

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения России

На правах рукописи

Колесникова Оксана Николаевна

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

1.5.6 Биотехнология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Кандидат биологических наук
Устинникова Ольга Борисовна

Москва - 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Актуальность темы исследования.....	4
Степень разработанности темы исследования.....	7
Цель и задачи исследования.....	8
Научная новизна.....	9
Теоретическая и практическая значимость работы.....	11
Методология и методы исследования.....	13
Материалы исследования.....	13
Методы исследования.....	17
Хроматографические методы	17
Метод элементного анализа.....	17
Спектрофотометрические и колориметрические методы.....	17
Валидация разработанных методик.....	18
Статистические методы исследования.....	18
Личное участие автора в получении результатов.....	22
Основные положения диссертации, выносимые на защиту.....	22
Степень достоверности и апробация результатов.....	23
ГЛАВА 1 Обзор литературы.....	25
1.1. Консерванты в иммунобиологических лекарственных препаратах.....	25
1.1.1. Технологии производства вакцин и анатоксинов и необходимость применения консервантов.....	35
1.1.2. Технологии производства аллергенов и необходимость применения консервантов.....	37
1.2. Анализ состояния методической базы количественного определения консервантов в ИЛП.....	40
1.3. Требования к разработке и стандартизации аналитических методов контроля качества лекарственных средств.....	45
1.3.1. Требования к аккредитованным лабораториям. Внутрिलाбораторный	

контроль качества как часть системы менеджмента качества. Стандартные образцы.....	48
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	51
ГЛАВА 2. Разработка и стандартизация методик количественного определения фенола в ИЛП.....	51
2.1. Разработка и валидация методики количественного определения фенола в ИЛП методом ГЖХ.....	51
2.2. Разработка и валидация методики определения фенола в ИЛП методом ВЭЖХ.....	80
2.3. Аттестация стандартных образцов содержания фенола в ИЛП. Оценка сопоставимости результатов, полученных спектрофотометрическим, ВЭЖХ и ГЖХ методами.....	98
2.4. Резюме.....	104
ГЛАВА 3. Разработка и стандартизация методики определения тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах методом ААС ХП.....	106
3.1. Разработка и валидация методики определения тиомерсала в ИЛП	106
3.2. Аттестация стандартного образца содержания тиомерсала в ИЛП. Оценка сопоставимости результатов, полученных с применением колориметрической и ААС ХП методик.....	135
3.3. Резюме.....	137
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	139
ВЫВОДЫ.....	149
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	151
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	152
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	153
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	156
БЛАГОДАРНОСТИ.....	185

ВВЕДЕНИЕ

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 [36].

При производстве иммунобиологических лекарственных препаратов часто используют консерванты, что обусловлено особенностями действующих компонентов препаратов, технологии производства и формы выпуска. К таким особенностям можно отнести: использование многодозовой упаковки; невозможность термической стерилизации продукции из-за опасности инактивации или разрушения действующего вещества; необходимость использования дополнительного инактивирующего агента при тепловой инактивации; необходимость обеспечения микробиологической чистоты антигена на промежуточных стадиях производства; мутность препарата, обусловленная природой действующего вещества или наличием адьюванта; применение консерванта в качестве стабилизатора основного компонента [102, 206].

Возможность использования консервантов подтверждена международными и отечественными нормативными документами (Европейская фармакопея раздел «Вакцины для медицинского применения», ВОЗ «Глобальная безопасность вакцин», FDA «Thimerosal and Vaccines», ГФ РФ ОФС 1.7.1.0001.15 «Аллергены», ОФС 1.7.1.0004.15 «Вакцины и анатоксины» и т.д.). Поскольку в качестве консервантов, как правило, используют вещества, обладающие токсичным действием, диапазон концентраций, обеспечивающий эффективность и безопасность их применения, регламентируется фармакопейными требованиями [21, 28, 102, 111].

Согласно N 61-ФЗ "Об обращении лекарственных средств" соответствие установленным требованиям нормативной документации является необходимым критерием оценки качества иммунобиологических лекарственных препаратов [36].

В состав иммунобиологических лекарственных препаратов зарегистрированных в Российской Федерации, в качестве консервантов входят тиомерсал, фенол и 2-феноксиэтанол [29].

Тиомерсал (мертиолят) - ртутьорганическое соединение - входит в состав некоторых вакцин против гепатита В, гриппозных вакцин, АКДС-вакцин, анатоксинов, и некоторых комбинированных вакцин. Требования к содержанию тиомерсала в указанных препаратах колеблются в диапазоне 30,0 - 120,0 мкг/мл [28].

В состав полисахаридных вакцин (моно- и поливалентных), пептидогликановых вакцин, аллергенов (инфекционных и неинфекционных), содержится фенол, в диапазоне 1,5 - 4,0 мг/мл [21, 28].

Зарубежные производители в качестве консерванта используют аналог фенола, его производное 2-феноксиэтанол, который содержится ряде комбинированных вирусных вакцин, вакцин против гепатита А и полиомиелита, в диапазоне от 4,25-6,6 мг/мл [29, 111].

Методическая база оценки содержания консервантов, формировалась одновременно с разработкой и внедрением в практику здравоохранения соответствующих иммунобиологических лекарственных препаратов. Фармакопейными методиками являются колориметрическая методика в реакции с дитизоном для определения тиомерсала, спектрофотометрическая методика для определения фенола и колориметрическая методика определения фенола [19, 23, 106].

В настоящее время, широкое внедрение в лабораторную практику высокотехнологичного оборудования позволяет разрабатывать качественно новые оригинальные методики, обладающие большей специфичностью,

чувствительностью, правильностью и прецизионностью, что отвечает современным требованиям системы менеджмента качества (СМК), основанной на принципах надлежащей лабораторной практики (GLP) [10, 12].

Следствием данного подхода является наличие в нормативной базе нескольких принципиально отличающихся способов оценки одного консерванта, что приводит к необходимости стандартизации и оценке сопоставимости методик [5, 29].

Внутрилабораторный контроль качества (ВКК) – одна из составляющих системы менеджмента качества, его осуществление является одним из условий компетенции испытательных лабораторий [12]. Инструментом для осуществления внутрилабораторного контроля качества могут служить стандартные образцы (СО) содержания исследуемого вещества для контроля стабильности воспроизведения методик количественного химического анализа [4, 6]. Наличие стандартных образцов, дает существенное преимущество для внутрилабораторного контроля качества и возможность использования новых методик в работе аккредитованных лабораторий [14, 17].

Международные стандарты надлежащей лабораторной практики представляют собой систему высоких требований к методикам лабораторного контроля качества, а именно, селективности, точности и воспроизводимости результатов [12, 15, 16]. Наиболее доступными и востребованными, являются методики, основанные на методах газожидкостной и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ГЖХ и ВЭЖХ), и атомно-абсорбционной спектрометрии (ААС).

Таким образом, оптимизация количественной оценки консервантов в иммунобиологических лекарственных препаратах, включающая разработку методик на основе высокотехнологичных методов идентификации веществ и количественного химического анализа, валидацию методик и оценку сопоставимости результатов в сравнении с фармакопейными методиками, а

так же разработку и аттестацию стандартных образцов для контроля стабильности проведения испытаний, 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-Zэта, 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 [22, 48].

Традиционной методикой определения фенола в иммунобиологических лекарственных препаратах является спектрофотометрический метод, разработанный в ФГУН Государственном научно-исследовательском институте стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А.Тарасевича Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (патент 989410) [38] и изложенный в Государственной фармакопее Российской Федерации [23]. Альтернативой данной методике, является колориметрическая методика, изложенная в Европейской фармакопее и, как правило, используемая зарубежными производителями [106].

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 [39, 40, 41].

Работы по исследованию возможности использования метода газовой хроматографии для количественного определения фенола в биологических лекарственных препаратах проводились на аппарате Fisons 8000 (Великобритания) в ФГУН Государственном научно-исследовательском институте стандартизации и контроля медицинских биологических

препаратов им. Л.А.Тарасевича Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека [46].

