

На правах рукописи

Колесникова Оксана Николаевна

**ОПТИМИЗАЦИЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ФЕНОЛА И
ТИОМЕРСАЛА В ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ
ПРЕПАРАТАХ**

1.5.6 - Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва - 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Кандидат биологических наук

Устинникова Ольга Борисовна

Официальные оппоненты:

Шмаров Максим Михайлович - доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория молекулярной биотехнологии, руководитель лаборатории

Красильников Игорь Викторович - доктор биологических наук, Акционерное Общество «Развитие биотехнологий», директор по науке

Ведущая организация:

Федеральное Государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности» Министерства сельского хозяйства Российской Федерации (Московская область, г. о. Лосино-Петровский)

Защита диссертации состоится «__» _____ 2024 года в ___ часов на заседании Диссертационного совета 64.1.004.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им.Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им.Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10, <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан: «__» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Борисова Ольга Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Иммунобиологические лекарственные препараты (ИЛП) - особая группа лекарственных препаратов, предназначенных для формирования активного или пассивного иммунитета, а также диагностики иммунологического ответа на аллергизирующие вещества. К иммунобиологическим лекарственным препаратам относят вакцины, анатоксины, токсины, сыворотки, иммуноглобулины и аллергены (ФЗ №61, 2010, п. 7 в ред. ФЗ от 22.12.2014 №429 –ФЗ).

Особенности производства иммунобиологических лекарственных препаратов, а также их компонентный состав и формы выпуска часто приводят к необходимости использования консервантов (European Medicines Agency, 2009; Stetler, H.C., 1985).

Международные и отечественные руководящие организации, такие как Всемирная организация здравоохранения, Food and Drug Administration и другие, и нормативные документы нормируют содержание консервантов в диапазоне концентраций, обеспечивающих эффективность и безопасность их применения (ГФ РФ XIV, 2018; European Pharmacopoeia 11.0, 2023; Food and Drug Administration, 2018).

Основными консервантами, входящими в состав зарегистрированных в Российской Федерации иммунобиологических лекарственных препаратов, являются тиомерсал, фенол и в случае некоторых зарубежных препаратов - 2-феноксиэтанол (ГФ РФ XIV, 2018; European Pharmacopoeia, 2023).

Методики оценки содержания консервантов появлялись одновременно с разработкой и внедрением в практику здравоохранения соответствующих иммунобиологических лекарственных препаратов. Фармакопейными методиками являются спектрофотометрическая методика: «Количественное определение фенола в биологических лекарственных препаратах» (ГФ РФ ОФС 1.7.2.0028.18, 2018), колориметрическая методика: «Фенол в иммунных сыворотках и вакцинах» (European Pharmacopoeia 01/2008:20515, 2023), колориметрическая методика в реакции с дитизоном: «Количественное определение тиомерсала в биологических лекарственных препаратах» (ГФ РФ ОФС 1.7.2.0025.18, 2018).

В то же время, международные стандарты системы менеджмента качества (СМК) предъявляют высокие требования к методикам лабораторного контроля качества, а именно, селективности, точности и воспроизводимости результатов (ГОСТ Р ИСО 5725 – 2002, 2002, Волкова Р.А., 2009). Наиболее доступными и востребованными являются методики, основанные на методах газожидкостной и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ГЖХ и ВЭЖХ), и атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС).

При введении вновь разработанных и модифицированных методик в работу аккредитованных лабораторий, целесообразно применение стандартных образцов (СО) в качестве инструмента обеспечения внутрилабораторного контроля качества (ВКК) согласно международным требованиям (World Health Organization, 2011; Бондарев В.П., 2013; Волкова Р.А., 2013; ГФ РФ ОФС 1.1.0007.18, 2018; ГОСТ Р ИСО 17025 – 2019, 2021).

Таким образом, оптимизация количественной оценки консервантов в иммунобиологических лекарственных препаратах, заключающаяся в разработке, валидации и стандартизации новых методик, является актуальным направлением научно-исследовательской работы.

Степень разработанности темы исследования

Методика определения тиомерсала в колориметрической реакции с дитизоном, а затем методика атомно-абсорбционной спектроскопии с электротермической атомизацией для прибора Квант-Зета, разработаны группой авторов ФГУН Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А.Тарасевича Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Минздравсоцразвития России (ФС 42-3874-99 Физико-химические, химические, физические и иммунохимические методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов/ Волкова Р.А., Гавриленкова В.Ю., Каргина Т.М., Конду Э.И., Эльберт Е.В., Рунова В.Ф., Блоха В.В., Черняховская И.В., 1999).

Традиционной методикой определения фенола в иммунобиологических лекарственных препаратах является спектрофотометрическая методика, разработанная группой авторов ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича Минздравсоцразвития России (Волкова Р.А., Каргина Т.М., Гавриленкова В.Ю., Рунова В.Ф. Способ определения фенола в аллергенах (SU, патент 989410, 1983) и изложенный в Государственной фармакопее РФ (ОФС 1.7.2.0028.18 «Количественное определение фенола в биологических лекарственных препаратах»), также колориметрическая методика, изложенная в Европейской фармакопее (монография 2.5.15. «Фенол в иммунных сыворотках и вакцинах») и, как правило, используемый зарубежными производителями.

В то же время, в других отраслях промышленности, медицины и экологического контроля для определения фенола, в том числе и в биологических образцах, применяют метод газожидкостной хроматографии (Патент РФ 2176926; Патент РФ 2188416; Патент РФ 2200958 и др.).

Исследование возможности использования метода газожидкостной хроматографии для определения фенола в иммунобиологических лекарственных препаратах проводилось в ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича Минздравсоцразвития России на аппарате Fisons 8000 (Великобритания) (Рунова О.Б., Волкова Р.А., 2000).

Необходимость разработки методик обусловлена появлением новых моделей оборудования и технологий в области атомно-абсорбционной спектроскопии и газожидкостной хроматографии.

Цель исследования – разработка и стандартизация методик количественной оценки фенола и тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах.

Задачи исследования:

1. Провести анализ существующих методических подходов к оценке содержания фенола и тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах.
2. Разработать на основе метода атомно-абсорбционной спектроскопии (ртути холодного пара) валидированные методические условия оценки качества иммунобиологических лекарственных препаратов по показателю "Тиомерсал".
3. Разработать на основе методов газожидкостной хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии валидированные методические условия оценки качества иммунобиологических лекарственных препаратов по показателю "Фенол".
4. Оценить результаты определения фенола и тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах в разработанных валидированных методических условиях

путем сопоставления с результатами, полученными при применении фармакопейных методик.

5. Разработать фармакопейные стандартные образцы контроля стабильности использования валидированных методических условий оценки качества иммунобиологических лекарственных препаратов по показателям "Фенол" и "Тиомерсал".

Научная новизна

Впервые разработана методика, позволяющая применить метод газожидкостной хроматографии для контроля иммунобиологических лекарственных препаратов по показателю «Фенол». Подобрана хроматографическая колонка, с неподвижной фазой полиэтиленгликоль, размерами 30 метров × 0,320 мкм, толщиной пленки неподвижной фазы 0,25 микрон. Разработаны оригинальные условия хроматографирования, позволяющие исследовать все группы иммунобиологических лекарственных препаратов, без предварительной пробоподготовки и разведения образцов. Определена аналитическая область методики в диапазоне концентраций фенола от 1,0 до 5,0 мг/мл. Выбран внутренний стандарт - 2-феноксиэтанол (Патент на изобретение Российской Федерации №2693518).

Разработана методика для количественного определения фенола в иммунобиологических лекарственных препаратах на основе метода высокоэффективной жидкостной хроматографии. Выбрана колонка с фазой C18 с размерами 150 мм × 4,6 мкм, зернением 5 мкм, условия хроматографирования: способ детектирования - спектрофотометрический при 270 нм, состав подвижной фазы - ацетонитрил: 0,5% раствор уксусной кислоты (1:4), скорость потока 1,0 мл/мин, степень разведения образца 1:25, объем инъекции 20 мкл. Определена аналитическая область методики в диапазоне концентраций фенола от 0,05 до 0,15 мг/мл, калибровочная характеристика строится путем изменения объема инъекции стандартного раствора фенола.

Разработана методика, позволяющая применить метод атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара ртути, для контроля иммунобиологических лекарственных препаратов по показателю «Тиомерсал». Определена аналитическая область методики в диапазоне концентрации ионов ртути от 10 мкг/л до 40 мкг/л. Разработаны условия пробоподготовки испытуемых образцов, позволяющие проводить контроль качества всех групп препаратов.

