

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

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Evaluation of comparability of results of determination of phenol in the immunobiological medicines

A.O.N. Kolesnikova, M.G. Korotkov, V.I. Malkova, O.B. Rounova, O.B. Ustinnikova, V.I. Klimov

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

В статье представлены материалы практической оценки сопоставимости результатов определения содержания фенола в иммунобиологических лекарственных препаратах полученных различными методами. Проведена оценка статистической значимости различий результатов определения фенола методами, описанными в НД на зарубежные и отечественные препараты: использован однофакторный дисперсионный анализ с применением критерия Фишера (F-критерия). Сделан вывод о взаимозаменяемости исследованных методов определения фенола в ИЛП и актуальности разработки и аттестации стандартного образца сравнения и образца подтверждения правильности измерений.

Ключевые слова: фенол; количественная оценка; статистически значимые различия; иммунобиологические лекарственные препараты.

Библиографическое описание: Колесникова ОН, Коротков МГ, Малкова ВИ, Рунова ОБ, Устинникова ОБ, Климов ВИ. Оценка сопоставимости результатов определения фенола в иммунобиологических лекарственных препаратах. Биопрепараты 2015; (4): 44–51.

The article presents the practical assessment of the possibility of harmonization and standardization of methods for the determination of phenol in the immunobiological medicines. The evaluation of the statistical significance of differences in the results of determinations of phenol existing methods described in the standard documentation for foreign and domestic preparations: used ANOVA with Fisher's exact test (F-test). The conclusion of the interchangeability of the studied methods for the determination of phenol in the immune-biological medicines and the opportunity of the development and certification of standard reference and sample validation measurements.

Key words: phenol; quantitative assessment; a statistically significant difference; immunobiological medicines.

Bibliographic description: Kolesnikova ON, Korotkov MG, Malkova VI, Rounova OB, Ustinnikova OB, Klimov VI. Evaluation of comparability of results of determination of phenol in the immune-biological medicines. Biopreparation (Biopharmaceuticals) 2015; (4): 44–51.

Фенол – органическое соединение, гидрокси-производное бензола, являющееся одним из основных консервантов, применяемых при производстве иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП). Фенол ядовит и вызывает нарушение функций нервной системы, быстро всасывается даже через неповрежденные участки кожи и уже через несколько минут начинает воздействовать на ткани головного мозга. Пыль, пары и раствор фенола раздражают слизистые оболочки глаз, дыхательных путей, кожу [1].

В производстве ИЛП фенол применяется в качестве консерванта в концентрации от 0,15 до 0,4% [2]. К препаратам как отечественного, так и зарубежного производства, содержащим фенол в качестве консерванта, относятся неинфекционные аллергены, туберкулезные аллергены, поливалентные, полисахаридные и липополисахаридные вакцины, иммуномодулирующие препараты в форме мазей и суппозиториев. Данные препараты различны по составу, форме выпуска и содержанию фенола [2].

Контроль на содержание фенола обеспечивает необходимую безопасность применения соответствующего препарата как со стороны отсутствия бактериальной контаминации, так и с точки зрения безопасности его применения.

Традиционно сложившаяся методическая база, основанная на национальных фармакопеях и частных статьях, приводит к необходимости оценки содержания одного и того же консерванта различными методами [2, 3]. В свое время, в лаборатории биохимии и биотехнологии ГИСК им. Л.А. Тарасевича было разработано определение фенола в ИЛП методом газожидкостной хроматографии [4]. Данный метод является высокочувствительным, быстрым в исполнении и перспективным для внедрения. Однако, на сегодняшний день, данный метод не включен ни в одну из нормативных документаций на иммунобиологические препараты. Таким образом, основными методами оценки фенола в ИЛП, на сегодняшний день, являются спектрофотометрический метод (традиционный для отечественных препаратов), колориметрический метод (ЕФ, НД

на зарубежные препараты) и метод ВЭЖХ (НД на зарубежные препараты).

Практическое исследование методической базы, применяемой для определения фенола, с целью оценки сопоставимости результатов испытаний, полученных с применением разных методов, может свести к минимуму технические и экономические сложности, возникающие в рамках одной испытательной лаборатории [2].

В ходе проведения лабораторной фармацевтической экспертизы и оценки соответствия иммунобиологических лекарственных средств (ИЛС) требованиям утвержденной документации в части физико-химических показателей качества, применяются СО утвержденных типов, как носителей аттестованных значений состава и свойств веществ с целью обеспечения единства измерений [5, 6]. Оценка необходимости аттестации стандартных образцов медицинских биологических препаратов показана в ряде публикаций [7–10]. На сегодняшний день, подобным метрологическим инструментом обеспечен ряд методик, применяемых для оценки физико-химических показателей качества, непосредственно отражающих эффективность и безопасность ИЛС (белок как основное действующее вещество, гетерологичные примеси белковой природы, адьювант, консервант и т.п.), СО содержания фенола отсутствует. Кроме того, применение различных методик количественного определения фенола диктует необходимость использования стандартных образцов содержания фенола с целью получения подтверждения правильности полученных результатов и согласованности значений при использовании альтернативных методов контроля.