Так как для использования современных моделей приборов и капиллярных хроматографических колонок вышеперечисленные разработки не актуальны, возникает необходимость в новых методах, отвечающих требованиям актуальных на текущий момент оснащения в области атомно-абсорбционной спектрометрии и газожидкостной хроматографии.

Таким образом, создание новых унифицированных методик, на базе хроматографических и атомно-абсорбционных методов анализа, позволяющих количественно определять содержание консервантов в различных группах иммунобиологических лекарственных препаратах, представляется актуальной задачей.

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 спектрометрии (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 \times 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 \times 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 спектрометрии 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 ИЛП методом ВЭЖХ 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 ИЛП методом ААС ХП 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 спектрометрии 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 спектрометрии холодного пара внедрена в практическую деятельность ФГУП Санкт-Петербургского научно-исследовательского института ФМБА России (акт внедрения от 13.03.2017).

Методология и методы исследования

Методология исследования спланирована в соответствии с поставленной целью.

Предметом исследования являются препараты вакцин и аллергенов, содержащих в составе консерванты тиомерсал, фенол. Исследования проводились в соответствии с поставленными задачами: разработка и валидация методик газожидкостной хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии для количественного определения фенола в иммунобиологических лекарственных препаратах; разработка и валидация методики атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара (ртути) для количественного определения тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах; анализ сопоставимости результатов, полученных с применением фармакопейных и разработанных методик; разработка фармакопейных стандартных образцов для контроля стабильности количественного определения фенола и тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах. 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, ОФС.1.1.0013.15 ГФ РФ и International Council for Harmonisation [22, 26, 47, 137, 138, 139]. Сопоставимость результатов фармакопейных и разработанных методик оценивали на репрезентативных выборках с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Фармакопейные стандартные образцы аттестованы в соответствии с требованиями руководящих отечественных и международных документов [20, 45, 229, 230].

Материалы исследования

В работе использовали следующие материалы и реактивы:

Образцы иммунобиологических лекарственных препаратов, содержащих фенол в качестве консерванта, в пределах концентраций от 1,5 до 4,5 мг/мл:

1. Образец 1 - вакцина пневмококковая поливалентная полисахаридная «Пневмо 23», производства «Санофи Пастер», Франция.
 2. Образцы 2 и 3 - вакцина пневмококковая полисахаридная «Пневмовакс 23», производство MSD Польша, (флаконы) и (шприцы) соответственно.
 3. Образец 4 и 5 - вакцина брюшнотифозная полисахаридная «Вианвак», производства «Гритвак».
 4. Образцы 6 и 7 - вакцина липополисахаридная «Шигеллвак», производства «Гритвак».
 5. Образец 8 - аллерген пыльцы орешника, производство «НПО «Микроген», «Ставрополь».
 6. Образец 9 - микст-Аллерген пыльцы луговых трав, производство «НПО «Микроген», «Ставрополь».
 7. Образец 10 - Н-ал весенняя смесь ранняя, производство «Севафарма» а.о., Чешская республика.
 8. Образцы 11 и 12 - разводящая жидкость для аллергенов, производство «Микроген» г.Ставрополь.
 9. Образец 13 - туберкулезный аллерген «Диаскинтест», производство «Генериум», Россия.
- Образец, содержащий 2-феноксиэтанол от 2 до 3 мг в дозе и формальдегида от 10,0 до 15,0 мкг в дозе.
10. Образец 14: «Полимилекс» Билтховен Биллоджикалз Б.В., Нидерланды.
- Образцы ИЛП, содержащих тиомерсал в качестве консерванта, в пределах концентраций от 75 до 115 мкг/мл:
11. Образец 15: АКДС-вакцина, производства АО «НПО «Микроген», Россия, количество серий 6.
 12. Образец 16: АС-анатоксин, АО «НПО «Микроген» количество серий 6.
 13. Образец 17: АДС-М-анатоксин, АО «НПО «Микроген» количество серий 4.

14. Образец 18: Анатоксин стафилококковый, ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН (филиал «Медгамал») количество серий 4.
15. Образец 19: АД-анатоксин, АО «НПО «Микроген» количество серий 4.
16. Образец 20: АД-М-анатоксин, АО «НПО «Микроген» количество серий 4.
17. Образец 21: Бубо-Кок (вакцина для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша и гепатита В), ЗАО МПК «Комбиотех» количество серий 2.
18. Образец 22: АКДС-гепВ - бесконсервантная форма производство АО «НПО «Микроген» количество серий 3.
19. Образец 23: АКДС бесконсервантная форма, АО «НПО «Микроген» количество серий 2.
20. Образец 24: Тетраанатоксин, АО «НПО «Микроген» количество серий 1.
21. Образец 25: АКДС-гепВ, АО «НПО «Микроген» количество серий 1.
22. Образец 26: «Совигрипп», АО «НПО «Микроген» количество серий 1.
23. Образец 27: «Ультрикс», ФГУП СБНИИВС ФМБА России количество серий 1.
24. Образец 28: «Гриппол», АО «НПО «Микроген» количество серий 12.
25. Образец 29: «Гриппол», ФГУП СБНИИВС ФМБА России количество серий 3.
26. Образец 30: Полуфабрикат препарата «Гриппол» производства СБНИИВС, количество серий 1.
27. Образец 31: Субстанция коклюшная безмертиолятная производства ФГБУ «НПО «Микроген», количество серий 1.
28. Кандидат в ФСО содержания фенола — разводящая жидкость для неинфекционных аллергенов АО «НПО «Микроген», Россия;
29. Фармакопейный стандартный образец ФСО 3.1.00427 Содержания мертиолята в сорбированных препаратах;

30. Модельная смесь 1: образец 21 (АКДС-гепВ-вакцина - бесконсервантная форма, содержащая формальдегид до 200 мкг/мл) с добавкой фенола до концентрации 1,5 мг/мл и 2-феноксиэтанола до концентрации 0,2 мг/мл;
31. Модельная смесь 2: образец 21 (АКДС-гепВ-вакцина - бесконсервантная форма, содержащая формальдегид до 200 мкг/мл) с добавкой 2-феноксиэтанола до концентрации 3 мг/мл;
32. Модельная смесь 3: образец 22 АКДС-вакцина - бесконсервантная форма, содержащая формальдегид до 200 мкг/мл - с добавкой 2-феноксиэтанола и фенола до концентраций 0,2 мг/мл;
33. Модельная смесь 4: образец 15 АКДС-вакцина, содержащая тиомерсал в концентрации от 85 до 115 мкг/мл и формальдегид до 200 мкг/мл с добавкой фенола до концентраций 1,5 мг/мл и 2-феноксиэтанола до концентрации 1,5 мг/мл.

Реактивы и стандарты:

1. 2-феноксиэтанол Sigma-aldrich A4362
2. 4-аминоантипирин Sigma-aldrich A4362
3. Ацетонитрил Fisher Chemical кат. A/0627/17
4. Бензиловый спирт Sigma-Aldrich, кат. № 77699
5. Гидроксиламина сульфат Sigma-aldrich кат. 210250
6. Гидроксиламина хлорид Merck 1.04616
7. ГСО ионов ртути 8004-93
8. Дитизон Sigma-aldrich кат. 43820
9. Калия гексацианоферрат Merk 1.04973
10. Калия дигидрофосфат Sigma-aldrich P0662
11. Калия перманганат Acros 44721
12. Кислота серная Merck 1.00732
13. Кислота уксусная Sigma-aldrich кат. A6283
14. Кислота хлористоводородная Merck 1.00317
15. Натрия бикарбонат Sigma-aldrich S5761

16. Натрия карбонат Merk 1.06392
17. Олова хлорид Roch кат. 4977.1
18. Стандарт ионов ртути для ААС Perkin Elmer №9300253
19. Тиомерсал Sigma-aldrich кат. T4687
20. Фенол Fischer Scientific кат № A931
21. Фенол Sigma aldrich кат № P1037
22. Хлористоводородная кислота Acros 124620010
23. Хлороформ Merk 1.02442.1000
24. Этанол 96% ООО «Гатчинский спиртовой завод»

Методы исследования

Хроматографические методы

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.

