блокирует активный центр фермента.

8.2 Подготовка реагентов к процедуре анализа.
Приготовление растворов
Раствор 1:
Содержимое флакона с реактивом 1 растворить в 10 мл. дист.воды. Раствор устойчив 1 мес. при -20℃ в темноте; 5 дней при 2-8℃ в темноте; 5 ч. при 15-25℃ в темноте.
Раствор 2:
Содержимое флакона с реактивом 2 растворить в 100 мл. дист.воды. Раствор устойчив 1 мес при 2-8℃; 2 недели при 15-25℃.
Раствор ингибитора:
Растворяют 40 г NaOH и 11 г двунатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты дигидрата (Комплексон III) в дист. воде и объем доводят до 1000 мл. При температуре 2 -25°С раствор устойчив.
Процедура анализа
Определение проводят по схеме, приведенной в таблице:

Компоненты реакционной среды	Проба	Контроль
Раствор 2		
Сыворотка крови		

Перемешать, проинкубировать 5 минут при 37℃		
Раствор 1		
Инкубировать точно 10 минут при 37 ℃.		
Раствор ингибитора		
Сыворотка крови		
Перемешать и до 30 минут измерить оптическую плотность пробы (D1) и контрольного раствора (D2) против воды и вычислить разность оптических плотностей D1-D2=ΔD **λ = 405-430 нм.**		

8.3 Обработка результатов

Каталитическую концентрацию ЩФ в пробе рассчитывают по формуле:

$$(\text{при } \lambda = 405\text{нм}) \qquad 7,899 \times \Delta D = \text{ЩФ мккат/л}$$

$$(\text{при } \lambda = 410\text{нм}) \qquad 8,373 \times \Delta D = \text{ЩФ мккат/л}$$

$$(\text{при } \lambda = 420\text{нм}) \qquad 10,263 \times \Delta D = \text{ЩФ мккат/л}$$

$$(\text{при } \lambda = 430\text{нм}) \qquad 14,546 \times \Delta D = \text{ЩФ мккат/л}$$

Пересчет единиц:
1 кат/л = 1 моль/л*с
1 мккат/л = 60 Е/л

Обработку результатов выполнять в программе Microsoft Excel (Microsoft, США) или GraphPad Prism 6 (GraphPad Inc., USA) с расчетом базовых статистических показателей: среднего арифметического *M*, стандартной ошибки среднего арифметического *m*. Статистическая обработка с применением парного *t*-критерия Стьюдента в программе Statistika 10.0 (StatSoft, США).

8.4 Требования к исследуемым образцам и реагентам.

Липимичная или гемолизированная сыворотка и плазма крови для анализа непригодна.

9. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1.Национальный стандарт РФ ГОСТ 31883-2012 «Принципы надлежащей лабораторной практики. Обеспечение качества в соответствии с Принципами GLP» введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2013 г.

2. Chromý, V., Kulhánek, V., Fischer, J.: Clin. Chem. 24, 279 (1978)

3. Chromý, V., Zahradníček, L., Vozníček, J.: Clin. Chem. 27, 1729 (1981)

4. Ceriotti, G.: Giorn. Chim. Clin. 9, 167 (1984)

5. Chromý, V., Zahradníček, L., Vozníček, J.: Biochem. Clin. Bo he mos lov. 18, 57 (1989)

6.Schmidt, E.: Fresenius J. Anal. Chem. 337, 145 (1990)

10. ПРИЛОЖЕНИЕ

Протокол регистрации первичных данных при определении каталитической концентрации щелочной фосфатазы

Код исследования: _____
Дата выполнения эксперимента: _____
Группа _____Изучаемое вещество_____ Доза_____
Вид животных _____ Линия_____ Пол животных_____
Путь введения _____

№ животного	Оптическая плотность, D1	Оптическая плотность, D2	Примечание

Исполнитель:
_____/_____
(подпись) *(расшифровка подписи – Ф.И.О.)*
Руководитель
исследования:_____/_____
(подпись) *(расшифровка подписи – Ф.И.О.)*

Лист регистрации изменений СОП № III/3П-1-025-2022/3 от 16.06.2022

№ изм.	№ страницы	№ пункта	Внесенные изменения
1	1	Титульный лист	В номер СОП добавлен номер версии СОП……/3 В заглавной части титульного листа удалено: «Дата утверждения» и строка «Составление, утверждение и пересмотр СОП». В заглавной части титульного листа «Дата начала действия» заменено на «Дата начала действия версии СОП»; «Дата пересмотра» заменено на «Дата окончания действия версии СОП»; «Составлено» заменено на «Составлено/пересмотрено»; «Утверждено: Руководитель лаборатории» заменено на «Утверждено: Руководитель испытательного центра»
2	1	1	Удалено «И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ»
3	1	1	Удалено СОП описывает метод определения каталитической концентрации щелочной фосфатазы в сыворотке крови у экспериментальных животных (крыс, кроликов…) при проведении доклинических токсикологических исследований.
4	1	1	Добавлено в Цель Цель данной стандартной операционной процедуры (СОП) – описать метод определения концентрации щелочной фосфатазы в крови/плазме при исследовании токсичности новых химических соединений.
5	1-2	2	Добавлено 1) Национальный стандарт РФ ГОСТ 31883-2012 «Принципы надлежащей лабораторной практики. Обеспечение качества в соответствии с Принципами GLP» Удалено 1) Приказ Минздрава России от 01.04.2016 N 199н "Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики". 2) Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. Миронова А.Н. Часть первая. — М.: Гриф и К, 2012. — 944 с. 3) Европейская Конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей CETS 123 (Страсбург, 1986). 4) Директива 2010/63/eu Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 г по охране животных, используемых в научных целях.

6	2	3	Удалено «ЗА ВЫПОЛНЕНИЕ РАБОТ ПО ПРОЦЕДУРЕ» За выполнение данной процедуры должен отвечать квалифицированный сотрудник лаборатории, знающий правила и имеющий опыт её выполнения. Добавлено За выполнение данной процедуры должен отвечать квалифицированный сотрудник лаборатории, имеющий подготовку, специальные знания и опыт на уровне, необходимом для реализации своих обязанностей, знакомый с процедурами испытаний, стандартами и системами, используемыми в самом испытательном центре или при проведении работ в интересах испытательного центра.
7	2	4	Добавлено ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ Настоящая СОП предназначена для использования персоналом испытательного центра.
8	2	5	Добавлено «ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ» Принципы надлежащей лабораторной практики (Good Laboratory Practice (GLP): Стандартные операционные процедуры; СОП (standard operating procedures; SOPs):
9	2-3	6	Добавлено СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ GLP - Good Laboratory Practice (надлежащая лабораторная практика); СОП–стандартная операционная процедура; СОК – служба обеспечения качества
10	3	7	Нумеровано 7. ПРИМЕНЯЕМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ / ИНСТРУМЕНТЫ
11	3-4	8	Нумеровано 8. «ПРОЦЕДУРА ВЫПОЛНЕНИЯ» Добавлено 8.1 Принцип метода
12	4	9	Добавлено :1.Национальный стандарт РФ ГОСТ 31883-2012 «Принципы надлежащей лабораторной практики. Обеспечение качества в соответствии с Принципами GLP»
13	5	10	Нумеровано ПРИЛОЖЕНИЕ
14	Каждая страница	колонтитул	Удалено: Начало действия В код СОП добавлен номер версии

Руководитель лаборатории:

«____»_____ _____ г. _____ /_____/

дата подпись расшифровка