Таким образом, данное исследование направлено на сравнительное изучение основных методов количественного определения фенола в ИЛП, с целью получения экспериментального подтверждения взаимозаменяемости методик и возможности выбора методики, отличной от указанной в нормативной документации, с учетом оснащения лаборатории, при условии использования единых стандартных образцов для построения калибровочного графика и подтверждения правильности воспроизведения методики.

Материалы и методы исследования

Методы

1. Колориметрический метод определения фенола

Метод описан в Европейской фармакопее [11] и основан на образовании соединений фенола с аминопиразолоном (4-аминоантипирин) в присутствии феррицианида калия, детектируемых при 546 нм. Испытуемый раствор разводят до концентрации фенола в пределах калибровочной кривой, прибавляют раствор аминопиразолона и раствор калия феррицианида, выдерживают и измеряют интенсивность окрашивания при длине волны 546 нм, содержание фенола рассчитывают по калибровочному графику. Для определения используют спектрофотометр с излучением в видимой области спектра.

2. Спектрофотометрический метод

Метод основан на способности фенола поглощать ультрафиолетовый свет, и заключается в измерении оптической плотности растворов при длинах волн 269 нм (максимум поглощения фенола) и 290 нм (максимум поглощения окрашенных примесей) с последующим определением содержа-

ния фенола по калибровочному графику. Для измерения был использован спектрофотометр с излучением в УФ-области [12–14].

3. Метод ВЭЖХ

Метод основан на измерении поглощения УФ-излучения фракцией фенола при длине волны 270 нм. Работу проводили при комнатной температуре с использованием метода обращенно-фазовой хроматографии на жидкостном хроматографе Waters Alliance 2695 с диодно-матричным детектором Waters 2998 в изократическом режиме на октадецилсиликагельной колонке размером 3,9 мм × 150 мм, 5 мкм. В составе подвижной фазы применяли ацетонитрил, уксусную кислоту. Время хроматографирования 12 мин [15].

4. Статистические методы анализа

При расчете результатов использовали статистические методы анализа [16, 17]:

- среднего арифметического вычисляли по формуле

$$X_{\text{ср}} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i;$$

- стандартное отклонение S определяли по формуле:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - X_{\text{ср}})^2};$$

- коэффициент вариации RSD %, рассчитывали по формуле:

$$RSD = \frac{S * 100}{X_{\text{ср}}}$$

- внутривидовую дисперсию рассчитывали как квадрат стандартного отклонения:

$$s_{\text{вну}}^2 = s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - X_{\text{ср}})^2$$

- межгрупповую дисперсию рассчитывали как квадрат стандартного отклонения средних значений, полученных каждым из методов от общего среднего, для каждого образца:

$$s_{\text{меж}}^2 = s^2 = \frac{1}{m-1} \sum_{j=1}^m (X_{\text{ср}j} - X_{\text{общ ср}})^2$$

- критерий Фишера, для каждого из примененных методов рассчитывали как отношение среднего значения межгрупповых дисперсий, к среднему значению внутригрупповой дисперсии для каждого метода:

$$F = \frac{s_{\text{меж ср}}^2}{s_{\text{вну ср}}^2}$$

- критическое значение критерия Фишера определяли по таблице. Для этого находили значение внутригрупповой и межгрупповой степеней свободы:

$$v_{\text{меж}} = n - 1$$

$$v_{\text{вну}} = n \times (m - 1)$$

Материалы

1. Образец 1 – вакцина пневмококковая поливалентная полисахаридная Пневмо 23, производства «Санофи Пастер», Франция, серия K7369-6.

2. Образцы 2 и 3 – вакцина пневмококковая полисахаридная Пневмовакс 23, производство MSD Польша, серия J015447 (флаконы) и серия 0000264237 (шприцы) соответственно.

3. Образец 4 и 5 – вакцина брюшнотифозная полисахаридная Вианвак, производства «Гринтвак», серии 325 и 329 соответственно.

4. Образцы 6 и 7 – вакцина липополисахаридная Шигеллвак, производства «Гринтвак», серии 126 и 132 соответственно.

5. Образец 8 – аллерген пыльцы орешника, производство НПО «Микроген», Ставрополь, серия 216.

6. Образец 9 – микст-Аллерген пыльцы луговых трав, производство НПО «Микроген», Ставрополь, серия 61.

7. Образец 10 – Н-ал весенняя смесь ранняя, производство «Севафарма» а.о., Чешская республика, серия 01-0512.

8. Образцы 11 и 12 – разводящая жидкость для аллергенов, производство «Микроген», Ставрополь, серии 68 и 70 соответственно.

9. Образец 13 – туберкулезный аллерген Диаскинтест, производство «Генериум», Россия, серия 010111.

10. Для приготовления растворов для построения калибровочной кривой был использован коммерческий реактив фенол («Sigma-aldrich», кат.№ Р 1037).