Метод элементного анализа

Определение тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах методом атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара ртути

Исследования проводили в соответствии с разработанной в рамках настоящей работы методикой.

Спектрофотометрические и колориметрические методы

Спектрофотометрический метод определения фенола в иммунобиологических лекарственных препаратах

Для сравнительных испытаний определения фенола и при аттестации фармакопейных стандартных образцов содержания фенола использовалась спектрофотометрическая методика, описанная в Государственной Фармакопее Российской Федерации [23].

Колориметрический метод определения фенола в иммунобиологических лекарственных препаратах

Для сравнительных испытаний определения фенола использовалась колориметрическая методика, в соответствии с монографией 2.5.15 Европейской фармакопеи [106].

Колориметрическая методика определения тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах в реакции с дитизоном

Для сравнительных испытаний определения тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах и при аттестации фармакопейного стандартного образца использовалась колориметрическая методика, описанная в Государственной Фармакопее Российской Федерации [19].

Детектирование проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Shimadzu, производства Япония), с программным обеспечением UVProbe, версия 2.52 (производства Shimadzu, Япония).

Валидация разработанных методик

Валидацию методик проводили в соответствии с ОФС 1.1.0012.15. Государственной Фармакопее Российской Федерации и рекомендациями по валидации аналитических методик International Council for Harmonisation [22, 26, 137, 138, 139].

Статистические методы

Для обработки полученных результатов использовали общепринятые статистические методы [9,27, 50, 93].

Среднее арифметическое (\bar{x}) [9]:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (1)$$

Стандартное отклонение (S) [9]:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (2)$$

Относительное стандартное отклонение (RSD %) [9]:

$$RSD = \frac{S * 100}{\bar{x}} \quad (3)$$

Линейность методики оценивали, рассчитывая отклонение расчетных значений Y_i от экспериментальных величин y_i при помощи расчета критерия Стьюдента по формуле [50]:

$$t = \frac{|y_i - Y_i|}{SD_0 \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(Y_i - \bar{y})^2}{(n - 1)SD_y^2}}} \quad (4)$$

где:

$$SD_0 = \sqrt{\frac{\sum (y_i - Y_i)^2}{n - 2}} \quad (5)$$

$$SD_y = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n - 1}} \quad (6)$$

$$\bar{y} = \frac{\sum y_i}{n} \quad (7)$$

Правильность методики подтверждали, рассчитывая доверительные интервалы отклонений для коэффициентов а и b регрессионной зависимости экспериментальной концентрации от теоретической по формулам [50, 93]:

$$S_0^2 = \frac{\sum_1^n y_i^2 - a \sum_1^n y_i - b \sum_1^n x_i y_i}{f} \quad (8)$$

$$f = n - 2 \quad (9)$$

$$S_b^2 = \frac{ns_0^2}{n \sum_1^n x_i^2 - (\sum_1^n x_i)^2} \quad (10)$$

$$S_a^2 = \frac{s_b^2}{n} \sum_1^n x_i^2 \quad (11)$$

$$S_b = \sqrt{S_b^2} \quad (12)$$

$$S_a = \sqrt{S_a^2} \quad (13)$$

$$\Delta b = t(P, f) S_b \quad (14)$$

$$\Delta a = t(P, f) S_a \quad (15)$$

Тест Фишера использовали для определения влияния на результаты систематической ошибки методики [50, 93]:

$$F(P, f_1 = N - 1, f_2 = N - 2) = \frac{S_{0_1}^2 (N - 1) - S_{0_2}^2 (N - 2)}{S_{0_2}^2 (N - 2)} \quad (16)$$

- коэффициенты $S_{0_1}^2$ и $S_{0_2}^2$ - дисперсии значений без учета и с учетом коэффициента сдвига соответственно:

$$S_{0_1}^2 = \frac{(\sum y_i^2 - b \sum x_i y_i)}{(N - 1)} \quad (17)$$

$$S_{0_2}^2 = \frac{(\sum y_i^2 - a \sum y_i - b \sum x_i y_i)}{(N - 2)} \quad (18)$$

Стабильность количественного содержания фенола в образцах кандидата в ФСО оценивали, по критерию Стьюдента t [9]:

$$t(P, f) = \frac{X_1 - X_2}{\frac{S_1^2}{n} + \frac{S_2^2}{n}} \quad (19)$$

$$f = 2(n - 1) \quad (20)$$

Однородность дозирования кандидата в ФСО определяли по первому показателю приемлемости (AV) [27].

$$AV = |M - \bar{X}| + k \times S, \text{ где } k(P, f = n - 1) \quad (21)$$

Однофакторный дисперсионный анализ методом Фишера использовали для определения оценки сопоставимости результатов, полученных разными методами [9]:

$$F = \frac{S_{\text{меж ср}}^2}{S_{\text{вну ср}}^2} \quad (22)$$

где:

$$S_{\text{вну}}^2 = \frac{S_1^2 + S_2^2}{2} \quad (23)$$

$$S_{\text{меж}}^2 = nS_{\bar{x}}^2 \quad (24)$$

Внутригрупповую и межгрупповую степени свободы рассчитывали по формулам:

$$V_{\text{вну}} = n \times (m - 1) \quad (25)$$

$$V_{\text{меж}} = n - 1 \quad (26)$$

Для оценки правильности методик рассчитывали величину степени извлечения R (recovery, %) и отклонение степени извлечения от 100% (E):

$$R = \frac{100 \times y_i}{x_i} \quad (27)$$

$$E = \frac{100 \times (y_i - x_i)}{x_i} \quad (28)$$

Диапазон аттестованного значения фармакопейных стандартных образцов ΔX вычисляли как $\pm 2S$ от среднего значения:

$$\Delta X = X_{\text{ср}} \pm 2S \quad (29)$$

Для статистической обработки применяли: Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft, США).

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 спектрометрии 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 спектрометрии холодного пара позволяет проводить контроль качества иммунобиологических лекарственных препаратов по показателю "Тиомерсал" на высоком технологическом уровне.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обеспечивается большим объемом полученных данных. Статистической обработкой полученных данных с применением общепринятых методов статистического анализа, материалами по валидации и результатами сравнительных исследований. Исследования проводили в аккредитованной лаборатории на прошедшем квалификацию и метрологическую поверку оборудовании. Для сравнительной оценки результатов испытаний применялись фармакопейные методы.

Результаты диссертационной работы получены при выполнении государственных заданий Федерального Государственного Бюджетного учреждения «Научный Центр Экспертизы Средств Медицинского применения» 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, № госрегистрации 01201275293 (акт внедрения результатов НИР от 28.12.2017 г.);

- Совершенствование системы разработки и применения стандартных образцов, предназначенных для оценки качества, эффективности и безопасности лекарственных средств, № госрегистрации 115111740007 (акт внедрения результатов НИР от 28.12.2017 г.);

- Научное обоснование перспективных направлений совершенствования иммунобиологических лекарственных препаратов, предназначенных для иммунопрофилактики инфекционных болезней, № госрегистрации АААА-А18-118021590046-9 (акт внедрения результатов НИР от 13.12.2019 г.);

-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); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием: «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы» (Москва 2019).

ГЛАВА 1. Обзор литературы

1.1. Консерванты в иммунобиологических лекарственных препаратах

Иммунобиологические лекарственные препараты (ИЛП) - лекарственные препараты, предназначенные для формирования активного или пассивного иммунитета, диагностики наличия иммунитета или диагностики специфического приобретенного изменения иммунологического ответа на аллергизирующие вещества. К ИЛП относят вакцины, анатоксины, токсины, сыворотки, иммуноглобулины и аллергены [36].