Разработанные методики валидированы и соответствуют требованиям Государственной Фармакопеи Российской Федерации и International Council for Harmonisation к аналитическим методикам. Изучено возможное влияние систематической ошибки на полученные результаты, показано отсутствие статистической значимости систематической ошибки для каждой из разработанных методик.

Установлена сопоставимость результатов, полученных фармакопейной спектрофотометрической методикой и разработанной методикой на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии: значение критерия Фишера при анализе полученных результатов составило 0,93, при критическом табличном значении 3,96. Установлено наличие статистически значимых различий результатов, полученных фармакопейной спектрофотометрической методикой и разработанной методикой на основе газожидкостной хроматографии, обусловленных более высокой прецизионностью методики на основе газожидкостной хроматографии, при сопоставимых средних

арифметических значениях двух выборок: значение критерия Фишера при анализе полученных результатов составило 23,01, при критическом табличном значении 3,96.

Впервые на основе экспериментальных данных и статистического анализа сопоставимости результатов разработаны и аттестованы фармакопейные стандартные образцы: ФСО 3.1.00449 содержания фенола (для спектрофотометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии) и ФСО 3.1.00451 содержания фенола (для газожидкостной хроматографии), позволяющие контролировать стабильность определения фенола при проведении испытаний иммунобиологических лекарственных препаратов с применением методик, основанных на спектрометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии и газожидкостной хроматографии.

Впервые на основе экспериментальных данных оценена сопоставимость результатов определения тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах, полученных вновь разработанной методикой в сравнении с фармакопейной: значение критерия Фишера при анализе полученных результатов составило 1,29 (при критическом табличном значении 3,96).

Впервые на основе экспериментальных данных и статистического анализа сопоставимости результатов показана возможность использования стандартного образца ФСО 3.1.00427 содержания тиомерсала в сорбированных иммунобиологических лекарственных препаратах, аттестованного фармакопейной колориметрической методикой для контроля стабильности определения тиомерсала при проведении испытаний иммунобиологических лекарственных препаратов с применением методики на основе атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара.

Теоретическая и практическая значимость работы

Экспериментально обоснована возможность применения методов газожидкостной и высокоэффективной жидкостной хроматографии для контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов по показателю «Фенол». Разработанные методики позволяют проводить испытания без предварительной пробоподготовки, в присутствии высокомолекулярных примесей (белков и полисахаридов) и других компонентов препаратов.

Экспериментально доказана возможность применения методики на основе метода атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара ртути, для контроля качества несорбированных и сорбированных иммунобиологических лекарственных препаратов по показателю «Тиомерсал».

Разработанная методика определения фенола в иммунобиологических лекарственных препаратах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии внесена в ОФС 1.7.2.0028.18 «Количественное определение фенола в биологических лекарственных препаратах» ГФ РФ (XIV, том 2).

Разработанная методика определения тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах методом атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара внесена в ОФС 1.7.2.0025.15 «Количественное определение тиомерсала в биологических лекарственных препаратах» ГФ РФ (XIV, том 2).

Внедрение данных методик в практику лабораторного контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов, позволяет повысить специфичность и точность определения содержания консервантов, за счет применения высокотехнологичных методов и частичной автоматизации процесса.

Разработанные фармакопейные стандартные образцы рекомендованы фармацевтическим предприятиям для контроля стабильности проведения испытаний количественного определения фенола и тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах.

Методики определения фенола на основе газожидкостной хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии, а также тиомерсала на основе атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара рекомендованы предприятиям-производителям иммунобиологических лекарственных препаратов, а также организациям и специалистам, проводящим экспертизу и оценку соответствия качества.

Разработанная методика количественного определения фенола в иммунобиологических лекарственных препаратах на основе метода газожидкостной хроматографии внедрена в практическую деятельность фармацевтической компании ООО «Гритвак» (акт внедрения от 01.11.2021). Разработанная методика количественного определения тиомерсала на основе метода атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара внедрена в практическую деятельность ФГУП Санкт-Петербургского научно-исследовательского института ФМБА России (акт внедрения от 13.03.2017).

Методология и методы исследования

Предметом исследования являются препараты вакцин и аллергенов, содержащих в составе консерванты тиомерсал, фенол. Исследования проводились в соответствии с поставленными задачами: разработка и валидация методик ГЖХ и ВЭЖХ для количественного определения фенола в ИЛП; разработка и валидация методики ААС ХП для определения тиомерсала в ИЛП; анализ сопоставимости результатов, полученных с применением фармакопейных и разработанных методик; разработка ФСО для контроля стабильности количественного определения фенола и тиомерсала в ИЛП. В исследование использовали общепризнанные современные физико-химические методы, для обработки полученных результатов использовали общепризнанные методы статистического анализа.

Разработка и валидация методик проводилась в соответствии с рекомендациями ОФС.1.1.0012.15 и ОФС.1.1.0013.15 ГФ РФ. Сопоставимость результатов фармакопейных и разработанных методик оценивали на репрезентативных выборках с помощью однофакторного дисперсионного анализа. ФСО аттестованы в соответствии с требованиями руководящих отечественных и международных документов.

Материалы исследования

Препараты вакцин и аллергенов, содержащих в составе фенол в качестве консерванта. Вакцины пневмококковые: «Пневмо 23», производства «Санофи Пастер», Франция; «Пневмовакс 23», производство MSD, Польша; вакцина брюшнотифозная «Вианвак», производства «Гритвак»; «Шигеллвак», производства «Гритвак»; туберкулезный аллерген «Диаскинтест», производство «Генериум», Россия; неинфекционные аллергены, производства «Микроген», Россия и «Севафарма» а.о., Чешская республика.

Препараты вакцин, содержащих тиомерсал в качестве консерванта. АКДС-вакцина, производства АО «НПО «Микроген», Россия; АС-анатоксин, АО «НПО «Микроген»; АДС-М-анатоксин, АО «НПО «Микроген»; Анатоксин стафилококковый, ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН (филиал «Медгамал»); АД-анатоксин, АО «НПО «Микроген»; АД-М-анатоксин, АО «НПО «Микроген»; Бубо-Кок (вакцина для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша и гепатита В), ЗАО МПК «Комбиотех»; АКДС-гепВ -

бесконсервантная форма производство АО «НПО «Микроген»; АКДС бесконсервантная форма, АО «НПО «Микроген»; Тетраанатоксин, АО «НПО «Микроген»; АКДС-гепВ, АО «НПО «Микроген»; «Совигрипп», АО «НПО «Микроген»; «Ультрикс», ФГУП СПбНИИВС ФМБА России, «Гриппол», АО «НПО «Микроген»; «Гриппол», ФГУП СПбНИИВС ФМБА России.

Кандидат в ФСО содержания фенола — разводящая жидкость для неинфекционных аллергенов АО «НПО «Микроген», Россия.

Фармакопейный стандартный образец ФСО 3.1.00427 «Содержания мертиолята в сорбированных препаратах».

Модельные смеси препаратов с известным добавленным количеством аналита.

Методы исследования

Определение фенола в иммунобиологических лекарственных препаратах методом газожидкостной хроматографии. Исследования проводили в соответствии с разработанной в рамках настоящей работы методикой.

Определение фенола в иммунобиологических лекарственных препаратах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Исследования проводили в соответствии с разработанной в рамках настоящей работы методикой.

Определение тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах методом атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара ртути. Исследования проводили в соответствии с разработанной в рамках настоящей работы методикой.

Спектрофотометрический метод определения фенола в иммунобиологических лекарственных препаратах (ГФ РФ ОФС.1.7.2.0028.18, 2018).

Колориметрический метод определения фенола в сыворотках и вакцинах (European Pharmacopoeia, 01/2008:20515, 2023).

Колориметрическая методика определения тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах в реакции с дитизоном (ГФ РФ ОФС.1.7.2.0025.18, 2018).

Статистические методы. Вычисление среднего арифметического значения, стандартного отклонения, дисперсии, коэффициента вариации, коэффициента детерминации, дисперсионный анализ (критерии Стьюдента, Фишера), доверительные интервалы отклонений для коэффициентов регрессионной кривой, степень извлечения.

