



ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России
197374, Санкт-Петербург, ул. Оптиков, д. 54
www.arcerm.spb.ru

ОТЧЕТ О ВАЛИДАЦИИ АНАЛИТИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ

«Количественное определение концентрации эверолимуса в цельной крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием»

№ документа:

№ EVE-10/15

Дата составления отчёта:

09.10.2015

Исполнитель работ:

Заведующий НИЛ токсикологии и лекарственного мониторинга НИО биоиндикации
ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России, д.м.н.
Старший научный сотрудник НИЛ токсикологии и лекарственного мониторинга НИО биоиндикации
ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России, к.б.н.
Химик-эксперт НИЛ токсикологии и лекарственного мониторинга НИО биоиндикации
ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России

Утверждаю:

Заведующий НИО биоиндикации, д.м.н., профессор
ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России, д.м.н.

 — Родионов Г.Г.

 — Ушал И.Э.

 — Колобова Е.А.

 Шантырь И.И.



Количественное определение концентрации эверолимуса в цельной крови человека методом высокоскоростной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

Содержание	
РЕЗЮМЕ.....	3
ВВЕДЕНИЕ	4
1. Метод измерения	4
2. Требования к средствам измерений, реактивам и материалам.....	5
2.1. Оборудование.....	5
2.2. Реактивы и материалы	5
2.3. Биологическая матрица.....	6
2.4. Средства измерения и вспомогательная посуда.....	6
2.5. Требования безопасности.....	7
2.6. Требования к условиям выполнения измерений.....	7
3. Подготовка к выполнению измерений	8
3.1. Приготовление растворов	8
3.1.1. Приготовление стандартного раствора эверолимуса (1 мг/мл).....	8
3.1.2. Приготовление стандартного раствора ВС - эверолимуса-d4 (1 мг/мл).....	8
3.1.3. Приготовление рабочих растворов эверолимуса.....	8
3.1.4. Приготовление рабочего раствора ВС.....	8
3.1.5. Приготовление градуировочных растворов эверолимуса	9
3.2. Подготовка хроматографа и масс-спектрометра к выполнению измерений.....	9
3.2.1. Градуировка хроматографа	11
3.3. Подготовка проб к измерениям	13
3.4. Корректирующие действия	14
4. Валидация метода.....	14
4.1. Тест «Пригодность хроматографической системы»	14
4.2. Линейность метода.....	15
4.3. Пределы количественного обнаружения	15
4.4. Контроль селективности метода.....	17
4.5. Точность и достоверность метода.....	19
4.6. Контроль правильности результатов измерений	20
4.7. Контроль стабильности аналитов.....	22
5. Критерии приемлемости	23
6. Список основных СОПов.....	24
7. Отклонения от СОПов.....	24
8. Нормативные ссылки	24
9. Используемое программное обеспечение	25
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	26
Приложение 1	27
СЕРТИФИКАТ АНАЛИЗА СУБСТАНЦИИ ЭВЕРОЛИМУС	27
Приложение 2. ПРИМЕР ТАБЛИЦЫ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА И ХРОМАТОГРАММ КАЛИБРОВОЧНЫХ ОБРАЗЦОВ	29
Приложение 3. ХРОМАТОГРАММЫ ХОЛОСТЫХ ПРОБ	32



*Количественное определение эверолимуса в цельной крови человека
методом высокoeffективной жидкостной хроматографии с масс-
спектрометрическим детектированием*

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

MRM	Multiple Reaction Monitoring
RT	Время удерживания
Cal	Калибровочный образец
SD	Стандартное отклонение
RSD	Коэффициент вариации
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
ВЭЖХ – МС	Высокоэффективная жидкостная хроматография - масс-спектрометрия
BC	Внутренний стандарт
LLOQ	Нижний предел количественного определения
HLOQ	Верхний предел количественного определения
СОП	Стандартная операционная процедура