Ряд ИЛП, таких как аллергены, вакцины и анатоксины, имеет в составе консерванты, которые, в свою очередь, оказывая бактерицидный и бактериостатический эффект, обеспечивают стерильность ИЛП для безопасности их применения [53, 84, 111, 121].

Необходимость использования консервантов обусловлена следующими факторами:

- использование мультидозных контейнеров [123];
- невозможность стерилизации продукции, в том числе терминальной стерилизации (температура и /или стерилизующая фильтрация) из-за опасности инактивации и/или удаления действующего вещества;
- необходимость обеспечения микробиологической чистоты антигена на промежуточных стадиях производства, как например, при культивировании вируса гриппа на куриных эмбрионах;
- для дополнительной инактивации биомассы в процессе тепловой обработки, как например, при инактивации коклюшной биомассы;
- мутность, обусловленная природой действующего вещества препарата или наличием адьюванта, что препятствует визуальному выявлению контаминации;
- необходимость стабилизации активного компонента препарата (например, коклюшного компонента) [102, 206].

Вначале 20-го столетия бактериальная контаминация вакцин в мультидозовой упаковке, вызванная несоблюдением антисептических условий при вакцинации, стала причиной череды трагических событий. Так, в 1916 году в Колумбии вакцинация детей тифозной вакциной, хранящейся при комнатной температуре, стала причиной 68 тяжелых реакций, 26 абцессов и 4 смертельных случаев. Еще один инцидент произошел в Квинсленде в Австралии в 1928 году, когда в результате иммунизации контаминированной дифтерийной вакциной погибло 12 из 21 вакцинированного ребенка [60]. В настоящее время использование консервантов при производстве ИЛП подтверждено международными и отечественными нормативными документами (Европейская фармакопея раздел «Вакцины для медицинского применения», ВОЗ «Глобальная безопасность вакцин», FDA «Thimerosal and Vaccines», ГФ РФ ОФС 1.7.1.0001.15 «Аллергены», ОФС 1.7.1.0004.15 «Вакцины и анатоксины» и т.д.) [21, 28, 102, 111].

В качестве консервантов в биологических препаратах наиболее часто используют такие вещества, с бактерицидным действием как фенол, 2 - феноксиэтанол и тиомерсал. В частных случаях производственной практики ИЛП, помимо перечисленных веществ, в качестве консервантов могут применяться другие вещества, обладающие антимикробными свойствами, например, производное фенола - м-крезол.

Фенолы – природные органические соединения, относящиеся к классу ароматических спиртов. Впервые фенол был выделен в 1834 году из каменноугольной смолы немецким химиком Фердинандом Рунге (Ferdinand Runge), назвавшем выделенное вещество карболовой (т.е. каменноугольной) кислотой. Чистый фенол был впервые получен французским химиком Огюстом Лораном (Auguste Laurent) в 1836 году. В 1842 году Лоран сумел определить формулу фенола (C_6H_5OH), состоящую из бензольного кольца и гидроксигруппы - OH. В 1843 году французский химик Шарль Герхардт ввел

название «фенол», производное от слова «фон» - прежнего названия бензола, придуманного в 1836 году Огюстом Лораном [60].

Фенолы и их производные являются природными эндогенными антиоксидантами в растительных и животных клетках. Производные фенолов содержатся в растительных маслах, в небольших количествах фенолы присутствуют практически во всех плодах растений. Человек получает в сутки с пищей около 50 мг фенолов, которые полностью утилизируются *in vivo*. Возможно фенолы, поступающие с пищей, используются для биосинтеза некоторых коферментов [3]. Известно, что фенольная гидроксильная группа бензольного кольца тирозина обуславливает его ведущую роль в ферментативной активности белков и ее регуляции, поскольку именно фенольный гидроксил определяет сайт взаимодействия с ферментами - протеинкиназами [3, 34, 42, 49].

Тем не менее, фенолы относятся к ядовитым веществам II класса опасности. Одноатомные фенолы являются нервными ядами, действующими на центральную нервную систему, могут оказывать сильное прижигающее и раздражающее действие на кожу, а также проникать в организм через неповрежденные участки кожи. Пары фенолов способны вызвать отек легких. Многоатомные фенолы являются гемолитическими ядами, при попадании в кровь вызывают образование метгемоглобина эритроцитов, способствуют гемолизу и, как следствие, развитию гемолитической желтухи [3, 83]. Влияние фенола и его производных на эндокринную систему человека, особенно в период ее формирования, является предметом изучения. Существует масса предположений о влиянии фенола и его производных на репродуктивную функцию, ожирение, формирование предрасположенности к онкологическим заболеваниям, диабету, аллергии, респираторным заболеваниям и другим патологиям [58, 66, 75, 113, 120, 140, 154, 155, 164].

Бактерицидные свойства фенолов обусловлены их способностью вызывать денатурацию белка. Кроме того, фенолы, будучи липофильными

соединениями, способны повышать проницаемость клеточных мембран, влиять на внутриклеточные окислительные процессы, приводя к разрушению клеток. Известно, что бактерицидный эффект фенола усиливается при повышении температуры и в кислой среде [2, 3, 34, 49, 83].

В медицине фенол был впервые использован сэром Джозефом Листером (1827—1912) при проведении хирургических операций, что способствовало внедрению асептических методов в хирургии [60].

Сегодня фенол и м-крезол в концентрации 0,1 – 0,5% используют в фармацевтической промышленности в качестве консерванта, в составе лекарственных средств наружного и местного применения (капли, свечи, мази, растворы) [29].

Фенол стал первым консервантом, который начали применять в парентеральных лекарственных препаратах, в том числе ИЛП.

В инфекционных и неинфекционных аллергенах, инактивированных противобактерийных, пептидогликановых, моно- и поливалентных полисахаридных вакцинах, содержание фенола может быть в пределах от 0,15 до 0,4% (или от 1,5 до 4,0 мг/мл) (Таблица 1) [29].

Таблица 1 - ИЛП отечественного и зарубежного производства, содержащие фенол в качестве консерванта, зарегистрированные в РФ [29]

Наименование препарата	Требования НД	Производитель
Вакцина пневмококковая поливалентная полисахаридная «Пневмо 23»	Не более 1,25 мг/д (не более 0,25%)	«Санofi Пастер», Франция
Вакцина пневмококковая поливалентная полисахаридная «Пневмовакс 23»	От 0,225 до 0,275% (от 2,25 мг/мл до 2,75 мг/мл)	«Мерк Шарп Доум корп.», США
Вакцина стафилококковая	не более 0,25%	ОАО «Биомед» им. И.И.Мечникова
Вакцина гонококковая	не более 0,25% (не более 2,5 мг/мл)	ФГБУ НПО «Микроген»
Вакцина брюшнотифозная Ви-полисахаридная «Вианвак»	Не более 0,75 мг/0,5 мл (не более 0,15%)	ООО «Гритвак», г.Москва

Окончание таблицы 1

Вакцина поливалентная для профилактики синегнойной палочки «Псевдовак»	2,4 – 4,0 мг/мл (0,24 – 0,4%)	АО «ИБСВ БИОМЕД», Польша
Вакцина дизентерийная против шигелл Зонне, липополисахаридная «Шигеллвак»	Не более 0,75 мг/0,5 мл (не более 0,15%)	ООО «Гритвак», г.Москва
Аллерген туберкулёзный очищенный в стандартном разведении «Диаскинтест»	0,2 – 0,3% (2,0 – 3,0 мг/мл)	ЗАО «ГЕНЕРИУМ»
Аллергены: Н-АЛ, Д-АЛ (прик – тест диагностический)	1,5 – 4,0 мг/мл (0,15 -0,4 %)	«Севафарма», Чехия
Аллергены неинфекционные	0,2 -0,4% (2,0 – 4,0 мг/мл)	ОАО «Биомед» им. И.И.Мечникова
Аллергены неинфекционные	0,2 –0,4% (2,0 – 4,0мг/мл)	ФГБУ НПО «Микроген» г. Ставрополь
Аллергены: «Алюсталь», «Сталораль», «Фосталь»	1,5 – 4,0 мг/мл (0,15 -0,4 %)	АО «Сталержен», Франция
Аллерген туберкулёзный очищенный в стандартном разведении	0,2 – 0,35% (2,0 – 3,5 мг/мл)	СПбНИИВС

Как следует из таблицы 1, требования к содержанию фенола в препаратах, зарегистрированных в РФ, находятся в пределах от 1,5 мг/мл до 4,0 мг/мл в зависимости от типа препарата и дозировки. Максимальное содержание фенола в 1 мл – 4,0 мг.