Личное участие автора в получении результатов

Автором проведен аналитический обзор литературных источников, по выбранной теме. Разработан дизайн научного исследования и этапы работы, сформулированы цель и задачи, выбраны предмет и объекты исследования, составлен план разработки и валидации аналитических методик. Самостоятельно выполнена экспериментальная часть по всем разделам диссертации, разработаны и валидированы методики определения консервантов в иммунобиологических лекарственных препаратах: фенола на основе хроматографических методов анализа и тиомерсала на основе атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара свободной ртути. Разработаны и аттестованы фармакопейные стандартные образцы содержания фенола. Автором самостоятельно выполнен сбор и статистический анализ полученных результатов и формулировка выводов при написании диссертационной работы.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Разработанные методики количественной оценки фенола методом газожидкостной и высокоэффективной жидкостной хроматографии позволяют проводить контроль

качества иммунобиологических лекарственных препаратов по показателю "Фенол" на высоком технологическом уровне.

2. Разработанные фармакопейные стандартные образцы содержания фенола (ФСО 3.1.00449 и ФСО 3.1.00451) позволяют проводить контроль стабильности определения фенола с целью обеспечения внутрилабораторного контроля качества.

3. Разработанная методика количественной оценки тиомерсала методом атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара позволяет проводить контроль качества иммунобиологических лекарственных препаратов по показателю "Тиомерсал" на высоком технологическом уровне.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов обеспечивается статистической обработкой большого объема экспериментальных данных, материалами по валидации и результатами сравнительных исследований. Исследования проводили в аккредитованной лаборатории на прошедшем квалификации и метрологическую поверку оборудовании. Для сравнительной оценки результатов испытаний применялись фармакопейные методы.

Результаты диссертационной работы получены при выполнении государственных заданий ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России на осуществление прикладных научных исследований и разработок в период с 2015 г. по настоящее время при выполнении следующих научно-исследовательских работ: Научное обоснование методов оценки качества, эффективности и безопасности иммунобиологических лекарственных препаратов и их стандартизация, регистрационный № 01201275293 (акт внедрения результатов НИР от 28.12.2017); Совершенствование системы разработки и применения стандартных образцов, предназначенных для оценки качества, эффективности и безопасности лекарственных средств, регистрационный № 115111740007 (акт внедрения результатов НИР от 28.12.2017); Научное обоснование перспективных направлений совершенствования иммунобиологических лекарственных препаратов, предназначенных для иммунопрофилактики инфекционных болезней, регистрационный № АААА-А18-118021590046-9 (акт внедрения результатов НИР от 13.12.2019); Разработка перспективных направлений совершенствования экспертизы качества, эффективности и безопасности биологических лекарственных препаратов и стандартизация методов их оценки № госрегистрации НИОКТР 121022000147-4 (ГЗ НИР 2021-2023).

Апробация работы состоялась на заседании Ученого совета Федерального государственного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 7 от 28.11.2023).

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на: третьей научно-практической конференции молодых ученых «Приоритетные направления развития экспертной деятельности в области обращения лекарственных средств» (Москва, 2014) и Всероссийской научно-практической конференции с международным участием: «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы» (Москва, 2019).

Публикации по теме диссертации

Основные результаты изложены в 8 научных публикациях, из них 3 - в рецензируемых научных изданиях, 2 – в других изданиях, 2 - в материалах конференций, 1 - патент на изобретение Российской Федерации.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 185 страницах, состоит из введения, обзора литературы, 2 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка используемой литературы, приложения. Диссертация содержит 56 таблиц, иллюстрирована 30 рисунками. В список литературы включены 50 отечественных и 186 зарубежных источников.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка и стандартизация методик количественного определения фенола

На начальном этапе разработки методики ГЖХ была экспериментально подобрана хроматографическая колонка с неподвижной фазой — полиэтиленгликоль, размерами 30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм, показавшая наиболее высокоэффективное разделение раствора, содержащего смесь фенола, бензилового спирта и 2-феноксиэтанола.

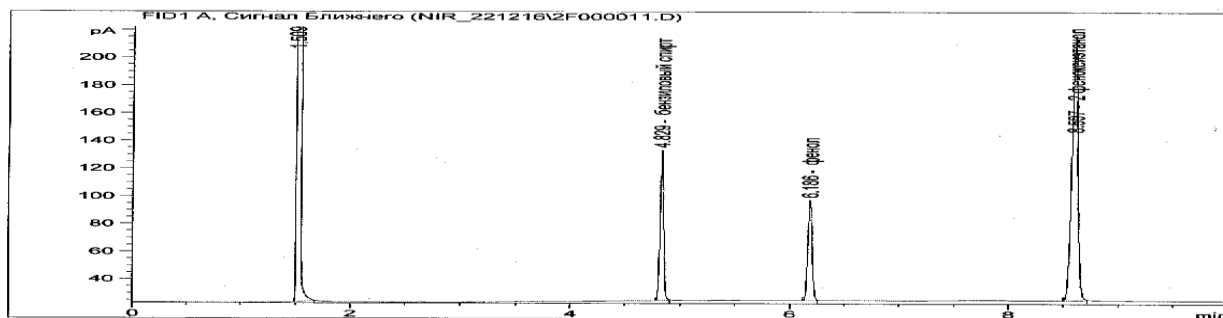


Рисунок 1 - Типичная хроматограмма, полученная на колонке DB-WAX

Для колонки DB-WAX были подобраны хроматографические условия, обеспечивающие максимальную эффективность хроматографической системы (фактор симметрии пиков, число теоретических тарелок, разрешение пиков) для смеси фенола и компонентов (Рисунок 1): объем пробы 0,5 мкл, температура инжектора 250⁰С, деление потока 1:40, скорость газа-носителя в колонке 1,4 мл/мин, режим термостата колонки: начальная температура - 160⁰С (3 мин), градиент 40⁰С/мин до температуры 200⁰С (0,6 мин), градиент 40⁰С/мин до температуры 220⁰С, температура детектора 250⁰С.

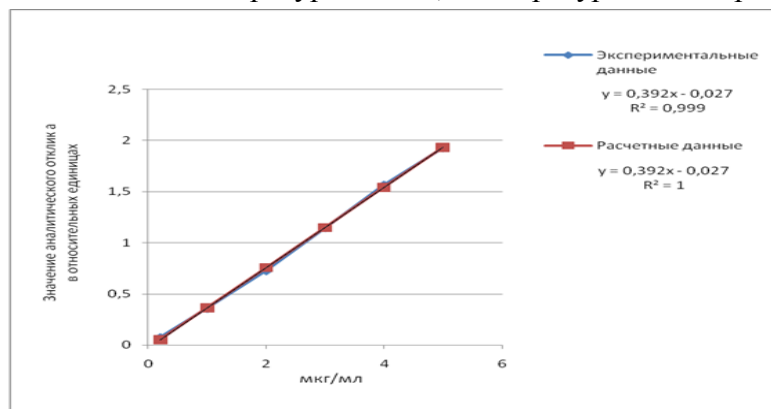


Рисунок 2 – Оценка линейности методики

Линейность методики исследована в диапазоне актуальных концентраций фенола от 0,2 мг/мл до 5,0 мг/мл, включающем возможный диапазон содержания фенола в ИЛП, ограниченный нормативными требованиями: от 1,5 до 4,0 мг/мл. В состав стандартных растворов был добавлен внутренний стандарт - 2-феноксиэтанол, выбранный на основании показателей эффективности разделения и расчета относительных стандартных отклонений (RSD) времен удерживания (Рисунок 2).

Регрессионная зависимость визуально линейна; коэффициент детерминации более 0,9990; RSD значений для каждой точки менее 3,0%; отклонения расчетных значений от экспериментальных не превысили критическое значение t-критерия Стьюдента (2,776 при доверительной вероятности 0,95 и f=4) (Рисунок 2, Таблицы 1-2).

Таблица 1 - Оценка RSD значений относительных площадей пика фенола, полученных для каждой концентрации стандартных растворов

Концентрация стандартного раствора, мг/мл	Средние арифметические площадей пиков для каждой из концентрации стандартных растворов (n=3)			Статистические показатели трех независимых испытаний		
	Испытание 1	Испытание 2	Испытание 3	\bar{X}_{cp} площади пика	S_{cp} площадей пиков	RSD, %
0,2	0,073	0,075	0,072	0,073	0,002	2,615
1,0	0,357	0,359	0,359	0,358	0,001	0,410
2,0	0,725	0,726	0,729	0,727	0,002	0,319
3,0	1,147	1,149	1,141	1,146	0,004	0,367
4,0	1,566	1,561	1,553	1,560	0,007	0,422
5,0	1,929	1,929	1,910	1,923	0,011	0,574

Таблица 2 - Оценка отклонений расчетных значений относительных площадей пиков от экспериментальных значений для каждой из концентраций регрессионной зависимости

Концентрации фенола в стандартных растворах, мг/мл, x_i	Экспериментальные значения относительной площади пика, y_i	Расчетные значения относительной площади пика, Y_i	Отклонение расчетных значений от экспериментальных, t
0,2	0,073	0,051	0,779
1,0	0,357	0,365	0,290
2,0	0,725	0,757	1,265
3,0	1,147	1,149	0,091
4,0	1,566	1,542	0,922
5,0	1,929	1,934	0,170

Аналитическую область методики установили на основании анализа линейности в пределах концентраций от 1,0 мг/мл до 5,0 мг/мл.