Результаты

Для исследования были выбраны образцы ИЛП с различными концентрациями фенола и методами его оценки. Сравнительные материалы представлены в таблице 1.

Было проведено определение содержания фенола в исследуемых образцах тремя методами. Образцы анализировали в двух параллельных пробах, каждую методику воспроизводили 5 раз, таким образом, для каждого препарата, суммарно в условия повторяемости и внутрिलाбораторной воспроизводимости, были сделаны по 10 измерений каждым из трех методов.

Для определения фенола колориметрическим методом использовали калибровочную характеристику, построенную в диапазоне от 5 до 50 мкг/мл из рабочего раствора фенола, концентрации 100 мкг/мл (табл. 2).

Результаты определения содержания фенола в испытуемых образцах колориметрическим методом представлены в таблице 3.

Из таблицы 3 следует, что стандартное отклонение значений по десяти измерениям для всех исследуемых препаратов не превышает 0,17. Значения коэффициента вариации находятся в границах от 0,99 до 6,53%. Значения концентраций фенола, полученные для каждого препарата, соответствуют требованиям НД на препарат к количественному содержанию фенола (таблица 1). Среднее значение внутригрупповой дисперсии $S_{группы}^2$ для спектрофотометрического метода равно 0,005125.

Для определения фенола спектрофотометрическим методом использовали калибровочную характеристику, построенную в диапазоне от 5 до 50 мкг/мл из рабочего раствора фенола, концентрации 100 мкг/мл (табл. 4).

Результаты определения содержания фенола в испытуемых образцах спектрофотометрическим методом представлены в таблице 5.

Таблица 1. Данные по препаратам, отобраным для экспериментальных работ

Наименование препарата	Производитель	Содержание фенола (по требованиям НД)	Метод определения фенола
Аллергены и разводящая жидкость	ФГБУ НПО «Микроген» МЗ РФ, Ставрополь	0,2–0,4% (2,0–4,0 мкг/мл)	Спектрофотометрический
Аллергены: Н-АЛ (прик-тест диагностический)	«Севафарма» а.о., Чехия	1,0–4,0 мкг/мл	Колориметрический
Диаскинтест (аллерген туберкулезный очищенный в стандартном разведении)	ЗАО «Лекко», Харьков ЗАО «Генериум»	0,2–0,3%	Спектрофотометрический
Гонококковая вакцина	ФГБУ НПО «Микроген» МЗ РФ г. Томск	не более 0,25%	Спектрофотометрический
Пневмо-23 (вакцина пневмококковая поливалентная полисахаридная)	«Санофи Пастер С.А.», Франция	не более 0,25%	Колориметрический
Шигеллвак (вакцина дизентерийная против шигелл Зонне, липополисахаридная)	ООО «Гринтвак», Москва	Не более 0,75 мг/0,5 мл (не более 0,15%)	Спектрофотометрический
Вианвак (вакцина брюшнотифозная Ви-полисахаридная)	ООО «Гринтвак», Москва	Не более 0,75 мг/0,5 мл (не более 0,15%)	Спектрофотометрический
Пневмовакс-23	MSD Польша	От 0,225 до 0,275%	ВЭЖХ

Таблица 2. Результаты построения калибровочных графиков для колориметрического метода

Значения оптических плотностей для стандартных растворов заданных концентраций (мкг/мл)						Калибровочные кривые	Коэффициент корреляции кривой
5	10	20	30	40	50		
0,149	0,298	0,59	0,879	1,161	1,444	$y=0,0288x+0,0105$	$R=0,9999$
0,146	0,294	0,592	0,873	1,155	1,432	$y=0,0284x+0,0175$	$R=0,9998$
0,149	0,298	0,602	0,886	1,187	1,495	$y=0,0298x-0,0005$	$R=0,9999$
0,152	0,295	0,600	0,889	1,167	1,456	$y=0,029x+0,011$	$R=0,9998$
0,146	0,296	0,573	0,907	1,174	1,444	$y=0,0291x+0,0052$	$R=0,999$

Таблица 3. Результаты определения концентраций фенола (мг/мл) в испытуемых образцах колориметрическим методом