Производное фенола - *2-феноксиэтанол* (этиленгликоль монофениловый эфир) относится к классу умеренно токсических веществ, что сравнительно недавно позволило некоторым зарубежным производителям начать его применение в инъекционных препаратах в качестве консерванта [29].

На сегодняшний день *2-феноксиэтанол* содержится в ряде вакцин против вирусных инфекций полиомиелита и гепатита А и в комбинированной пятикомпонентной вакцине «Пентаксим» (против коклюша, дифтерии, столбняка, гепатита В и гемофильной инфекции).

В России зарегистрированы несколько препаратов европейского производства, содержащие в своем составе *2-феноксиэтанол* (Таблица 2).

Таблица 2 - Препараты зарубежного производства, зарегистрированные в РФ, имеющие в составе консервант 2-феноксиэтанол [29]

Наименование препарата	Требования НД	Производитель
Вакцина против полиомиелита «Имовакс – Полио»	2,0 – 3,0 мкл /0,5 мл	Санофи Пастер С.А., Франция
Вакцина для профилактики полиомиелита «Полимилекс»	От 2,0 - 3,0 мг/доза	Билтховен Биолоджикалз Б.В., Нидерланды
Вакцина против полиомиелита «Полиорикс»	4,25 – 5,75 мг/мл	«Глаксо Смит Кляйн», Бельгия
Вакцина против гепатита А «Хаврикс»	4,25 – 5,75 мг/мл	«Глаксо Смит Кляйн», Бельгия
Вакцина против гепатита А инактивированная «Аваксим»	1,5 - 3,5 мкл / 0,5мл	Санофи Пастер С.А., Франция
Пятикомпонентная комбинированная вакцина «Пентаксим»	2,0 – 3,0 мкл / 0,5мл	Санофи Пастер С.А., Франция

Как следует из таблицы 2, требования к содержанию 2-феноксиэтанола в препаратах, зарегистрированных в РФ, находятся в пределах от 3,3 мг/мл до 7,7 мг/мл в зависимости от типа препарата и дозировки. Максимальное содержание 2-феноксиэтанола в дозе 0,5 мл – 3,5 мкл (3,85мг).

В США одобрена по данным FDA и зарегистрирована вакцина «Ipol», предназначенная для профилактики полиомиелита, где в качестве консерванта использован 2-феноксиэтанол в концентрации 0,5% [111].

Об отложенных последствиях применения 2-феноксиэтанола в вакцинах, например, о нейротоксичности и влиянии на репродуктивную функцию, информация отсутствует в связи с недостаточной продолжительностью его использования [111].

Инактивирующее действие фенола на антигены и снижение иммуногенности препаратов в его присутствии стало причиной отказа от применения фенола в производстве ряда вакцин. Это привело к необходимости поиска нового эффективного консерванта, которым оказался тиомерсал [60, 102].

Тиомерсал (соединение имеет ряд других названий: мертиолят, меркуротиолят, мерфамин, мерсептил, мерторган, эстивин) –

ртуторганический компонент ИЛП, данное соединение представляет собой производное тиосалициловой кислоты. Молекулярная формула соединения - $C_9H_9SO_2HgNa$, молекулярная масса 404,8147 г/моль, с массовой долей ртути 49,55 %. Химическое название по классификации ИЮПАК – этил (2-меркаптобензоато-(2-) - O,S) меркурат(1-) натрий.

Соединение было синтезировано в 1927 году известным американским химиком Моррисом Харашем (Morris Kharash) в Чикаго. В 1928 году оно было запатентовано и в том же году выпущено на рынок в качестве универсального консерванта широкого антимикробного и фунгицидного действия для медицинских и косметических препаратов под коммерческим названием “Merthiolate” (мертиолят - соль, содержащая ртуть и серу). Эффективность тиомерсала превысила в 40 – 50 раз эффективность фенола в тестах *in vitro*. Поэтому, в качестве консерванта, тиомерсал стал широко применяться в медицинских препаратах, таких как противоядия, аллергены, вакцины (пероральные и парентеральные), препараты антител, а также медицинские и косметические средства для наружного применения: мази, крема, капли, гели и спреи (Таблица 3) [60].

Таблица 3 - Зарегистрированные в Российской Федерации ИЛП, содержащие в своем составе тиомерсал¹ [29]

Наименование препарата	Требования НД	Производитель
Вакцина гепатита В	30 - 70 мкг/мл	ЗАО «Комбиотех»
Вакцина АДС-М-геп В	30 – 70 мкг/мл	ФГБУ «НПО Микроген»
Вакцина АКДС + геп В	70 – 100 мкг/мл	ФГБУ «НПО Микроген»
Бубо-КОК	70 – 100 мкг/мл	ЗАО «Комбиотех»
Совигрипп	85 – 115 мкг/мл	ФГУП «НПО Микроген»
Совигрипп	85 – 115 мкг/мл	ФГУП СПбНИИВС ФМБА России
Совигрипп	85 – 115 мкг/мл	НПО «Петровакс Фарм»
Флюваксим	85 – 115 мкг/мл	Чаньчунь Чаншэн Лайф Сайенсиз Лтд, Китай
АКДС-вакцина	80 - 120 мкг/мл	ФГБУ «НПО Микроген»
АДСМ-анатоксин	80 – 120 мкг/мл	ФГБУ «НПО Микроген»
АС-анатоксин	80 – 120 мкг/мл	ФГБУ «НПО Микроген»

¹ Ряд препаратов могут выпускаться в однодозовой бесконсервантной форме

Окончание таблицы 3

АС-анатоксин	80 – 120 мкг/мл	«БиоМед» им. Мечникова
АДС-анатоксин	80 – 120 мкг/мл	ФГБУ «НПО Микроген»
Вакцина гриппозная элюатно-центрифужная	85 – 115 мкг/мл	ФГБУ «НПО Микроген»
Вакцина гепатита В, рекомбинантная	30 – 70 мкг/мл	Серум Инститьют, Индия
Эувакс В	Не более 46 мкг/мл	Санофи-Пастер, Франция
Ваксираб	30 – 100 мкг/мл	Китай
Анатоксин стафилококковый	80 – 120 мкг/мл	филиал «Медгамал» ФГБУ «НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»
Вакцина против гепатита В	30 – 70 мкг/мл	ЗАО «Биннофарм»
Коклюшная суспензия, инактивированная	80 - 120 мкг/мл	ФГУП «НПО Микроген»
Тетраанатоксин	80 - 120 мкг/мл	ФГБУ «НПО Микроген»
Бубо-М	8 - 115 мкг/мл	ЗАО «Комбиотех»

Как следует из таблицы 3, требования к содержанию мертиолята в препаратах, зарегистрированных в РФ, колеблются от 30 мкг/мл до 120 мкг/мл в зависимости от типа препарата и дозировки. Максимальное содержание тиомерсала в дозе 0,5мл – 60 мкг.

Тиомерсал стал применяться в большом количестве инъекционных препаратов с 1930-х годов, в том числе в детских вакцинах календаря прививок. Расширение календаря прививок соответственно увеличивало суммарную дозу тиомерсала [60]. По этой причине наблюдающийся в США и Канаде резкий рост случаев аутизма у детей связали с вакцинацией [95, 115]. Уже было известно, что одним из побочных действий ртутьорганических соединений является подавление и, в тяжелых случаях, поражение центральной нервной системы. Этот факт вызвал массовое противостояние общественности против применения препаратов, содержащих тиомерсал, и против вакцинации вообще. Таким образом, применение препаратов, содержащих тиомерсал, стало предметом глубоких многолетних исследований [53, 84, 92, 115, 184].