Специфичность методики подтверждается отсутствием пиков с временами удерживания фенола и 2-феноксэтанола на хроматограммах холостого раствора, соответствием относительного времени удерживания пиков на хроматограммах испытуемого раствора относительному времени удерживания на хроматограммах стандартного раствора, отсутствием посторонних сигналов в области времен удерживания фенола и 2-феноксэтанола (Рисунки 3-5).

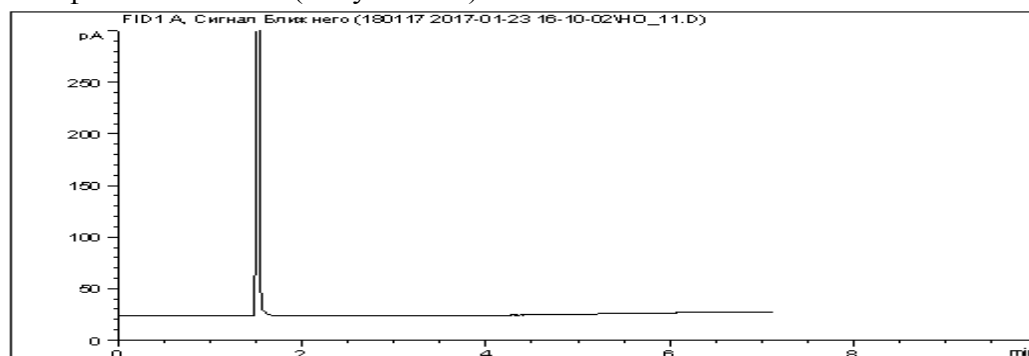


Рисунок 3 - Типичная хроматограмма холостого раствора

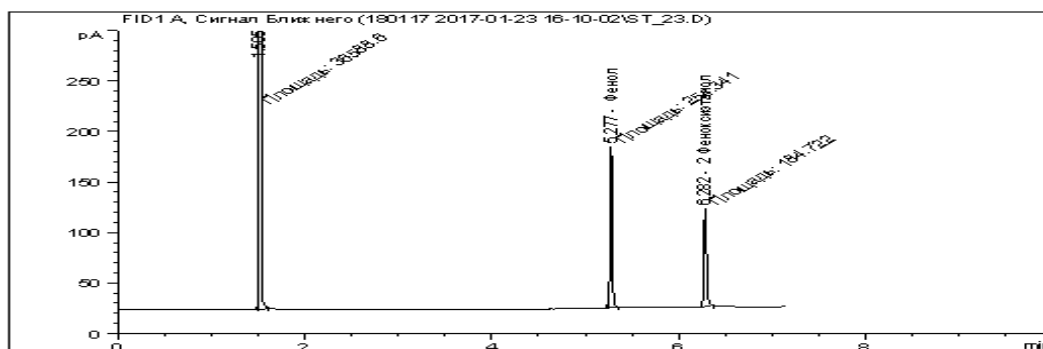


Рисунок 4 - Типичная хроматограмма стандартного раствора

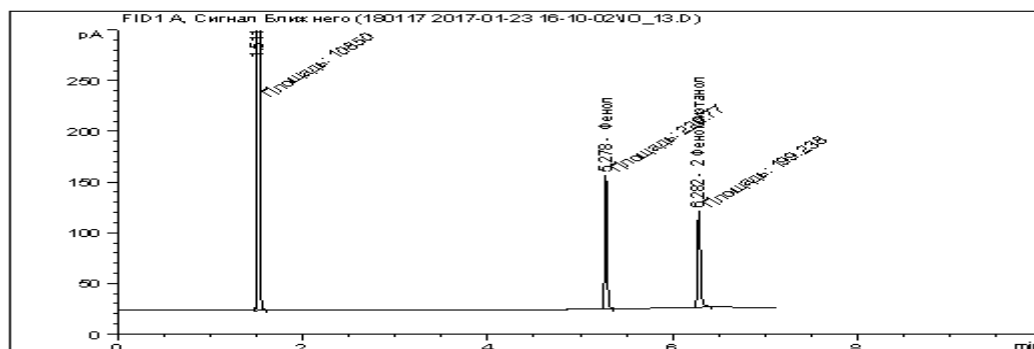


Рисунок 5 - Типичная хроматограмма испытуемого раствора

Таблица 3 – Степень извлечения фенола в образцах испытуемых растворов с добавленным известным количеством фенола

Добавленное количество фенола в модельный раствор	Теоретическое значение содержания фенола (x_i), мг/мл	Экспериментальное значение содержания фенола (y_i), мг/мл	Степень извлечения (R), %	Отклонение степени извлечения от 100%, (ϵ)
MP (+0,2 мг)	2,79	2,78	99,7	- 0,3
MP (+0,4 мг)	2,99	3,00	100,2	+ 0,2
MP (+0,6 мг)	3,19	3,22	100,8	+ 0,8
MP (+1,0 мг)	3,59	3,65	101,6	+ 1,6
Среднее значение степени извлечения			100,6	
Стандартное отклонение степени извлечения			0,81	
RSD степени извлечения, %			0,80	

Правильность и прецизионность методики оценивали в исследованиях модельных растворов (MP) образцов ИПЛ содержащих фенол, с добавками фенола 0,2; 0,4; 0,6 и 1,0 мг. Максимальное RSD составило 2%, при оценке промежуточной прецизионности. При оценке правильности методики получены значения степени извлечения в пределах от 99,7% до 101,6 %. Таким образом, отклонение от условно истинной величины не превышает 2%, что менее 10% от условно истинного значения (90 – 110%) (Таблица 3).

Анализ регрессионной зависимости между теоретическими (x_i) и экспериментальными (y_i) значениями фенола (Таблица 3) в модельных образцах показал отсутствие статистической значимости отклонений углового коэффициента от 1,0 и коэффициента сдвига от 0,0; коэффициент детерминации равен 1,0000. Регрессионный анализ и расчет F-критерия, при оценке регрессионных зависимостей с коэффициентом сдвига и без него, показал отсутствие статистической значимости систематической

ошибки методики: рассчитанное значение F-критерия ($F(P, f_1=N-1, f_2=N-2)$), составило 1,00016, при $N=72$ и степенях свободы $f_1=71, f_2=70$ при доверительной вероятности 0,95, при критическом значении $F_{крит} = 1,35$.

Получены критерии оценки пригодности хроматографической системы: коэффициент асимметрии пика фенола от 0,8 до 1,2, разрешение пиков фенола и внутреннего стандарта не менее 15, число теоретических тарелок не менее 180000.

Валидационные исследования показали соответствие методики фармакопейным требованиям и возможность применения методики при контроле ИЛП по показателю «Фенол».

Следующим этапом разработана методика определения фенола с применением метода обращенно-фазовой ВЭЖХ. На основании литературных сведений о свойствах хроматографической системы, а также собственных исследований, на основании показателей приемлемости хроматографической системы, с учетом состава ИЛП и концентрации фенола в ИЛП, были подобраны колонка с фазой C18, размерами 150 мм×4,6 мкм, зернением 5 мкм, состав подвижной фазы – ацетонитрил : 0,5% уксусная кислота (1:4), степень разведения образцов ИЛП в 25 раз, объем инъекции 20 мкл, при скорости потока 1,0 мл/мин в изократическом режиме, детектирование с помощью диодно-матричного УФ детектора, в режиме 270 нм. В данных условиях получили визуально симметричные, одиночные пики с коэффициентом симметрии 0,9 и отклонением значений площади 1,0% при десятикратном воспроизведении (Рисунок 6).

