	ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ ТОКСИКОЛОГИИ (ОТДЕЛ АНАЛИТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ) НАУЧНОГО ЦЕНТРА ИННОВАЦИОННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ С ОПЫТНО-ПРОМЫШЛЕННЫМ ПРОИЗВОДСТВОМ		
СОП №:	Номер версии:	Число страниц:	
Х/П-003-2022/4	4	10	
	Дата начала действия версии СОП:	Дата окончания действия версии СОП:	
	08.04.2022	08.04.2024	
Наименование СОП:	**Подбор хроматографических условий и анализ данных**		
Составление, утверждение и пересмотр СОП			
Составлено/ пересмотрено:	_____ подпись	17.05.2021/ 01.04.2022 дата	Л.А. Смирнова
Проверено: Руководитель СОК	_____ подпись	04.04.2022 дата	В.Н. Перфилова
Утверждено: Руководитель испытательного центра	_____ подпись	07.04.2022 дата	Л.И. Бугаева
Форма обучения:	чтение ✓	практические занятия ✓	

1.Назначение СОП

Цель данной стандартной операционной процедуры (СОП) – описать основные этапы подбора параметров биоаналитической методики и анализа данных методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Предназначение: СОП предназначена всем сотрудникам, проводящим анализ данных и подбор параметров биоаналитической методики количественного определения.

2. Нормативные ссылки

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

3. Ответственность

Сотрудники, которым предназначена СОП, должны следовать описанным в ней правилам подбора параметров биоаналитической методики и анализа данных.

3.1. Сотрудники лаборатории, назначенные на работу, несут ответственность за:

- приготовление растворов,
- подготовку компьютеризированных систем к работе,
- приготовление растворов стандартов,
- получение результатов хроматографического анализа и их обработку
- ведение первичной документации

3.2. Исследователь несет ответственность за:

- соблюдение основных этапов подбора параметров биоаналитической методики
-внесение записей в полном объеме, четко и разборчиво.

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

- проверку журнала приготовления растворов.
- контроль проведения анализа.

4. Область применения:

СОП применима в лаборатории токсикологии (аналитический отдел) при проведении подбора хроматографических условий для эффективной работы сотрудников ИЦ.

5. Термины и определения

Стандартный объект (образец) (reference item): Объект (образец), используемый для сравнения с испытуемым объектом, имеющий официально (юридически) удостоверенный состав.

6. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

СОП - стандартная операционная процедура

GLP - Good Laboratory Practice

СОК – служба обеспечения качества

7. Применяемое оборудование/инструменты/реактивы:

7.1. ВЭЖХ хроматограф Shimadzu с диодноматричным детектором (компьютеризированная система №2) и с флуориметрическим детектором (компьютеризированная система № 1)

7.2 колонка SUPELCOSIL LC-18

7.3. Ацетонитрл УФ 210

7.4. Буферная система

7.5. Компьютер.

7.6 Приложения СОП.

8.ПРОЦЕДУРА ВЫПОЛНЕНИЯ:

8.1. Разработка новой биоаналитической методики количественного определения, с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии начинается с подбора условий хроматографического разделения.

8.2. Подбор хроматографических условий

На первом этапе изучается растворимость аналита в различных растворителях, проводится подбор внутреннего стандарта (если необходимо), обладающего сходными с аналитом химическими и фармакокинетическими свойствами. Проводится спектральный анализ аналита на соответствующем оборудовании.

Для подбора типа колонки оцениваются химические свойства аналита. Для неполярных веществ обычно используется обращеннофазная колонка С18, для полярных веществ возможно использование колонок с различными модификаторами фаз, превращающих обращеннофазную колонку в псевдоионнообменную. Подбирается длина колонки и зернение частиц сорбента.

На основании анализа спектра и физико-химических свойств аналита подбирается детектор для хроматографического анализа. Возможно использование ультрафиолетового детектора, спектрофлуориметрического детектора, масс-спектрометра и т.д.

Далее проводится подбор подвижной фазы с использованием различных буферных растворов и органических элюентов (ацетонитрила, метанола и др.).

На данном этапе исследуются основные параметры подвижной фазы, влияющие на селективность разделения (pH буфера, количества органического элюента в подвижной фазе, температура колонки и др.). Для полярных веществ обычно используют различные добавки в подвижную фазу (модификаторы), улучшающие время удерживания аналита, селективность разделения, форму пика и другие параметры.

Если необходима многостадийная пробоподготовка, проводится подбор условий, например, твердофазной экстракции или экстракции методом жидкость-жидкость. Если возможно проведение пробоподготовки в одну стадию, определяется подходящий

экстрагент (ацетонитрил. метанол и др.) для экстракции веществ из биологических проб (кровь, сыворотка, плазма, моча, гомогенаты органов).

Разработанная аналитическая методика проходит полную валидацию и оформляется по следующим пунктам в соответствующий СОП.

Количественное определение. Метод ВЭЖХ

Реактивы Указывают название реактива, квалификацию, фирму - производитель, каталожный номер).

Стандартный образец. Указывают название вещества, квалификацию, фирму-производитель (при необходимости).

Буферный раствор. Указывают количества ингредиентов в г., объем растворителя (мл), pH. раствора. Описание приготовления буферного раствора приводят при необходимости, срок годности раствора

Испытуемый раствор. Подробно описывают приготовление испытуемого раствора с указанием срока годности раствора и условий его хранения.

Раствор стандартного образца. Подробно описывают приготовление раствора стандартного образца с указанием срока годности раствора и условий его хранения.

Хроматографические условия

Указывают вид колонки (обращено-фазная, нормально-фазная) с указанием типа сорбента, зернения частиц, длины и внутреннего диаметра колонки. Допускается использование альтернативной колонки, удовлетворяющей требованиям пригодности хроматографической системы

Указывают вид подвижной фазы с названием реактивов и их соотношением в %, скорость потока (мл/мин), температуру колонки (Cº), для УФ-детектора указывают длину волны, объем вводимой пробы (мкл)

8.3. 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 [2]:

- 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 [4.2]:

- 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: L

10. Приложение

Приложение 1

Испытательный Центр (Лаборатория токсикологии)

Аналитический отдел

Минздрава России (НЦИЛС ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России)

СОГЛАСОВАНО
Руководитель СОК
_____В.Н.Перфилова

«___»_____20___г.

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель ИЦ
_____Л.И Бугаева

«___»_____20___г

Журнал регистрации приготовления растворов

Место хранения: 400087, г. г. Волгоград, ул. Новороссийская, д. 39, Помещение № 612.

Начало	
Окончание	

Список сотрудников, допущенных к заполнению журнала приготовления растворов

№ п/п	Должность	Ф.И.О.	Подпись
1.			
2.			
3.			
4.			
5.			
6.			
7.			
8.			

Регистрация приготовления растворов

Дата	Наименование раствора, концентрация и приготовление	Подпись	Примечание

10. Приложение 2

Отдел аналитических исследований

Лаборатория фармацевтических аналитических исследований

ВолгГМУ

Протокол №_____ регистрации первичных данных от _____20___ года

Код исследования _____

(наименование исследуемого вещества и биологического объекта)

КОД АНАЛИЗИРУЕМОГО ОБРАЗЦА		
Исследователь		
ПРИМЕЧАНИЯ		
Замена расходных материалов		

№ пробы	Название пробы	Время начала пика, мин.	Время конца пика, мин.	Высота пика, mAU	Примечания

Лист регистрации изменений СОП № Х/П-003-2022/4 версия 4 от 1.04.2022 г.

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

Руководитель лаборатории:

«____»_____ _____ г. _____ /_____/

дата подпись расшифровка