Первоначальные предположения о накоплении опасного количества ртути в организме в связи с применением ртутьсодержащих вакцин

базировалось на исследованиях метаболизма метилртути, содержащейся в большом количестве в некоторых морепродуктах [56, 119]. Исследования показали, что, попадая в организм с пищей, метилртуть не утилизируется и не выводится из организма, из-за чего существует угроза ее накопления [98, 198]. Однако изучение фармакокинетики тиомерсала показало, что он метаболизируется до этилртути и тиосалицилата, которые полностью выводятся из организма [60, 88, 184]. Период полувыведения этилртути составляет ~18 дней для взрослых и ~4 дня для новорожденных. Период полного выведения тиомерсала из организма новорожденных составляет ~30 дней [88, 184].

Множество исследований в конце XX начале XXI века иммунизированных детей доказали отсутствие системного токсического действия консервантов и связи между вакцинацией и аутизмом [60, 61, 70, 90, 94, 141, 207, 213, 224, 225]. Также в 2006 году были опубликованы материалы, подтверждающие рост заболеваемости аутизмом на фоне применения бесконсервантных препаратов [227].

Официально отмечено, что в вакцинах тиомерсал содержится в концентрациях до 0,01%, что отвечает требованиям ведущих фармакопей к консервантам: эффективность против бактериальной и грибковой контаминации и безопасность для человека. Не было никаких доказанных побочных эффектов, кроме незначительных реакций в месте инъекции.

На сегодняшний день доказано отсутствие связи между ростом случаев аутизма у детей и вакцинацией. Обобщенные данные, основанные на массиве научных исследований, содержатся в восьмом докладе Национального института медицины США от 2004 года (Institute of Medicine of the National Academies), посвященном проблеме влияния вакцинации на развитие аутизма у детей [92, 136, 169].

В докладах ВОЗ, посвященных теме безопасности вакцин, со ссылками на рецензированные исследования, также подтверждается безопасность применения тиомерсала в качестве консерванта [7, 8, 226].

Однако, по данным опроса, 2010 года проведённого в США, 25% опрошенных родителей считали, что некоторые из вакцин вызывают аутизм у здоровых детей [130]. Ряд специалистов уверены, что это убеждение связано с тем, что аутизм у детей невозможно выявить до «возраста вакцинации», и период, когда они получают вакцины, часто совпадает с возрастом, когда аутизм диагностируется у детей, поэтому неизбежны случайные ассоциации [60]. Есть так же экспертное мнение, что из-за склонности к аллергическим реакциям у детей с расстройствами аутистического спектра, скрытую патологию выявляет сильный иммунный ответ организма, при этом прививка выступает в роли неспецифического фактора, обнаруживающего латентное заболевание. Также, необходимо понимать, что инфекция также может оказаться таким фактором [60, 128].

Недоверие населения к вакцинации является одним из препятствий к улучшению эпидемической обстановки в мире и входит в список десяти основных проблем и приоритетных задач в области здравоохранения. При этом вакцинация является одним из самых важных достижений медицины. Согласно оценкам ВОЗ «иммунизация каждый год спасает 2-3 миллиона человеческих жизней» [8, 51, 63, 64, 71, 74, 87, 91, 97, 99, 116, 125, 131, 143, 144, 145, 150, 160, 162, 163, 166, 176, 179, 182, 183, 188, 192, 193, 195, 196, 199, 204, 205, 214, 221, 231, 232, 233].

В связи со сложившейся ситуацией в докладе ВОЗ 2012 года, в качестве перспективной цели были обозначены: максимальный переход на применение вакцин в однодозовых упаковках, не содержащих консервант; снижение концентрации консервантов, их замена или исключение консервантов из состава ИЛП. Однако при этом было отмечено что, несмотря на данный вектор развития технологий, остаются препараты и/или формы их выпуска, где применение консервантов является пока единственно возможной защитой от контаминации [7, 226, 228].

Сегодня использование тиомерсала в качестве консерванта в вакцинах во всем мире заметно сократилось из-за перехода на выпуск однодозовых

форм вакцинных препаратов [60, 111]. В то же время, ряд препаратов выпускается в многодозовой форме, что обеспечивает экономическую возможность проведения массовых иммунизаций при возникновении эпидемий и/или пандемий. Данные препараты содержат тиомерсал, что позволяет гарантировать безопасность их применения [84, 226].

1.1.1. Технологии производства вакцин и анатоксинов и необходимость применения консервантов

В настоящее время существуют вакцины от более тридцати заболеваний, ряд из которых включены в список прививок, рекомендованных ВОЗ для обязательного прививания [80]. Графики (календари) прививок ежегодно актуализируются в соответствии с эпидемической обстановкой в том или ином регионе земного шара [79, 80]. На территории Российской Федерации действует национальный календарь профилактических прививок и календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям. На настоящий момент в него включены прививки против гепатита В, туберкулеза пневмококковой инфекции, дифтерии, коклюша, столбняка, гемофильной инфекции типа b, полиомиелита, гриппа, кори, краснухи, эпидемического паротита; по эпидемиологическим показаниям: ротавирусной инфекции, менингококковой инфекции, гепатита А, клещевого вирусного энцефалита, ветряной оспы, бешенства, бруцеллеза, брюшного тифа, желтой лихорадки, лептоспироза, лихорадки Ку, сибирской язвы, туляремии, холеры, чумы, шигеллезов [42].

Вакцины классифицируют по типу технологии получения антигенного материала. Выбор технологии производства вакцины зависит от возбудителя заболевания. Согласно этой классификации, вакцины делятся на следующие категории:

- живые или аттенуированные вакцины, производимые на основе ослабленных штаммов микроорганизмов с генетическими изменениями, полученными путем селекции и позволяющими избавиться от патогенных

свойств возбудителя, но при этом сохранить способность микроорганизма вызывать стойкий иммунитет к заболеванию [129, 158];

- инактивированные, получаемые в результате термической обработки, либо обработки при помощи инактивирующих агентов микробной или вирусной массы [1, 134];

- сплит-вакцины, содержащие расщепленные частицы вирусов, поверхностные и внутренние компоненты вирусной частицы, белки и липиды [234];

- субъединичные, состоящие из очищенных белков патогенного организма, это могут быть синтетические, генно-инженерные (рекомбинантные), химические и конъюгированные вакцины [161, 212];

- виросомальные противовирусные вакцины, состоящие из оболочки вириона, свободной от генетического материала с полностью сохраненной поверхностной структурой [152, 153, 212];

- анатоксины, состоящие из экзотоксинов, выделяемых патогенными микроорганизмами, модифицированные и стабилизированные формалином.

Большинство из перечисленных выше технологических подходов к производству вакцин разработаны в разные периоды XX века, используются в настоящее время и постоянно совершенствуются, что позволяет обеспечивать эффективность и безопасность данных препаратов на уровне современных требований [64, 161, 186]. Следует отметить, что все вакцины, входящие в состав календарей прививок РФ, получают по традиционным технологиям.

Однако развитие биотехнологии и биофармацевтики предлагает новые пути создания ИПП, направленные на снижение рисков, связанных с использованием живых вакцин, а также открывающие новые возможности создания актуальных препаратов в случае неэффективности использования инактивированных или субъединичных вакцин, а также проблем получения и культивирования целевого вирусного штамма [55, 68, 108, 110, 147, 153, 168, 170, 189, 197, 220, 235].

Появление новых технологий получения вакцин, например, векторной технологии, позволяет в сравнительно короткие сроки разработать вакцину против вирусной инфекции, поскольку отсутствует необходимость разработки технологий культивирования и инактивирования/ аттенуирования исходного патогенного возбудителя, очистки, получения субъединиц и т.д. применительно к новому объекту. Используя один и тот же плазмидный или вирусный вектор, можно создавать вакцины против различных инфекционных заболеваний, внедряя ДНК/РНК, кодирующие антигены разных возбудителей [127, 135, 203].