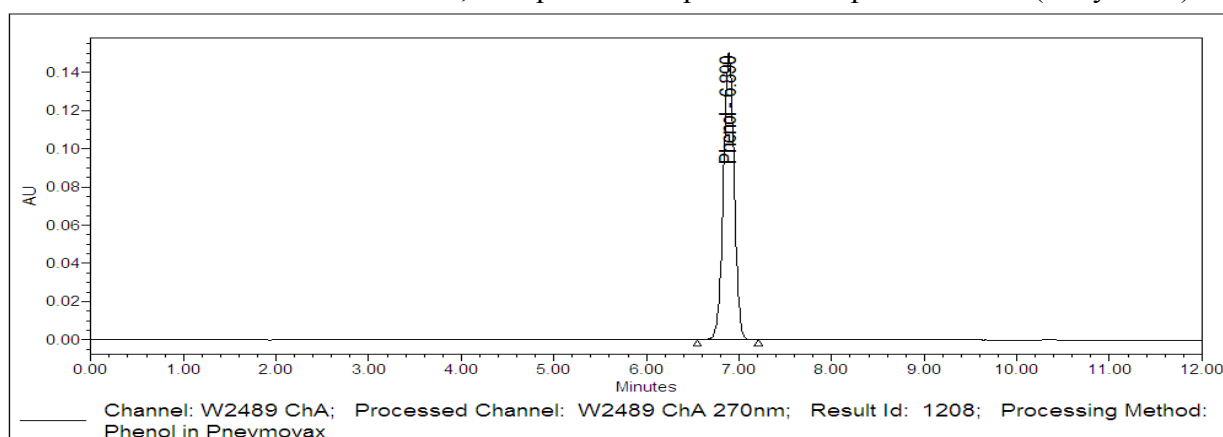


Рисунок 6 - Типичная хроматограмма образца ИЛП

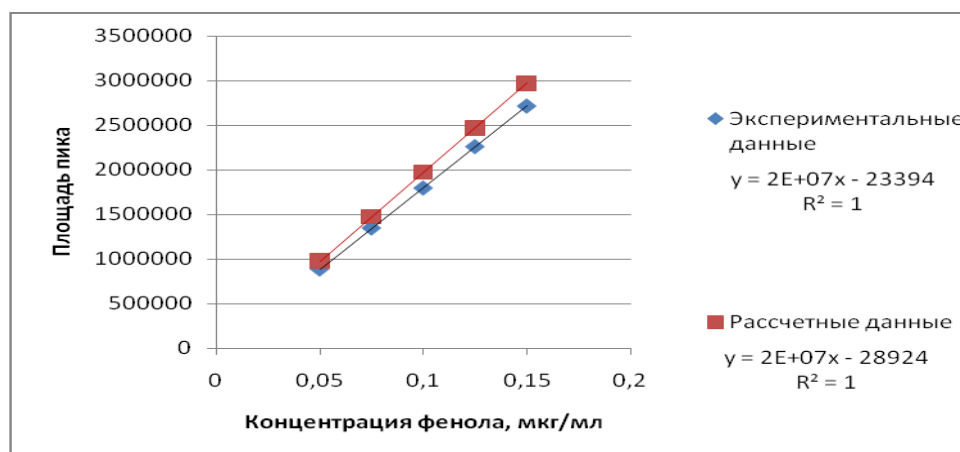


Рисунок 7 – Оценка линейности методики

Линейность методики исследована в диапазоне концентраций от 0,05 мг/мл до 0,15 мг/мл, что соответствует концентрациям фенола в ИЛП, разведенных в 25 раз. Выбрали способ построения регрессионной зависимости путем инжестирования 5-ти разных объемов стандартного рабочего раствора фенола, концентрацией 0,1 мг/мл (Рисунок 7).

Регрессионная зависимость визуально линейна; коэффициент детерминации составил 1,0000; RSD значений площадей пиков фенола калибровочных растворов менее 0,5 %; отклонения расчетных значений концентрации фенола от экспериментальных, для каждой точки регрессионной зависимости, ниже критического (табличного) значения t -критерия Стьюдента (при доверительной вероятности 0,95, $f=3$) - 3,18 (Рисунок 7, Таблицы 4-5).

Таблица 4 - Оценка RSD значений площадей пика фенола, полученных для каждой из концентраций регрессионной зависимости

Концентрация стандартного раствора, мг/мл	Средние арифметические площадей пиков для каждой из концентрации стандартных растворов (n=3)			Статистические показатели трех независимых испытаний		
	Испытание 1	Испытание 2	Испытание 3	X_{cp} площади пика	S_{cp} площадей пиков	SRD, %
0,050	887011,5	887514,4	888670	887732	850,39	0,10
0,075	1337920	1349728	1348374	1345941	5429,63	0,40
0,100	1794808	1804381	1796131	1798440	5187,41	0,29
0,125	2258720	2277745	2259435	2265300	10783,6	0,47
0,150	2713623	2727759	2714046	2718476	8042,10	0,30

Таблица 5 - Оценка отклонений расчетных значений площадей пиков от экспериментальных значений для каждой из концентраций регрессионной зависимости

Концентрации фенола в стандартных растворах, мг/мл, x_i	Экспериментальные значения относительной площади пика, y_i	Расчетные значения относительной площади пика, Y_i	Отклонение расчетных значений от экспериментальных, t
0,050	887012	971869	0,2909
0,075	1337920	1469887	0,4996
0,100	1794808	1971869	0,6805
0,125	2258720	2469887	0,5311
0,150	2713623	2971869	0,8024

Специфичность методики подтверждается: отсутствием пика со временем удерживания фенола на хроматограммах холостого раствора, совпадением значений времен удерживания пика фенола на хроматограммах испытуемого и стандартного растворов, отсутствием посторонних сигналов в области времени удерживания фенола (Рисунок 8).

Аналитическую область методики установили на основании анализа линейности в пределах концентраций от 0,050 мг/мл до 0,150 мг/мл по трем концентрациям с использованием разных объемов стандартного раствора 0,1 мг/мл.

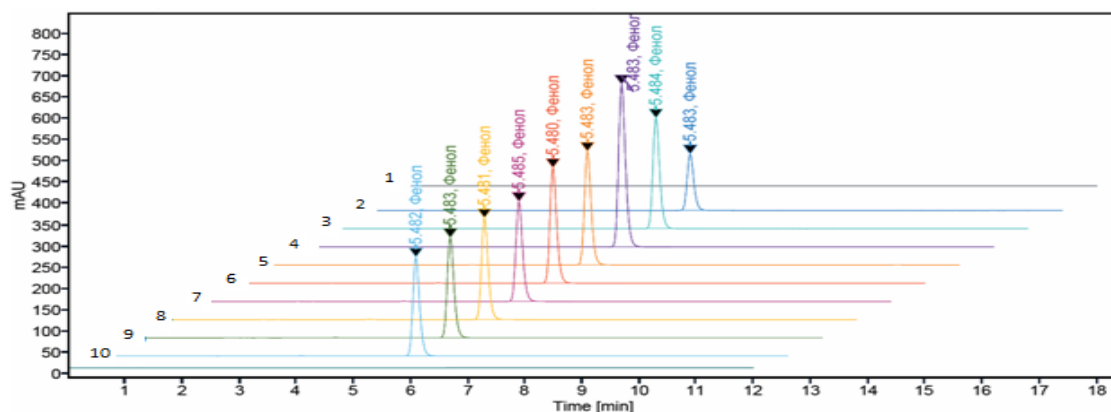


Рисунок 8 – Совмещенные хроматограммы¹

При оценке промежуточной прецизионности методики значения RSD результатов трех независимых испытаний не превысило 3% в исследованиях модельных растворов (МР) образцов ИПЛ, содержащих фенол, с добавками фенола 0,2; 0,4; 0,6 и 1,0 мг. При оценке правильности методики получены значения величины степени извлечения (R) в пределах от 98,9 % до 100,9 %. Таким образом, отклонение от условно истинной величины не превышает 2%, что менее 10% от условно истинного значения (90 – 110%) (Таблица 6).

Таблица 6 – Степень извлечения в образцах испытуемых растворов с добавленным известным количеством фенола

Добавленное количество фенола в модельный раствор	Теоретическое значение содержания фенола (x_i), мг/мл	Экспериментальное значение содержания фенола (y_i), мг/мл	Степень извлечения (R), %	Отклонение степени извлечения от 100% , (ϵ)
МР (+0,2 мг)	1,41	1,41	100,0	0,0
МР (+0,4 мг)	1,61	1,60	99,4	-0,6
МР (+0,6 мг)	1,81	1,79	98,9	-1,1
МР (+1,0 мг)	2,21	2,23	100,9	+ 0,9
Среднее значение степени извлечения			99,8	
Стандартное отклонение степени извлечения			0,86	
RSD степени извлечения, %			0,86	

Анализ регрессионной зависимости между теоретическими (x_i) и экспериментальными (y_i) значениями фенола (Таблица 6) показал отсутствие статистической значимости отклонений углового коэффициента от 1,0 и коэффициента сдвига от 0,0 коэффициент детерминации равен 0,9976 (выше минимально допустимых значений 0,99), что подтверждает правильность методики. Регрессионный анализ и расчет F-критерия Фишера показал отсутствие влияния систематической ошибки методики, рассчитанное значение F-критерия ($F(P, f_1=N-1, f_2=N-2)$), составило 0,6778, при $N=72$ и степенях свободы $f_1=71, f_2=70$, при доверительной вероятности 0,95 при критическом значении $F_{крит} = 1,35$.