Образец	Результаты испытаний за 5 дней					Хср	S	RSD%	S ² _{вну}
	1	2	3	4	5				
№ 1	2,10	2,05	2,05	2,07	2,07	2,06	0,07	3,49	0,005135
	1,93	2,20	1,96	2,07	2,06				
№ 2	2,41	2,42	2,34	2,34	2,44	2,41	0,08	3,26	0,006168
	2,45	2,59	2,32	2,36	2,41				
№ 3	2,74	2,53	2,36	2,44	2,75	2,56	0,17	6,53	0,028047
	2,73	2,40	2,53	2,40	2,77				
№ 4	1,20	1,27	1,22	1,24	1,23	1,23	0,04	3,04	0,001405
	1,21	1,32	1,19	1,23	1,22				
№ 5	1,19	1,19	1,22	1,22	1,18	1,20	0,02	1,30	0,000242
	1,20	1,19	1,22	1,20	1,18				
№ 6	1,24	1,30	1,23	1,24	1,29	1,25	0,03	2,55	0,001019
	1,22	1,29	1,21	1,24	1,23				
№ 7	1,25	1,25	1,24	1,23	1,28	1,25	0,01	0,99	0,000153
	1,23	1,25	1,25	1,24	1,25				
№ 8	2,43	2,44	2,57	2,46	2,44	2,44	0,06	2,51	0,003751
	2,48	2,40	2,41	2,34	2,40				
№ 9	2,61	2,56	2,56	2,57	2,63	2,60	0,06	2,34	0,003698
	2,55	2,68	2,71	2,52	2,61				
№ 10	1,71	1,98	1,81	1,72	1,75	1,77	0,09	5,26	0,008671
	1,70	1,80	1,69	1,86	1,69				
№ 11	2,78	2,90	2,72	2,78	2,83	2,80	0,06	2,21	0,003819
	2,75	2,89	2,76	2,75	2,83				
№ 12	3,09	2,98	3,06	3,04	2,88	3,04	0,06	2,06	0,003912
	3,03	3,07	3,08	3,05	3,06				
№ 13	2,46	2,40	2,40	2,40	2,42	2,42	0,02	1,02	0,000607
	2,40	2,40	2,40	2,45	2,44				
Среднее значение внутригрупповой дисперсии S ² _{вну ср}									0,005125

Таблица 4. Результаты построения калибровочных графиков для спектрофотометрического метода

Значения оптических плотностей для стандартных растворов заданных концентраций (мкг/мл)						Калибровочные кривые	Коэффициент корреляции кривой
5	10	20	30	40	50		
0,077	0,147	0,301	0,444	0,584	0,737	y=0,0146x+0,0038	R=0,9998
0,07	0,144	0,293	0,433	0,565	0,704	y=0,0141x+0,0051	R=0,9995
0,075	0,149	0,299	0,439	0,577	0,706	y=0,0141x-0,0107	R=0,9993
0,074	0,152	0,299	0,439	0,575	0,716	y=0,0142x+0,0092	R=0,9997
0,073	0,144	0,285	0,426	0,568	0,708	y=0,0141x+0,0027	R=1

Таблица 5. Результаты определения фенола (мг/мл) в испытуемых образцах спектрофотометрическим методом

Образец	Результаты испытаний за 5 дней					Хср	S	RSD%	S ² _{вну}
	1	2	3	4	5				
№1	2,17	2,15	2,00	2,10	2,10	2,08	0,06	2,95	0,003748
	2,02	2,02	2,02	2,06	2,12				
№2	2,52	2,56	2,39	2,44	2,46	2,46	0,06	2,59	0,00405
	2,56	2,41	2,41	2,40	2,46				
№ 3	2,90	2,51	2,38	2,42	2,79	2,59	0,20	7,77	0,040453
	2,75	2,36	2,55	2,43	2,79				
№ 4	1,33	1,26	1,25	1,25	1,27	1,27	0,04	2,80	0,001264
	1,32	1,28	1,27	1,24	1,21				
№ 5	1,18	1,17	1,21	1,20	1,18	1,19	0,02	1,36	0,00026
	1,17	1,17	1,22	1,18	1,18				
№ 6	1,32	1,24	1,25	1,24	1,25	1,27	0,04	3,35	0,001812
	1,36	1,29	1,24	1,29	1,23				
№ 7	1,25	1,22	1,28	1,25	1,25	1,24	0,02	1,98	0,000601
	1,23	1,19	1,24	1,25	1,22				
№ 8	3,03	2,94	3,16	2,87	2,97	2,98	0,08	2,66	0,006283
	2,98	2,90	2,97	3,03	3,00				
№ 9	2,80	2,90	2,82	2,75	2,81	2,86	0,09	2,98	0,007248
	2,85	2,89	2,99	2,77	2,99				
№ 10	2,10	2,27	1,96	2,17	2,25	2,13	0,11	5,39	0,013159
	2,14	2,05	2,00	2,05	2,29				
№ 11	2,93	2,87	2,82	2,82	2,84	2,86	0,04	1,30	0,001387
	2,89	2,88	2,87	2,87	2,81				
№ 12	3,11	3,08	3,13	3,06	3,05	3,09	0,05	1,68	0,002694
	3,15	3,00	3,16	3,05	3,07				
№ 13	2,44	2,41	2,51	2,47	2,41	2,44	0,04	1,45	0,001256
	2,41	2,39	2,45	2,45	2,46				
Среднее значение внутригрупповой дисперсии S ² _{вну ср}									0,006478

Таблица 6. Результаты построения калибровочных графиков для метода ВЭЖХ

Значения площадей пиков для стандартных растворов заданных концентраций (мг/мл)			Калибровочные кривые	Коэффициент корреляции кривой
0,0495	0,099	0,1485		
887011,5	1794808	2713623	$y=2E+07x-28131$	R=1
887514,4	1804381	2727759	$y=2E+07x-33693$	R=1
888670	1796131	2714046	$y=2E+07x-25760$	R=1
889227,5	1806942	2730752	$y=2E+07x+32500$	R=1
887923	1795702	2708949	$y=2E+07x+23501$	R=1

