<table>
<tr><td></td><td colspan="4">ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России<br><br>ЛАБОРАТОРИЯ ТОКСИКОЛОГИИ<br>(ОТДЕЛ АНАЛИТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ)<br><br>НАУЧНОГО ЦЕНТРА<br>ИННОВАЦИОННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ<br>С ОПЫТНО-ПРОМЫШЛЕННЫМ ПРОИЗВОДСТВОМ</td></tr>
<tr><td colspan="2">СОП №:</td><td>Номер версии:</td><td colspan="2">Число страниц:</td></tr>
<tr><td colspan="2" rowspan="3">Х/П-018-2022/2</td><td>2</td><td colspan="2">5</td></tr>
<tr><td>Дата начала действия:</td><td colspan="2">Дата пересмотра:</td></tr>
<tr><td>20.04.2022</td><td colspan="2">20.04.2024</td></tr>
<tr><td>Наименование СОП:</td><td colspan="4">Валидация методики качественного и количественного определения соединения мефебут</td></tr>
<tr><td colspan="5">Составление, утверждение и пересмотр СОП</td></tr>
<tr><td>Составлено/<br>Пересмотрено:</td><td>_____<br>подпись</td><td>15.04.2021/<br>15.04.2022<br>дата</td><td colspan="2">Л.А. Смирнова</td></tr>
<tr><td>Проверено:<br>Руководитель СОК</td><td>_____<br>подпись</td><td>19.04.2022<br>дата</td><td colspan="2">В.Н. Перфилова</td></tr>
<tr><td>Утверждено:<br>Руководитель испытательного центра</td><td>_____<br>подпись</td><td>20.04.2022<br>дата</td><td colspan="2">Л.И. Бугаева</td></tr>
<tr><td colspan="2">Форма обучения:</td><td>чтение ✓</td><td colspan="2">практические занятия ✓</td></tr>
</table>

## 1. НАЗНАЧЕНИЕ СОП

1.1. Цель данной стандартной операционной процедуры (СОП) – определить основные этапы валидации методики качественного и количественного определения соединения мефебут, проводимой методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

1.2. Предназначение СОП:

СОП предназначена всем сотрудникам, ответственным за проведение качественного и количественного анализа мефебута.

## 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 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 условий валидации.

## 4. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

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

## 5. ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

**Валидация аналитической методики –** это экспериментальное доказательство того, что методика пригодна для решения предполагаемых задач.

**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

## 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.

## 8. ПРОЦЕДУРА ВЫПОЛНЕНИЯ

В исследовании использовали жидкостной хроматограф (Shimadzu, Япония). Определение соединений мефебут осуществлялось при помощи флуоресцентного детектора при длине волны экстинкции 201 нм и длине волны эмиссии 280 нм. Хроматографическое разделение осуществлялось на колонке SUPELCOSIL LC-18 (5мкм; 150 мм х 4,6мм). Мобильная фаза включала в себя ацетонитрил и буферную систему из 50 мМ р-ра однозамещенного калия фосфата (pH 2,5) с добавлением 0,12% гептансульфоновой кислоты. Соотношение ацетонитрил: буфер 12%:88% v/v.

Зависимость площадей пиков от концентрации соединения анализировалась методом регрессионного анализа. Статистическая обработка результатов проводилась при помощи компьютерной программы Microsoft Excel.

Используя разработанный метод количественного извлечения соединений мефебут из биологического материала и подобранные ранее хроматографические условия, были получены хроматограммы изучаемых веществ в стандартном водном растворе и биологическом материале. Время удерживания изучаемого соединения составило 8 минут (рис. 1).

Для проведения калибровка взяли пять точек - концентрации 100 нг/мл, 200 нг/мл, 350 нг/мл, 500 нг/мл и 1000 нг/мл. Для каждой точки провели пять параллельных измерений. В результате было установлено, что калибровочные кривые носят линейный характер, с коэффициентом аппроксимации ($R^2$) равным 0,998 (рис. 2).

По полученным результатам измерений были рассчитаны точность и прецизионность, которые составили в среднем 97,78% и 8,32% соответственно.