¹ 1 – холостого раствора; 2 - хроматограмма стандартного раствора 0,05 мг/мл; 3 – хроматограмма стандартного раствора 0,1 мг/мл; 4 – хроматограмма стандартного раствора 0,15 мг/мл; 5-10 – типичные хроматограммы испытуемых растворов образцов ИПЛ

Получены критерии оценки пригодности хроматографической системы: отсутствие пиков с временами удерживания фенола на хроматограмме холостого раствора, RSD площади пика фенола не должно превышать 3% (по шести измерениям), коэффициент асимметрии пика фенола не должен превышать 2,0, число теоретических тарелок пика фенола должно быть не менее 5000.

Валидационные исследования показали соответствие методики фармакопейным требованиям и возможность применения методики при контроле ИЛП по показателю «Фенол».

На следующем этапе работы, для контроля стабильности лабораторных испытаний по показателю «Фенол», были аттестованы фармакопейные стандартные образцы содержания фенола. В качестве материала для стандартного образца, на основании результатов контроля стабильности содержания фенола, методом естественного старения и однородности дозирования, в соответствии с ГФ РФ, была выбрана разводящая жидкость для неинфекционных аллергенов с концентрацией фенола от 2,0 до 4,0 мг/мл.

Аттестованную характеристику ФСО 3.1.00449: от 2,56 до 3,32 мг/мл фенола, установили спектрофотометрическим методом.

Однофакторный дисперсионный анализ равнозначных выборок данных с расчетом критерия Фишера, показал сопоставимость результатов, полученных спектрофотометрической методикой и методикой ОФ ВЭЖХ. Полученное значение критерия Фишера составило 0,93, что ниже критического табличного значения $F_{\text{крит}} = 3,96$, при доверительной вероятности 0,95, со степенями свободы $\nu_{\text{меж}}=1$, $\nu_{\text{вну}}=78$ (Таблица 7).

Таблица 7 – Результаты оценки сопоставимости разработанной (ВЭЖХ) и фармакопейной (СФ) методик определения фенола

Статистические характеристики		Методики определения фенола	
		ВЭЖХ	СФ
Среднее значение (n=40)	$\bar{X}_{\text{ср}}$	2,90	2,94
Стандартное отклонение	S	0,18	0,19
Дисперсия	S^2	0,0324	0,0361
Среднее значение по двум выборкам (n=40)	$\bar{X}_{\text{ср ср}}$	2,92	
Значение критерия Фишера	F	0,93	
Табличное значение критерия Фишера (доверительная вероятность 0,95)	$F_{\text{крит}}$	3,96	

Таким образом, сделан вывод о возможности применения ФСО 3.1.00449 содержания фенола, аттестованного спектрофотометрической методикой, для методики ВЭЖХ.

Исследование равнозначных выборок данных с помощью однофакторного дисперсионного анализа и вычисления F -критерия Фишера, показало статистически значимое различие между результатами, полученными с применением спектрофотометрической методики и методики ГЖХ. Расчетное значение F -критерия составило 23,0, что выше критического табличного значения $F_{\text{крит}} = 3,96$, при доверительной вероятности 0,95, со степенями свободы $\nu_{\text{меж}}=1$, $\nu_{\text{вну}}=78$. На основании анализа значений выборочных дисперсий можно сделать вывод о более высокой прецизионности методики ГЖХ (Таблица 8).

Таблица 8 – Результаты оценки сопоставимости разработанной (ГЖХ) и фармакопейной (СФ) методик определения фенола

Статистические характеристики		Методики определения фенола	
		ГЖХ	СФ
Среднее значение (n=40)	X _{ср}	3,10	2,94
Стандартное отклонение	S	0,09	0,19
Относительное стандартное отклонение	RSD	2,9	6,46
Дисперсия	S ²	0,00839	0,0361
Среднее значение по двум выборкам (n=40)	X _{ср ср}	3,02	
Значение критерия Фишера	F	23,01	
Табличное значение критерия Фишера (доверительная вероятность 0,95)	F _{крит}	3,96	

Таким образом, сделан вывод о невозможности применения ФСО 3.1.00449 содержания фенола, аттестованного спектрофотометрической методикой, для методики ГЖХ. Для данной методики аттестован ФСО 3.1.00451 содержания фенола с аттестованными характеристиками от 2,92 до 3,28 мг/мл.

Разработка и стандартизация методики определения тиомерсала методом ААС ХП в ИЛП

Разработка методики определения тиомерсала с использованием метода ААС ХП, основанного на определении атомарной ртути, путем оценки интенсивности поглощения излучения при длине 253,7, включает подбор условий пробоподготовки испытуемых образцов ИЛП, заключающейся в минерализации ртутьорганического тиомерсала и других органических компонентов ИЛП, для получения свободной ртути и исключения влияния органической матрицы, а так же, подбор условий построения калибровочной характеристики, заключающийся в выборе стандартного раствора и определении диапазона аналитической области методики.

Линейность исследована в актуальном диапазоне концентраций ртути от 2,0 до 100,0 мкг/л, в качестве стандартного раствора использовали ГСО ионов ртути. В диапазоне концентраций от 10,0 мкг/л до 40,0 мкг/л регрессионная зависимость визуально линейна; коэффициент детерминации составил 0,997; RSD значений для каждой точки регрессионной зависимости, не превысило 6,0%; отклонения расчетных значений от экспериментальных, не превысило критического значения t- критерия Стьюдента - 2,5706 при доверительной вероятности 0,95, f=5 (Таблицы 9, Рисунок 9).

Таблица 9 - Оценка отклонения расчетного значения поглощения от экспериментальных значений для каждой из концентраций регрессионной зависимости

Концентрация стандартного раствора ртути, мкг/л, x_i	Экспериментальные значения поглощения, y_i	Расчетные значения поглощения, Y_i	Отклонение расчетных значений от экспериментальных, t
10	0,1045	0,1113	0,786
15	0,1718	0,1733	0,185
20	0,2409	0,2353	0,722
25	0,3047	0,2973	0,969
30	0,3679	0,3593	1,109
35	0,4159	0,4213	0,706
40	0,4791	0,4833	0,402

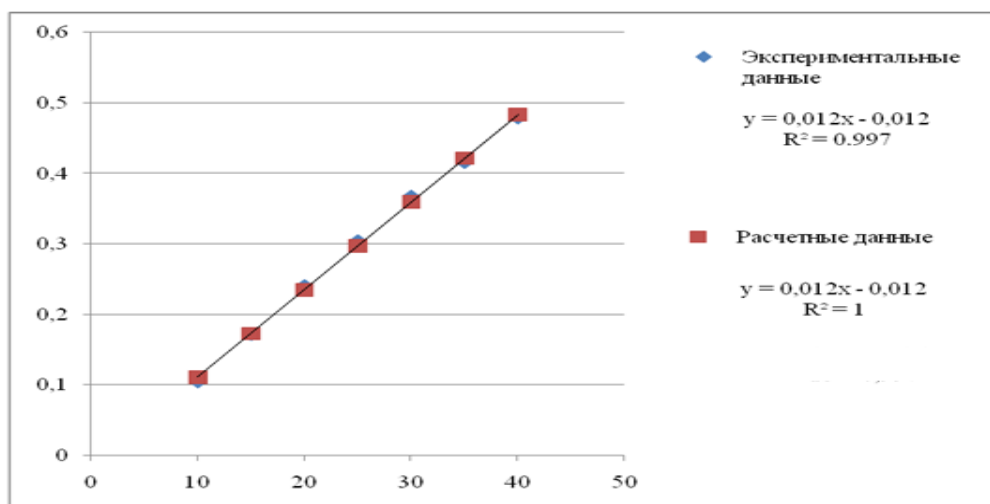


Рисунок 9 – Оценка линейности

Также, показана возможность использования для построения калибровочной характеристики растворов тиомерсала, приготовленных в ФБР рН 7,2 в качестве растворителя.