Таблица 7. Результаты определения фенола в испытуемых образцах методом ВЭЖХ

Образец	Результаты испытаний за 5 дней					Х _{ср}	S	RSD%	S ² _{вну}
	1	2	3	4	5				
№ 1	2,00	1,99	1,99	2,02	1,98	1,99	0,01	0,75	0,000224544
	2,00	1,99	1,99	2,01	1,97				
№ 2	2,31	2,30	2,31	2,33	2,29	2,31	0,01	0,62	0,000203611
	2,32	2,30	2,30	2,33	2,29				
№ 3	2,62	2,60	2,60	2,63	2,60	2,61	0,01	0,55	0,000202278
	2,62	2,60	2,60	2,63	2,58				
№ 4	1,19	1,19	1,19	1,20	1,18	1,19	0,01	0,58	4,71556E-05
	1,19	1,18	1,18	1,20	1,19				
№ 5	1,16	1,16	1,16	1,17	1,15	1,16	0,01	0,62	5,15111E-05
	1,16	1,15	1,16	1,17	1,15				
№ 6	1,21	1,21	1,20	1,20	1,21	1,21	0,01	0,59	5,09333E-05
	1,21	1,21	1,20	1,20	1,21				
№ 7	1,21	1,21	1,20	1,19	1,21	1,20	0,01	0,70	6,99556E-05
	1,21	1,20	1,20	1,19	1,21				
№ 8	2,33	2,33	2,33	2,33	2,31	2,32	0,01	0,49	0,000130456
	2,32	2,31	2,31	2,34	2,31				
№ 9	2,45	2,44	2,44	2,47	2,44	2,46	0,06	2,59	0,0040636
	2,46	2,44	2,44	2,64	2,43				
№ 10	1,73	1,73	1,72	1,71	1,72	1,73	0,01	0,59	0,000104489
	1,74	1,75	1,72	1,71	1,72				
№ 11	2,67	2,66	2,66	2,68	2,84	2,70	0,07	2,50	0,004563833
	2,67	2,65	2,66	2,68	2,81				
№ 12	2,95	2,93	2,92	2,95	3,05	2,96	0,05	1,79	0,002804989
	2,95	2,93	2,92	2,95	3,07				
№ 13	2,35	2,31	2,31	2,33	2,29	2,31	0,02	0,76	0,000312622
	2,32	2,30	2,31	2,33	2,29				
Среднее значение внутригрупповой дисперсии S ² _{вну ср}									0,000986921

Таблица 8. Сравнительный анализ данных, полученных тремя методами определения фенола

Образец	Средние значения концентраций фенола, полученные колориметрическим методом, мг/мл, Х _{ср1}	Средние значения концентраций фенола, полученные спектрофотометрическим методом, мг/мл, Х _{ср2}	Средние значения концентраций фенола, полученные методом ВЭЖХ, мг/мл, Х _{ср3}	Х _{общ, ср} , мг/мл	S _{ср}	RSD%	S ² _{меж}
№1	2,06	2,08	1,99	2,04	0,04	1,94	0,001574
№2	2,41	2,46	2,31	2,39	0,05	2,17	0,002696
№3	2,56	2,59	2,61	2,59	0,08	3,06	0,006278
№4	1,23	1,27	1,19	1,23	0,03	2,21	0,000739
№5	1,20	1,19	1,16	1,18	0,01	1,26	0,000223
№6	1,25	1,27	1,21	1,24	0,03	2,20	0,000749
№7	1,25	1,24	1,20	1,23	0,02	1,53	0,000353
№8	2,44	2,98	2,32	2,58	0,15	5,76	0,022076
№9	2,60	2,86	2,46	2,64	0,12	4,40	0,013514
№10	1,77	2,13	1,73	1,87	0,12	6,14	0,013255
№11	2,80	2,86	2,70	2,78	0,06	2,23	0,003839
№12	3,04	3,09	2,96	3,03	0,06	1,84	0,003099
№13	2,42	2,44	2,31	2,39	0,04	1,68	0,001616
Среднее значение межгрупповых дисперсий S ² _{меж сред}							0,005385

Из таблицы 5 следует, что стандартное отклонение значений по десяти измерениям для всех исследуемых препаратов не превышает 0,2. Значения коэффициента вариации находятся в границах от 1,3 до 7,77%. Значения концентраций фенола, полученные для каждого препарата, соответствуют требованиям НД на препарат к количественному содержанию фенола (таблица 1). Среднее значение внутригрупповой дисперсии $S_{\text{вну ср}}^2$ для спектрофотометрического метода равно 0,006478.

Для определения фенола методом ВЭЖХ использовали калибровочную характеристику, построенную в диапазоне от 0,0495 до 0,1485 мг/мл из рабочего раствора фенола, концентрации 0,99736 мг/мл (табл. 6).