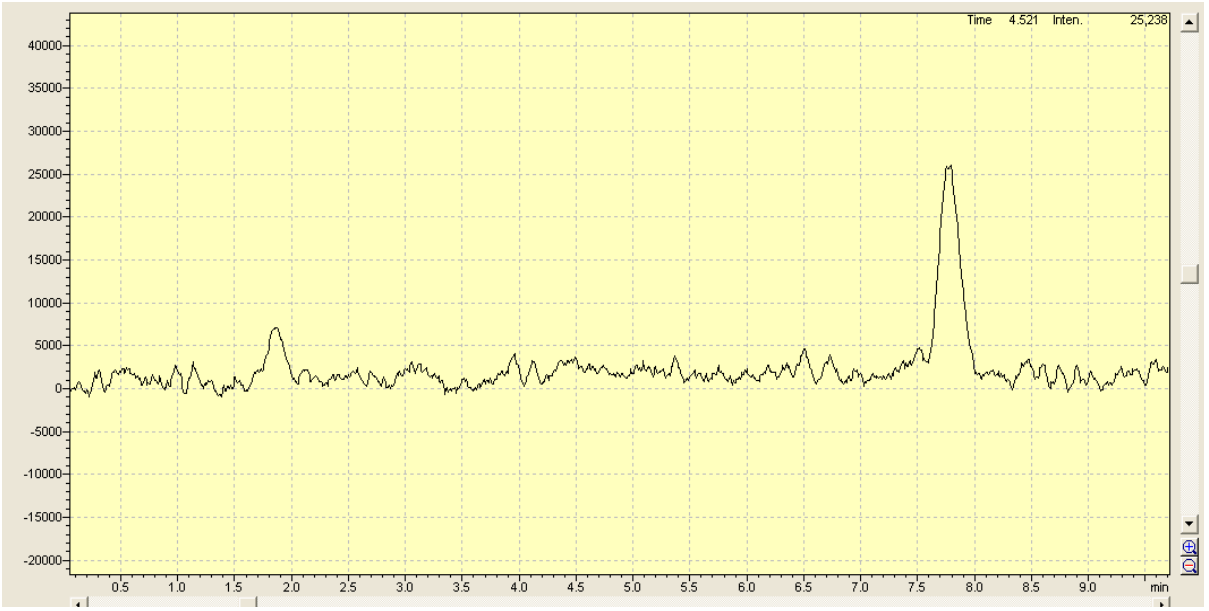



Рис. 1. Хроматограмма соединения мефебут в стандартном растворе

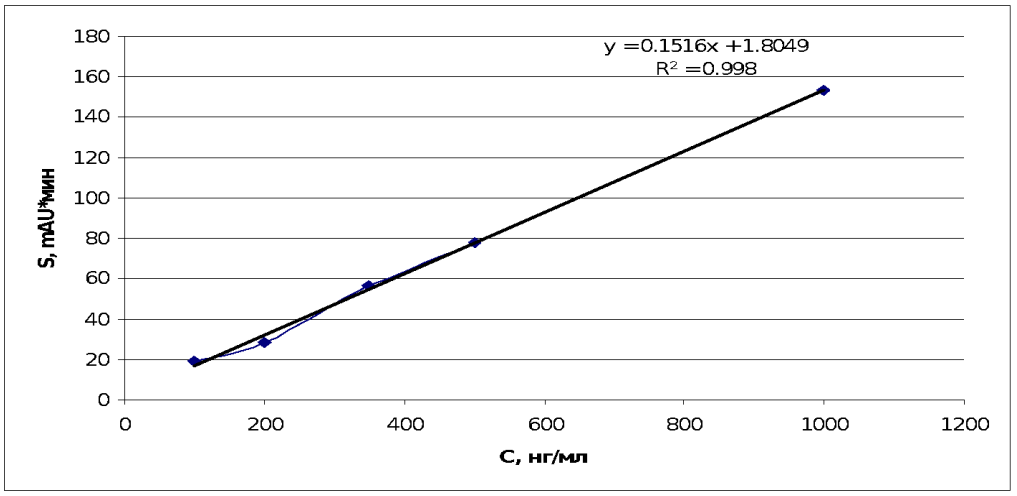



Рис. 2. Зависимость площади под хроматографическим пиком от концентрации вещества мефебут.

Были определены внутридневные процентные колебания, которые не превышали 14% в изучаемых диапазонах концентраций. Междневные процентные колебания для изучаемого соединения не превышали в среднем 7%.

Предел количественного определения составил 100 нг/мл. Предел обнаружения – 40 нг/мл.

При повторном проведении анализа, после 72 часов хранения водных растворов соединения при комнатной температуре, средние абсолютные процентные колебания находились в тех же пределах, показывая стабильность изучаемого вещества.

При изучении влияния процессов замораживания и таяния, было обнаружено, что средние абсолютные процентные колебания для изучаемого вещества находились в тех же пределах, что определяет стабильность веществ под влиянием данных факторов.

Таким образом, в результате проведенной валидации подтверждено соответствие аналитических характеристик метода ВЭЖХ количественного определения соединения мефебут нормативным значениям. Сводные аналитические характеристики метода представлены в таблице 1.

**Таблица 1.**

Основные аналитические параметры метода ВЭЖХ количественного определения соединения мефебут.

| | |
|---|---|
| Точность | 97,78% |
| Прецизионность | 8,32% |
| Внутридневные колебания | 14% |
| Междневные колебания | 7% |
| Предел количественного определения | 100 нг/мл |
| Предел обнаружения | 40 нг/мл |

## 9. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ


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


## 10.ПРИЛОЖЕНИЯ

**Лист регистрации изменений СОП № Х/П-018-2022/2 версия 2 от 15.04.2022 г.**

| № изм. | № страницы | № пункта | Внесенные изменения |
|---|---|---|---|
| 1 | 1 | Титульный лист | В код СОП внесен номер версии |
| 2 | Каждая страница | Колонтитул | В код СОП внесен номер версии |

**Руководитель лаборатории:**

«____»_____ _____ г. _____ /_____/

дата подпись расшифровка