РЕЗЮМЕ

ПАРАМЕТР	ЗНАЧЕНИЕ
Анализируемое вещество	эверолимус
Биологическая матрица/коагулянт	цельная кровь человека
Объем образца, требуемый для анализа	100 мкл
Аналитический метод	ВЭЖХ-МС/МС
Тип калибровочной зависимости	Линейная зависимость
Диапазон калибровочной кривой	1÷20 нг/мл
Метод определения концентрации	Метод внутреннего стандарта
Предел обнаружения	0.3 нг/мл
Нижний предел количественного определения	1 нг/мл
Прецизионность и правильность	Прецизионность (RSD%): в течение 24 часов
	1 нг/мл-9.2
	2 нг/мл-8.1
	7.5 нг/мл-3.7
	20 нг/мл-2.1
	Правильность (% от теоретического):
	1 нг/мл-83.4÷108.2%
	2 нг/мл-86.6÷106.8%
	7.5 нг/мл-96.9÷106.6%
	20 нг/мл-96.2÷100.9%
Стабильность после пробоподготовки в автосэмплере при +18°C	В течение 24 часов.
Стабильность после заморозки и последующей разморозки	Стабилен



Количественное определение эверолимуса в цельной крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

ВВЕДЕНИЕ

Валидация методики определения концентрации эверолимуса в цельной крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) включала следующие параметры:

- линейность метода;
- установление пределов количественного определения;
- точность и достоверность результатов;
- селективность;
- стабильность аналитов.

1. МЕТОД ИЗМЕРЕНИЯ

Измерение массовой концентрации эверолимуса в пробах плазмы крови проводилось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии/тандемной масс-спектрометрии.

Идентификацию эверолимуса осуществляли по временам удерживания и характеристическим ионам, регистрируемым в режиме мониторинга выбранных реакций (MRM), установленным при предварительной градуировке прибора.

Количественное определение проводили методом внутреннего стандарта.



Количественное определение эверолимуса в цельной крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

2. ТРЕБОВАНИЯ К СРЕДСТВАМ ИЗМЕРЕНИЙ, РЕАКТИВАМ И МАТЕРИАЛАМ

2.1. Оборудование.

Высокоэффективный жидкостный хроматограф «LC 1260 Infinity» (Agilent, США) с масс-спектрометрическим детектором «TripleQuard 6460» с системой ионизации «Agilen Jet Stream-электроспрей» (AJS ESI).

Весы «Sartorius» (Германия) с измерением массы до 250 г. С точностью 0,0001-0,00001 г. или аналогичные.

Центрифуга «Allegra 25R» (BECKMAN COULTER, США) или аналогичная.

pH-метр с автоматической термокомпенсацией, SevenEasy pH S20-k⁺ (pH-метр с универсальным комбинированным электродом InLab 413, микроэлектродом InLab 423 с кабелем и раствором для чистки электродов, набором стандарт-титров)

Шкаф лабораторный в комплекте «Koettermann» (Германия) 1800x900x2250.

Допускается применение других типов средств измерений, с метрологическими и техническими характеристиками не хуже указанных в п.2.1.

2.2. Реактивы и материалы

Эверолимус – фармсубстанция (fluka – 07741-10 mg-F) (предоставлена Заказчиком, сертификат анализа фармсубстанции см. Приложение 1).

Эверолимус-d4 (Santa Cruz Biotechnology – sc-218453 – 1 mg) - фармсубстанция (предоставлена Заказчиком).



Количественное определение эверолимуса в цельной крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

Формиат аммония (fluka for HPLC ≥ 99.0 %).

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Метанол «Baker HPLC analyzed» HPLC Far UV/ Gradient Grade или аналогичный.

Кислота муравьиная фирмы Agilent, номер по каталогу G 2453-85060.

Допускается применение реактивов, изготовленных по другой нормативно-технической документации, с квалификацией чистоты не ниже указанной в п. 2.2.

2.3. Биологическая матрица

Матрицей для приготовления калибровочных стандартов и образцов контроля качества служила цельная кровь человека, полученная от здоровых добровольцев (интактная).

2.4. Средства измерения и вспомогательная посуда

Колбы мерные вместимостью 10 и 100 мл, 1 класса точности, с погрешностью $\pm 0,025$ мл и $\pm 0,1$ мл соответственно по ГОСТ 1770.

Автоматические дозаторы фирмы Biohit с дозируемым объемом от 0,5 до 5000 мкл.

Полипропиленовые флаконы (виалы) для анализируемых и градуировочных растворов вместимостью 250 мкл с защелкивающимися крышками фирмы Agilent или аналогичные.

Фильтры Iso-Disk PTFE-13-4 фирмы Supelco, номер по каталогу 54132-U.