Результаты определения содержания фенола в испытуемых образцах методом ВЭЖХ представлены в таблице 7.

Из таблицы 7 следует, что стандартное отклонение значений по десяти измерениям для всех исследуемых препаратов не превышает 0,07. Значения коэффициента вариации находятся в границах от 0,49 до 2,59%. Значения концентраций фенола, полученные для каждого препарата, соответствуют требованиям НД на препарат к количественному содержанию фенола (таблица 1). Среднее значение внутригрупповой дисперсии $S_{\text{вну ср}}^2$ для метода ВЭЖХ равно 0,000986921.

Сравнительный анализ результатов, полученных с использованием трех методов определения количества фенола, представлен в таблице 8.

Из таблицы 8 видно, что стандартное отклонение значений полученных тремя методами для всех исследуемых препаратов от 0,01 до 0,15. Максимальное значение коэффициента корреляции равно 6,14%. Среднее значение межгрупповых $S_{\text{вну ср}}^2$ дисперсий равно 0,005385.

Таким образом, критерий Фишера для колориметрического метода равен:

$$F_{\text{кол}} = \frac{0,005385}{0,005125} = 1,05073.$$

Критерий Фишера для спектрофотометрического метода равен:

$$F_{\text{сп}} = \frac{0,005385}{0,006478} = 0,8313.$$

Критерий Фишера для метода ВЭЖХ равен:

$$F_{\text{вэжх}} = \frac{0,005385}{0,000986921} = 5,456.$$

Значения внутригрупповой и межгрупповой степеней свободы равны:

$$v_{\text{меж}} = 3 - 1 = 2, \quad v_{\text{вну}} = 3 \times (13 - 1) = 36.$$

Критическое значение критерия Фишера, найденное по таблице, при доверительной вероятности 0,95, равно: $F_{\text{крит}} = 3,26$.

Сравнительный анализ средних значений стандартных отклонений, коэффициентов вариации и дисперсий для разных методов представлен в таблице 9.

Как следует из таблицы 9, значения стандартного отклонения, коэффициента вариации для метода ВЭЖХ ниже зна-

Таблица 9. Сравнительный анализ показателей точности методов

Метод	$S_{\text{ср}}$	RSD, %	$S_{\text{ср}}^2$
Колориметрический	0,06	2,81	0,005125
Спектрофотометрический	0,07	2,94	0,006478
ВЭЖХ	0,02	1,01	0,0009869

чений, полученных колориметрическим и спектрофотометрическими методами. Значение дисперсии, полученное для метода ВЭЖХ (0,0009869), ниже дисперсий других методов на порядок.

Сравнение расчетных значений критерия Фишера для каждого из методов с табличным (критическим) значением позволяет сделать вывод о статистической незначимости различий значений полученных колориметрическим ($F=1,05$) и спектрофотометрическим ($F=0,8$) методами и, соответственно, их взаимозаменяемости. Критерий Фишера, полученный для результатов определения фенола методом ВЭЖХ ($F=5,5$), выше критического значения, что свидетельствует о статистически значимых различиях значений внутригрупповой дисперсии для метода ВЭЖХ и межгрупповой дисперсии.

Значение внутривидовой дисперсии, полученное для метода ВЭЖХ, свидетельствует о более высокой воспроизводимости данного метода по сравнению с двумя другими и ставит под сомнение возможность его замены. Тем не менее, результаты определения фенола в вакцинах, для которых предусмотрен метод ВЭЖХ (образцы 2 и 3), полученные как колориметрическим, так и спектрофотометрическим методом, соответствуют требованиям НД, а значения стандартного отклонения, коэффициента вариации, внутривидовых дисперсий свидетельствуют об удовлетворительной повторяемости данных методов. Таким образом, необходимо провести дальнейшие исследования возможности использования спектрофотометрического и колориметрического методов определения фенола как альтернативных с применением СО как меры сравнения и СО подтверждения правильности, аттестованных методом ВЭЖХ.

Закключение

Для решения поставленной задачи – оценить возможность взаимозаменяемости методик при определении фенола в различных препаратах ИЛП были проведены исследования с использованием ИЛП различного состава и содержания фенола, в которых тремя различными методами была проведена количественная оценка содержания фенола.

Получены экспериментальные данные сравнительного анализа колориметрического метода, основанного на образовании соединений фенола с аминопиразолоном (4-аминоантипирин) в присутствии феррицианида калия; спектрофотометрического метода, основанного на способности фенола к поглощению в УФ-области и метода ВЭЖХ, основанного на выделении фенола и детектировании поглощения УФ-излучения.

Поскольку средние значения определения фенола для каждого из образцов (табл. 3, 5, 7) соответствовали требованиям нормативных документов, каждый из использованных методов пригоден для оценки содержания фенола во всех указанных ИЛП.

Однофакторный дисперсионный анализ результатов испытаний свидетельствует об отсутствии статистически значимых различий групп значений, полученных колориметрическим и спектрофотометрическими методами.

Воспроизводимость результатов определения фенола, полученных методом ВЭЖХ, статистически значимо выше воспроизводимости колориметрического и спектрофотометрического методов (табл. 9).