Отработаны условия пробоподготовки испытуемых образцов, реакционная смесь включает ИЛП - 25 мкл, серной кислоты (50%) - 150 мкл, раствора калия перманганата (5%) - 700 мкл, время реакции 1 час. Остаток калия перманганата удаляется добавлением раствора гидроксилamina сульфата (20%) - 200 мкл. Растворитель - хлористоводородная кислота (3%), общий объем - 50 мл.

Специфичность методики подтверждается при исследовании ИЛП, содержащих и не содержащих тиомерсал - в последних присутствие тиомерсала не обнаруживалось. При исследовании разных объемов образца сорбированной АКДС-вакцины с тиомерсалом показана линейная регрессионная зависимость поглощения от объема образца, с коэффициентом детерминации 0,991 (Таблица 10, Рисунок 10).

Таблица 10 - Специфичность методики определения тиомерсала методом ААС ХП

Объем образца АКДС вакцины, мкл	Среднее значение величины поглощения (n=3)	Содержания ионов ртути в пробе, мкг/л	Содержание тиомерсала в образце АКДС-вакцины, мкг/мл
10	0,1082	8,74	88,2
15	0,1654	14,17	95,5
20	0,2136	18,78	94,8
25	0,2620	23,39	94,4
30	0,3255	29,44	99,0
35	0,3704	33,71	97,2
40	0,3935	35,91	90,6
Среднее значение			94,24
Стандартное отклонение			3,72
RSD, %			3,95

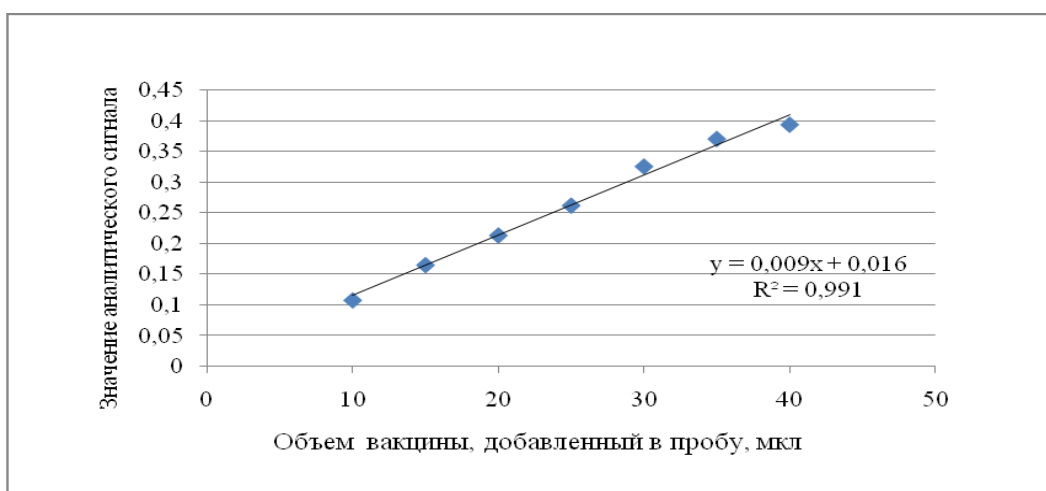


Рисунок 10 - Регрессионная зависимость величины поглощения от объема образца АКДС-вакцины

Таблица 11 - Оценка статистической значимости коэффициента сдвига уравнения регрессионной зависимости между теоретическими (x_i) и экспериментальными (y_i) данными методики определения тиомерсала ААС XII

Объем образца АКДС вакцины, мкл	Теоретическое значение содержания тиомерсала (x_i), мкг/мл	Экспериментальное значение содержания тиомерсала (y_i), мкг/мл	Уравнения регрессионной зависимости между значениями x_i и y_i без учета (А) и с учетом (В) коэффициента сдвига
10	0,94	0,88	$y=0,9959x$ (А) $R^2=0,9925$
15	1,41	1,42	
20	1,88	1,88	
25	2,35	2,34	$y=0,9929x+0,0081$ (В) $R^2=0,9925$
30	2,85	2,94	
35	3,29	3,37	
40	3,76	3,59	

Регрессионный анализ и расчет F -критерия показал отсутствие статистической значимости систематической ошибки при оценке значимости коэффициента сдвига уравнения регрессионной зависимости между теоретическими (x_i) и экспериментальными (y_i) значениями концентраций тиомерсала с учетом коэффициента сдвига и без него. Значение F -критерия ($F(P, f_1=N-1, f_2=N-2)$) составило 0,16, при $N=7$ и степенях свободы $f_1=6, f_2=5$ при доверительной вероятности 0,95, при критическом значении $F_{крит} = 4,95$ (Таблица 11).

Максимальное значение промежуточной прецизионности не превысило 5%. При оценке правильности полученные значения степени извлечения $R(\%)$ для модельных растворов образцов ИЛП, содержащих тиомерсал, с известными добавками тиомерсала (10,0; 20,0 и 40,0 мкг), с предварительным разведением (1:2) и без разведения, находятся в пределах 90,0% -106,6%, для растворов тиомерсала 50,0; 100,0 и 150,0 мкг/мл (РР), приготовленных по навеске - 101,7% - 108,8%, что менее 10% от условно истинного значения (90 – 110%) (Таблица 12).

Таблица 12 - Оценка степени извлечения в модельных растворах испытуемых образцов и растворов тиомерсала (PP)

Наименование испытуемого (модельного) раствора	x_i - теоретическое значение содержание тиомерсала, мкг/мл	y_i - экспериментальное значение тиомерсала, (n=3), мкг/мл	Степень извлечения (R), %	Отклонение степени извлечения от 100%, (ε)
АКДС вакцина (1:2)	-	44,7	-	-
АКДС вакцина (1:2)+10	54,7	53,3	97,4	-2,60
АКДС вакцина (1:2)+20	64,7	65,3	100,9	0,9
АКДС вакцина (1:2)+40	84,7	85,6	101,1	1,06
АС анатоксин (1:2)	-	45,5	-	-
АС анатоксин (1:2)+10	55,5	56,6	101,9	1,98
АС анатоксин (1:2)+20	65,5	69,8	106,6	6,56
АС анатоксин (1:2)+40	85,5	90,7	106,1	6,08
АДС-М анатоксин (1:2)	-	46,1	-	-
АДС-М ан-н (1:2)+10	56,1	56,5	100,7	0,70
АДС-М ан-н (1:2)+20	66,1	68,0	102,9	2,87
АДС-М ан-н (1:2)+30	86,1	91,9	106,7	6,74
Стафилококковый ан-н	-	107,2	-	-
Стафилококк. ан-н+10	117,2	116,1	99,0	-0,94
Стафилококк. ан-н+20	127,2	124,4	97,8	-2,20
Стафилококк. ан-н+30	147,2	141,3	96,0	-4,01
Тетраанатоксин	-	89,8	-	-
Тетраанатоксин+10	99,8	93,6	93,8	-6,21
Тетраанатоксин+20	109,8	105,5	96,1	-3,92
Тетраанатоксин+40	129,8	120,9	93,1	-6,86
Ультрикс	-	93,0	-	-
Ультрикс+10	103,0	102,2	99,2	-0,78
Ультрикс+20	113,0	104,1	92,1	-7,88
Ультрикс+30	133,0	120,9	90,9	-9,10
Среднее значение степени извлечения			99,0	
Стандартное отклонение степени извлечения			4,8	
RSD степени извлечения, %			4,9	
PP1	50	53,98	108,0	8,0
PP2	100	108,84	108,8	8,8
PP3	150	152,52	101,7	1,7
Среднее значение степени извлечения			106,2	
Стандартное отклонение степени извлечения			3,9	
RSD степени извлечения, %			3,7	

Полученные значения предела обнаружения (ПО) и предела количественного определения (ПКО) составили 1,13 мкг/л и 3,43 мкг/л ртути (в пересчете на тиомерсал $2,3 \times 10^{-3}$ мкг/мл и $6,9 \times 10^{-3}$ мкг/мл соответственно).

Валидационные характеристики методики соответствуют фармакопейным требованиям и подтверждают возможность применения методики при контроле ИЛП по показателю «Тиомерсал».

На следующем этапе работы была исследована возможность применения ФСО 3.1.00427 содержания тиомерсала для методики ААС ХП.

Однофакторный дисперсионный анализ равнозначных выборок данных с расчетом критерия Фишера, показал сопоставимость результатов, полученных колориметрической методикой и методикой ААС ХП. Полученное значение критерия Фишера составило 1,29, что ниже критического табличного значения $F_{\text{крит}} = 3,96$, при доверительной вероятности 0,95, со степенями свободы $\nu_{\text{меж}}=1$, $\nu_{\text{вну}}=78$ (Таблица 13).