Наиболее распространенной является, так называемая аденовирусная платформа, в основе которой лежит создание векторного конструкта, экспрессирующего белковые антигенные детерминанты патогенного вируса [37, 55, 146, 167, 171, 173, 189, 220].

Нановакцины - противовирусные препараты, технология производства которых предполагает использование наночастиц: на липидной основе (липосомы, твердые липидные наночастицы, наноэмульсии); на основе полимеров (полимерные мицеллы, полимерные наночастицы, полимерные конъюгаты); неорганических наноматериалов, аналогично вирусному вектору, обеспечивающих биодоступность для ДНК, РНК или белков-антигенов [81, 148, 151, 157, 174, 175, 200].

Важное преимущество современных технологий состоит в том, что они позволяют производить препараты без использования консервантов. Однако, препараты получаемые таким образом, не являются препаратами обязательной иммунизации, за исключением эпидемических ситуаций.

1.1.2. Технологии производства аллергенов и необходимость применения консервантов

Аллергены это ИЛП, применяющиеся для диагностики и лечения аллергических состояний, связанных с чувствительностью иммунной системы организма к влиянию чужеродных агентов [100].

Препараты на основе аллергенов могут выпускаться в виде парентеральных, пероральных, сублингвальных, ингаляционных и офтальмологических лекарственных препаратов или препаратов для проведения кожных проб, иногда в составе препаратов может содержаться адъювант [100]. Препараты аллергенов классифицируются на инфекционные (бактериальные и грибковые аллергены) и неинфекционные аллергены (пыльцевые аллергены и аллергоиды, бытовые, эпидермальные и пищевые, химические) [185].

В основном аллергены представляют собой водно-солевые экстракты из источников природных аллергенов. Аллергоиды - это аллергены, прошедшие дополнительную стадию модификации белков, путем обработки формальдегидом, с целью понижения их аллергенной активности. Исходным сырьем для производства являются соответствующие аллергену объекты, например, плесневые грибы, пыльца растений, микроорганизмы, клещи, эпителий животных и другие материалы, которые подвергаются специальной предварительной обработке и гомогенизации перед экстракцией [69, 72, 185].

Несмотря на то, что порядок отбора материала, технологии и экстракции определены регламентом производства для каждого аллергена, такой способ производства имеет ряд недостатков, которые невозможно устранить при помощи существующих технологий: партия исходного сырья может быть контаминированна нежелательными компонентами и аллергенами из других источников, в связи с чем, состав экстрактов от серии к серии может характеризоваться вариабельностью компонентов (в том числе целевых) [100, 118]. Таким образом, состав антигенов препаратов аллергенов не поддается стандартизации аналогично другим ИЛП и разные серии одного аллергена могут отличаться соотношением специфически активных компонентов, либо не содержать или содержать терапевтически неэффективную дозу аллергена. Качество данной группы препаратов оценивают путем тестирования биологической активности и реактогенности, а также по содержанию белкового азота в единицах PNU, которое имеет

определенный диапазон требований, но может не коррелировать с показателем активности [118, 185].

Несмотря на вышеперечисленные особенности, препараты аллергенов имеют многолетнюю практику применения и доказанную эффективность. Однако в терапевтическом отношении нестандартизованный состав можно рассматривать как недостаток при необходимости корректной дозировки, адаптации к профилю сенсibilизации пациента и исключению новых сенсibilизаций [118].

Эти вопросы решаются при разработке рекомбинантных препаратов аллергенов и гипоаллергенов. Такие белки-аллергены можно получать в достаточном количестве и направленно модифицировать для усиления иммунологических свойств и уменьшения аллергенной активности, при этом дозировка может контролироваться по количеству белка [118].

В настоящее время за рубежом имеются разработки наиболее распространенных пыльцевых (береза), бытовых (пылевые клещи) и пищевых (арахис) рекомбинантных аллергенов. К недостаткам таких препаратов относят низкую, по сравнению с традиционными аллергенами, активность и, как следствие, необходимость более высокой дозировки или применения адъювантов [69, 132, 218].

В Российской Федерации в настоящий момент зарегистрирован и производится по рекомбинантной технологии один препарат инфекционного аллергена - туберкулезный аллерген «Диаскинтест».

Как традиционные так рекомбинантные технологии требуют присутствия консервантов. Практически все препараты аллергенов, выпускающихся в форме растворов, кроме стабилизированных формальдегидом алергоидов, содержат в своем составе фенол, обеспечивающий стерильность и безопасность их применения.

1.2. Анализ состояния методической базы количественного определения консервантов в ИЛП

Определение консервантов является одной из важнейших задач оценки качества ИЛП. Традиционные фармакопейные методы количественного химического анализа предусматривают фотометрическое определение тиомерсала и фенола и метод титрования для определения фенола. Кроме того, не все фармакопейные издания содержат методики, позволяющие количественно определить фенол и тиомерсал в составе ИЛП, большая часть фармакопейных методик предполагают определение чистоты вещества.

Методы определения фенола.

В Европейской фармакопее описана колориметрическая методика определения фенола в ИЛП, в основе которой лежит цветная реакция фенола с аминопиразолоном (4 – аминоантипирин) в присутствии феррицианида калия. Интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию фенола в растворе, количественно содержание комплекса определяют при 546 нм в сравнении с калибровочными растворами. Ряд европейских производителей ИЛП предусматривают данный способ в различных модификациях [106].

В Американской, Британской, Японской фармакопеях описаны разные варианты броматометрического титрования для определения чистоты фенола.

В качестве фармакопейного метода для контроля фенола в ИЛП в Российской Федерации долгое время использовался титриметрический метод, в последствии, до середины 1980-х годов использовали колориметрический метод, основанный на реакции фенола с реактивом Фолина, рекомендованный ВОЗ.

В 1982 г. в лаборатории биохимии «ГИСК им. Л.А. Тарасевича» был разработан спектрофотометрический метод для определения фенола в аллергенах и вакцинах [33, 38]. Метод основан на способности раствора фенола, поглощать излучение в ультрафиолетовом диапазоне. Суть метода заключается в измерении оптической плотности растворов при длинах волн

269 нм (максимум поглощения фенола) и 290 нм (максимум поглощения окрашенных примесей). Данный метод подходит для определения фенола в препаратах, содержащих не более 0,5 мг/мл белкового азота. В настоящее время спектрофотометрический метод определения фенола является фармакопейным методом ГФ РФ и применяется всеми российскими производителями для определения содержания фенола в аллергенах и фенолсодержащих вакцинах [23].

С середины XX века для определения фенола и его производных в аналитической химии начали применять методы хроматографического анализа. Одним из первых хроматографических методов определения фенолов (например, в растительном сырье, крови и моче) была бумажная хроматография [65, 89, 124, 126, 190], позднее появились методы, основанные на тонкослойной хроматографии [209], гельфильтрационной хроматографии [67], ионообменной хроматографии [149], а затем газовой хроматографии [30]. Хроматографические методы анализа имеют высокую чувствительность и исключительную специфичность, что позволяет количественно определять содержание фенола и его производных, в том числе в следовых количествах в воде, воздухе, а также в образцах, имеющих сложный состав органических веществ [31, 35, 76, 114, 165, 177, 191].

В последние десятилетия, благодаря широкому внедрению в лабораторную практику высокотехнологичного оборудования, среди производителей лекарственных препаратов также отмечается тенденция перехода от фотометрических и титриметрических методов количественной оценки содержания фенола на более чувствительные и специфичные хроматографические методы.

Высокая специфичность хроматографических методов обеспечивается за счет разделения компонентов смеси между подвижной и стационарной фазами хроматографической системы.