Поскольку исследования проводили с использованием одного материала для получения стандартных растворов, необходимо, при возможной замене метода использовать тот же подход и, для повышения точности испытаний, провести аттестацию стандартных образцов содержания фенола, как для приготовления калибровочных растворов, так и для подтверждения правильности воспроизведения методик.

Кроме того, необходимо проанализировать возможность рассмотрения спектрофотометрического и колориметрического методов в качестве альтернативных методу ВЭЖХ при условии использования аттестованных СО.

Выводы

1. Методы спектрофотометрический и колориметрический взаимозаменяемы, поскольку обладают одинаковой точностью и воспроизводимостью.

2. Метод ВЭЖХ является более точным и воспроизводимым и может быть использован как в качестве альтернативного метода оценки фенола, так и при аттестации СО для приготовления калибровочных растворов.

3. Для повышения точности испытаний необходимо провести аттестацию стандартных образцов содержания фенола для приготовления калибровочных растворов и для подтверждения правильности воспроизведения методик.

Литература:

1. Крамаренко ВФ. Токсикологическая химия. Киев: Выща школа; 1989.
2. Научное обоснование методов оценки качества, эффективности и безопасности иммунобиологических лекарственных препаратов и их стандартизация: отчет о НИР (заключительный). ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. М.; 2014. № ГР 01201275293. Деп. в ЦИТИС 05.05.2015. № ИКРБС 215050570010.
3. Рунова ОБ, Волкова РА. Методы качественного и количественного определения фенола и его производных в биологических средах. Клиническая лабораторная диагностика 1996; (5): 15–9.
4. Рунова ОБ, Волкова РА. Количественное определение фенола в аллергенах и вакцинах методом газожидкостной хроматографии. Клиническая лабораторная диагностика 2000; (7): 12–4.
5. Об обеспечении единства измерений. Федеральный закон № 102-ФЗ от 27.08.2008 г.
6. ГОСТ 8.532-2002. Стандартные образцы состава и свойств материалов. Межлабораторная метрологическая аттестация.
7. Волкова РА, Фадеева СВ, Мовсесянц АА, Борисевич ИВ. Опыт Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича по разработке и аттестации медицинских иммунобиологических препаратов. Стандартные образцы 2011; (4): 17–21.
8. Борисевич ИВ, Петухов ВГ, Волкова РА, Устинникова ОБ, Фадеева СВ, Малкова ВИ. Стандартные образцы как средство метрологического обеспечения аналитических методов контроля медицинских иммунобиологических препаратов. Биопрепараты 2010; 4(40): 8–10.
9. Волкова РА. Проблемы метрологического обеспечения методик оценки качества иммунобиологических препаратов. В кн.: I Международная конференция «Стандартные образцы в измерениях и технологиях». Сб. трудов. Ч. 1. Екатеринбург; 2013. С. 88–90.
10. Волкова РА, Фадеева СВ, Борисевич ИВ, и др. Оценка состояния образцов медицинских иммунобиологических препаратов. Стандартные образцы 2013; (3): 58–61.
11. Фенол в иммунных сыворотках и вакцинах. В кн.: European Pharmacopoeia. 7th edition. T. 1. M.; 2011. С. 183.
12. Волкова РА, Гавриленкова ВЮ, Каргина ТМ, Штанчаева СМ, Конду ЭИ, Эльберт ЕВ, Рунова ВФ, Блоха ВВ, Черняховская ИВ. Физико-химические, химические, физические и иммунохимические методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов. Фармакопейная статья. ФС 42-3874-99. М.; 1999.
13. Волкова РА, Каргина ТМ, Гавриленкова ВЮ, Рунова ВФ. Способ определения фенола в аллергенах. Авторское свидетельство № 989410 от 14 сентября 1982 г.

14. Рунова ВФ, Гавриленкова ВЮ, Максимова ГА, Черняховская ИВ, Волкова РА, Конду ЭИ. Методические указания по применению физико-химических и химических методов контроля медицинских биологических препаратов. М.; 1982.
15. Жидкостная хроматография. В кн.: European Pharmacopoeia. 7th edition. T. 1. M.; 2011. С. 54.
16. Гланц СА. Медико-биологическая статистика. М.: Практика; 1999.
17. Карташов ИН, Рудяк ЮВ. Основы математического анализа и теории вероятностей. Учебное пособие. М.: МГУП; 2006.