Таблица 13 – Результаты оценки сопоставимости разработанной (ААС ХП) и фармакопейной (КМ) методик определения тиомерсала

Статистические характеристики		Методики определения тиомерсала	
		ААС ХП	КМ
Среднее арифметическое (n=40)	Хср	89,06	87,80
Стандартное отклонение	S	4,89	5,06
Дисперсия	S ²	23,9	25,6
Среднее значение по двум выборкам (n=40)	Хср ср	88,43	
Значение критерия Фишера	F	1,29	
Табличное значение критерия Фишера (доверительная вероятность, 0,95)	F _{крит}	3,96	

Таким образом, показана возможность применения ФСО 3.1.00427 содержания тиомерсала, аттестованного колориметрической методикой для контроля стабильности лабораторных испытаний при воспроизведении методики ААС ХП.

ВЫВОДЫ

1. Экспериментально доказана возможность применения метода газожидкостной хроматографии для контроля количественного содержания фенола в иммунобиологических лекарственных препаратах: разработана методика, позволяющая определять фенол в образцах всех групп иммунобиологических лекарственных препаратов, содержащих фенол, без предварительной пробоподготовки. Валидация методики в соответствии с требованиями ГФ РФ и ИСН показала возможность ее применения для контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов по показателю «Фенол».

2. Разработана методика количественного определения фенола в иммунологических лекарственных препаратах на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии. Подобраны условия хроматографирования позволяющие оценивать качество образцов всех групп препаратов по показателю «Фенол». Валидация методики в соответствии с требованиями ГФ РФ и ИСН показала возможность ее применения для контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов по показателю «Фенол».

3. Разработана методика количественного определения тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах на основе метода атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара ртути. Валидация методики в соответствии с требованиями ГФ РФ и ИСН показала возможность ее применения для контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов по показателю «Тиомерсал».

4. Оценена сопоставимость результатов определения фенола в иммунобиологических лекарственных препаратах, полученных вновь разработанными методиками в сравнении с фармакопейной методикой, показано отсутствие статистически значимых различий между результатами, полученными спектрофотометрической (фармакопейной) методикой и

методикой высокоэффективной жидкостной хроматографии, для методики газожидкостной хроматографии получены более высокие показатели прецизионности.

5. Оценка сопоставимости результатов, подтвердила возможность аттестации одного стандартного образца содержания фенола для методик высокоэффективной жидкостной хроматографии и спектрофотометрии, и необходимость аттестации стандартного образца отдельно для методики газожидкостной хроматографии. Оценена сопоставимость результатов определения тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах, полученных разработанной методикой атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара и фармакопейной методикой, показано отсутствие статистически значимых различий между результатами.

6. Разработаны и аттестованы фармакопейные стандартные образцы: ФСО 3.1.00449 содержания фенола (для спектрофотометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии) и ФСО 3.1.00451 содержания фенола (для газожидкостной хроматографии), позволяющие контролировать стабильность определения фенола при проведении испытаний иммунобиологических лекарственных препаратов с применением методик, основанных на спектрометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии и газожидкостной хроматографии.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. На фармацевтических предприятиях, выпускающих иммунобиологические препараты, содержащие консерванты, для контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов по показателю «Фенол», рекомендуется внедрять методики, основанные на высокоселективных и высокоточных методах газожидкостной хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

2. В рамках осуществления внутрилабораторного контроля качества, при проведении испытаний по показателю «Фенол», рекомендуется использовать фармакопейные стандартные образцы содержания фенола: ФСО 3.1.00449 для методов высокоэффективной жидкостной хроматографии и спектрофотометрического и ФСО 3.1.00451 для метода газожидкостной хроматографии.

3. На фармацевтических предприятиях, выпускающих иммунобиологические препараты, содержащие консерванты, для контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов по показателю «Тиомерсал», рекомендуется внедрять методику, основанную на высокоселективном и высокоточном методе атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара.

4. В рамках осуществления внутрилабораторного контроля качества, при проведении испытаний по показателю «Тиомерсал» методом атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара рекомендуется использовать фармакопейный стандартный образец ФСО 3.1.00427 содержания тиомерсала в сорбированных препаратах.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Разработка новых методик количественного определения вспомогательных компонентов или остаточных количеств технологических примесей, используемых при производстве иммунобиологических лекарственных препаратов на основе высокотехнологичных методов.

2. Оценка сопоставимости результатов определения аналита фармакопейными и новыми высокотехнологичными методиками.

3. Разработка и аттестация стандартных образцов для контроля стабильности испытаний по показателям качества иммунобиологических лекарственных препаратов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Колесникова, О.Н. Определение мертиолята в иммунобиологических лекарственных препаратах методом атомно-абсорбционной спектроскопии (холодного пара) / О.Н. Колесникова, О.Б.Устинникова // Приоритетные направления развития экспертной деятельности в области обращения лекарственных средств: материалы третьей научно-практической конференции молодых ученых. - Москва, 2014. - С. 18-22.

2. Колесникова, О.Н. Оценка сопоставимости результатов определения фенола в иммунобиологических лекарственных препаратах / О.Н. Колесникова, М.Г.Коротков, В.И.Малкова, О.Б.Рунова, О.Б.Устинникова, В.И.Климов // БИОпрепараты, профилактика, диагностика, лечение. - 2015. - Т.15, №4. - С. 44-51.

3. Колесникова, О.Н. Определение мертиолята в несорбированных ИЛП методом атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара (ААС-ХП) по ионам ртути. Часть 1: отработка методики и оценка результатов определения ионов ртути колориметрическим методом и методом ААС-ХП / О.Н. Колесникова, О.Б. Устинникова, О.Б. Рунова, В.П. Бондарев // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2015. – Т.54, №2. - С. 59-63.

4. Колесникова, О.Н. Разработка и валидация методики количественного определения фенола методом газожидкостной хроматографии в биологических лекарственных препаратах / О.Н. Колесникова, О.Б. Рунова, О.Б. Устинникова // Химико-фармацевтический журнал. - 2018. – Т. 52, №5. - С.60-64.

5. Колесникова, О.Н. Консерванты в иммунобиологических препаратах: необходимость наличия и методы количественной оценки / О.Н. Колесникова, О.Б. Устинникова, А.А. Мовсесянц // Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы : материалы всероссийской научно-практической конференции с международным участием. - Москва, 2019. - С. 20-21.

6. Колесникова, О.Н. Разработка и аттестация стандартных образцов содержания фенола в биологических лекарственных препаратах с учетом сопоставимости результатов, полученных методами ГЖХ, ВЭЖХ, спектрофотометрии и колориметрии / О.Н. Колесникова, О.В. Фадейкина, О.Б. Устинникова, Р.А. Волкова, А.А. Мовсесянц // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2021. - Т.21, №3. - С. 193-199.

7. Колесникова, О.Н. Оценка сопоставимости результатов определения тиомерсала колориметрическим методом и методом атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара в иммунобиологических лекарственных препаратах / О.Н. Колесникова, В.Е. Трегубова, О.Б. Устинникова, А.А. Мовсесянц // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2022. - Т.22, №3. - С. 318-330.

ПАТЕНТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

8. Патент 2693518 Российская Федерация, МПК G01N 30/02 (2019.02). Способ количественного определения фенола методом газожидкостной хроматографии в биологических лекарственных препаратах / Колесникова О.Н., Устинникова О.Б., Рунова О.Б. заявитель и патентообладатель: ФГБУ НЦЭСМП Министерства

здравоохранения (RU). - №2013149234/15; заявл. 26.11.2018; опубл. 03.07.2019, бюл. №19. – 22с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

GLP – Good Laboratory Practice (Надлежащая лабораторная практика)- система норм, правил и указаний, направленных на обеспечение согласованности и достоверности результатов лабораторных исследований.

RSD – relative standard deviation - относительное стандартное отклонение

ААС ХП – атомно-абсорбционная спектрометрия холодного пара

ААС – атомно-абсорбционная спектрометрия

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВКК - внутрилабораторный контроль качества

ГЖХ – газожидкостная хроматография

ГФ РФ – Государственная фармакопея Российской Федерации

ИЛП – иммунобиологические лекарственные препараты

КМ – колориметрическая методика

НД – нормативная документация

ОФ ВЭЖХ – обращено-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

ОФС – общая фармакопейная статья

СМК – система менеджмента качества

УФ – ультрафиолетовый волновой диапазон

ФСО - фармакопейный стандартный образец

ФБР – фосфатный буферный раствор