References

1. Kramarenko VF. Toxicological Chemistry. Kiev: Vyscha shkola; 1989 (in Russian).
2. Scientific substantiation of methods for assessing the quality, efficacy and safety of immunobiological medicines and their standardization: research report (final). FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of the Russian Federation. Moscow; 2014. № GR 01201275293. Dep. in CITIS 05.05.2015. IKRBS № 215050570010 (in Russian).
3. Runova OB, Volkova RA. Methods for qualitative and quantitative determination of phenol and its derivatives in biological fluids. Klinicheskaya i laboratornaya diagnostika 1996; (5): 15–9 (in Russian).
4. Runova OB, Volkova RA. Quantitative determination of phenol in vaccines and allergens by gas-liquid chromatography. Klinicheskaya i laboratornaya diagnostika 2000; (7): 12–4 (in Russian).
5. On ensuring the uniformity of measurements. Federal Law № 102-FZ, 27.08.2008 (in Russian).
6. State Standard 8.532-2002. Reference materials of composition and properties of materials. Interlaboratory metrological certification (in Russian).
7. Volkova RA, Fadeyeva SV, Movsesyants AA, Borisevich IV. The experience of the L.A. Tarasevich State Research Institute of Standardization and Control of Medical Biological Preparations in the development and certification of medical immunobiological preparations. Standartnye obraztsy 2011; (4): 17–21 (in Russian).
8. Borisevich IV, Petukhov VG, Volkova RA, Ustinnikova OB, Fadeyeva SV, Malkova VI. Standard samples as a tool to provide metrology of analytical methods of immunobiological medicines (IM) monitoring. Biopreparaty 2010; 4(40): 8–10 (in Russian).
9. Volkova RA. Problems of metrological support methodologies for assessing the quality of immunobiological preparations. In: I International Conference «Reference materials and measurement technology». Collection of works. Part 1. Ekaterinburg; 2013. P. 88–90 (in Russian).
10. Volkova RA, Fadeyeva SV, Borisevich IV, et al. Assessment of the problem of certification and application of industry standard samples of medical immunobiological preparations. Standartnye obraztsy 2013; (3): 58–61 (in Russian).
11. Phenol in immune sera and vaccines. In: European Pharmacopoeia. 7th edition. V. 1. Moscow; 2011. P. 183 (in Russian).
12. Volkova RA, Gavrilenkova VYu, Kargina TM, Shtanchaeva SM, Kondu EI, Elbert EV, Runova VF, Bloha VV, Chernyahovskaya IV. Physical-chemical, chemical, physical, and immunochemical methods of control of medical immunobiological preparations. Pharmacopoeial article. FS 42-3874-99. Moscow; 1999 (in Russian).
13. Volkova RA, Kargina TM, Gavrilenkova VYu, Runova VF. A method for determining phenol allergens. Copyright certificate № 989410, 14.09.1982 (in Russian).
14. Runova VF, Gavrilenkova VYu, Maksimova GA, Chernyahovskaya IV, Volkova RA, Kondu EI. Guidelines on the application of physical-chemical and chemical methods of control of medical biological products. Moscow; 1982 (in Russian).
15. Liquid chromatography. In: European Pharmacopoeia. 7th edition. V. 1. Moscow; 2011. P. 54 (in Russian).
16. Glants SA. Biomedical statistics. Moscow: Praktika; 1999 (in Russian).
17. Kartashov IN, Rudyak YuV. Basics of mathematical analysis and probability theory. Tutorial. Moscow: MGUP; 2006 (in Russian).

Authors:

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre on Expert Evaluation of Medical Application Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 8 Petrovsky Boulevard, Moscow, 127051, Russian Federation.

Kolesnikova ON. 2st category expert of Laboratory of Biochemistry of medical immunobiological preparations of Test Center of Quality Expertise of medical immunobiological preparations.

Korotkov MG. Leading expert of Laboratory of Biochemistry of medical immunobiological preparations of Test Center of Quality Expertise of medical immunobiological preparations.

Malkova VI. 1st category expert of Laboratory of Biochemistry of medical immunobiological preparations of Test Center of Quality Expertise of medical immunobiological preparations. Candidate of Biological Sciences.

Runova OB. Leading expert of Laboratory of Biochemistry of medical immunobiological preparations of Test Center of Quality Expertise of medical immunobiological preparations. Candidate of Chemical Sciences.

Ustinnikova OB. Head of Laboratory of Biochemistry of medical immunobiological preparations of Test Center of Quality Expertise of medical immunobiological preparations. Candidate of Biological Sciences.

Kimov VI. Deputy director of Center of planning and coordination of scientific research. Candidate of Medical Sciences.

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 126051, Москва, Петровский бульвар, 8.

Колесникова Оксана Николаевна. Эксперт 2-й категории лаборатории биохимии МИБП Испытательного центра экспертизы качества МИБП.

Коротков Михаил Геннадьевич. Ведущий эксперт лаборатории биохимии МИБП Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Малкова Виктория Игоревна. Эксперт 1-й категории лаборатории биохимии МИБП Испытательного центра экспертизы качества МИБП.

Рунова Ольга Борисовна. Ведущий эксперт лаборатории биохимии МИБП Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. хим. наук.

Устинникова Ольга Борисовна. Начальник лаборатории биохимии МИБП Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Климов Владимир Иванович. Заместитель директора Центра планирования и координации научно-исследовательских работ, канд. мед. наук.

Адрес для переписки: Колесникова Оксана Николаевна; Kolesnikova@exrmed.ru

Поступила 26.10.2015 г.

Принята 06.11.2015 г.