При любом хроматографическом разделении одновременно происходят процессы, влияющие на поведение каждого аналита и, следовательно, на

вероятность разделения аналитов. Это кинетические и термодинамические процессы взаимодействия с неподвижной фазой, уникальные для каждого аналита (разделение, адсорбция, ионное спаривание, ионный обмен, молекулярное исключение) - определяющие хроматографический процесс и процесс диффузии, препятствующий разделению. Успешное хроматографическое разделение аналитов в смеси зависит от выбора подходящих хроматографических условий с последующей оптимизацией. Оптимизация требует понимания процессов хроматографирования и расчета ряда экспериментальных параметров, характеризующих поведение каждого аналита в смеси [62, 222].

Необходимость внедрения высокоспецифичных и высокочувствительных методов в практику контроля ИЛП обуславливает актуальность разработки методик определения фенола в ИЛП с применением методов ГЖХ и ОФ ВЭЖХ.

Методы определения тиомерсала

Для количественного определения тиомерсала, как и других ртутьсодержащих соединений используются методы, основанные на определении ртути и последующем пропорциональном пересчете на исходное вещество. Содержание ртути в молекуле тиомерсала: 49,55 на 100 частей. Фармакопейные методы представлены общими статьями по определению ртути и тиомерсала, основанными на методах титриметрии, колориметрии и атомно-абсорбционной спектроскопии для определения чистоты вещества, лишь некоторые фармакопеи содержат описания методик определения ртути и тиомерсала в лекарственных препаратах [107].

Европейская и Британская фармакопеи рекомендуют для определения чистоты тиомерсала методику, основанную на выделении ионов двухвалентной ртути из мертиолята посредством окисления пероксидом водорода, с последующим титриметрическим (комплексометрическим) определением ионов ртути (II). Определение выполняют путем титрования

стандартным раствором тиоцианата аммония в присутствии солей трёхвалентного железа в качестве индикатора [73, 105].

В фармакопее США наряду с колориметрической методикой определения ртути в реакции с дитизоном как один из способов определения ртути, в общей статье «Mercury», предложен метод атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара (ААС ХП) [215]. Также метод ААС ХП рекомендован Европейской фармакопеей для определения ртути в лекарственных препаратах растительного происхождения [107]. Общее описание принципа определения соединений ртути методом ААС ХП приведено в Японской фармакопее в статье, посвящённой атомно-абсорбционной спектроскопии [142]. Метод ААС ХП является разновидностью метода ААС. Он основан на образовании свободной элементарной восстановленной ртути, которая имеет свойство существовать в газообразной фазе при комнатной температуре в отсутствие нагревания. Определяемый элемент детектируется в газовой фазе. Метод характеризуется исключительной селективностью – влияние компонентов матрицы практически исключено. Метод ААС ХП сочетает все достоинства традиционной атомно-абсорбционной спектроскопии, такие, как высокая чувствительность и простота пробоподготовки [107, 142, 215].

Метод атомно-абсорбционной спектрометрии с атомизацией в ацетилен-кислородном пламени для определения ртути описан в Британской фармакопее [73], и в Фармакопее США [216].

Государственная фармакопея Российской Федерации включает два метода определения содержания ртути: метод, основанный на колориметрическом определении в реакции с дитизоном, и ААС ХП [18].

До недавнего времени в Российской Федерации тиомерсал в составе ИЛП определяли только колориметрической методикой, в основе которой лежит взаимодействие ртути, выделяющейся в результате окисления тиомерсала с перманганатом калия в кислой среде, с дитизоном с образованием дитизоната ртути [19].

Эта фармакопейная методика включена в отечественные нормативные документы, регламентирующие контроль качества препаратов, содержащих тиомерсал. Она имеет достаточно высокий, на фоне большинства аналитических методов, RSD - порядка 11%, что обусловлено сложной пробоподготовкой, включающей этапы минерализации в серной кислоте с образованием ионов ртути, окисление органических компонентов перманганатом калия и последующее восстановление, экстракцию ионов ртути в раствор дитизона в хлороформе, отделение водной фазы и, наконец, колориметрирование. Анализ одного образца занимает, не менее 3 – 4 часов. Методика чувствительна к чистоте и качеству реактивов, стеклянной посуды, существенное значение может иметь квалификация оператора. Все эти причины обуславливают проблемную воспроизводимость при трансфере данной методики.

Таким образом, поиск наиболее чувствительных и точных методов для определения ртути и ртутьсодержащих компонентов – актуальная задача для разработчиков [59, 77, 101, 117, 180, 187].

Метод атомно-абсорбционной спектрометрии (ААС), рекомендованный ведущими фармакопеями мира для анализа ртути, является эталонным при определении металлов, он характеризуется высокой точностью, селективностью и чувствительностью. Применение метода ААС позволяет частично автоматизировать процесс, за исключением пробоподготовки, при наличии автоподатчика образцов, анализ может проводиться полностью в автоматическом режиме. Чувствительность метода атомно-абсорбционной спектрометрии (порядка 10 нг/л) принципиально отличается от метода колориметрии (4 мкг/мл). При определении ртути, входящей в состав тиомерсала, методом атомно-абсорбционной спектрометрии возможно применение любого из вариантов метода: классического метода с атомизацией в пламени, электротермической атомизации и метода холодного пара. Метод пригоден для проведения

массовых анализов, например, широко применяется для анализа состояния объектов окружающей среды [181].

Данный метод может быть предложен как альтернативный и более оптимальный для определения тиомерсала при условии разработки адекватного процесса пробоподготовки испытуемых образцов ИЛП.

В сравнении вышеизложенных методов определения ртути – спектрофотометрического, колориметрического, метода ААС и спектроскопии с атомизацией индуктивно-связанной плазмой, метод атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара выигрышно отличается по совокупности достоинств: простота анализа, простота пробоподготовки, высокая производительность анализа, высокая чувствительность, исключительно высокая селективность, низкая стоимость оборудования, низкая стоимость эксплуатации.

Согласно современным требованиям Надлежащей лабораторной практики, важное значение имеет корректное протоколирование процесса проведения измерений и вычисления результата. Программное обеспечение современных атомно-абсорбционных спектрометров холодного пара ртути, позволяет автоматически производить фиксирование и обработку результатов и создавать отчет по результатам анализа в соответствии со стандартами GLP. Таким оборудованием являются, например, спектрометры фирмы PerkinElmer [10, 12]. Аналогичные требования к качеству протоколирования процесса измерений предъявляются и в российском стандарте на качество лабораторных измерений [12]. С точки зрения соответствия требованиям стандартов ГОСТ/GLP, метод атомно-абсорбционной спектроскопии имеет предпочтение перед колориметрическим методом определения мертиолята.

1.3. Требования к разработке и стандартизации аналитических методов контроля качества лекарственных средств

Контроль качества ИЛП, как и других лекарственных средств регламентирован международными правилами надлежащей лабораторной и

надлежащей производственной практики (GLP и GMP). Положения ряда государственных стандартов, регламентирующих производство и контроль лекарственных средств, в Российской Федерации гармонизированы с требованиями GMP [10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17]. Соблюдение данных требований производителями гарантирует обеспечение контроля над производственными и испытательными процессами, а, следовательно, гарантирует качество произведенной продукции. Обеспечение соответствия международным требованиям особенно актуально для ИЛП, учитывая особенности технологий производства и состава препаратов. Одним из основных инструментов, позволяющих контролировать состояние производственного процесса на всех уровнях, является валидация. Валидации подлежат оборудование и помещения (чистые зоны), инженерные системы, технологическое оборудование, технологические процессы. Аналитические методы контроля качества на промежуточных стадиях производства и готового препарата являются частью технологического процесса и также подлежат валидации [11, 14, 17, 43, 44, 45, 217].

Валидация аналитической методики – это исследование, позволяющее оценить ее точностные характеристики, а также ее пригодность для оценки качества конкретного материала [122]. Валидационные исследования позволяют объективно оценить чувствительность и специфичность определения аналита в присутствии других компонентов исследуемых образцов, определить адекватность рабочего диапазона методики для оценки количеств аналита, содержащихся в образце, оценить точность методики, ошибки, вызываемые случайными и систематическими причинами. Также валидация позволяет проанализировать неопределенность полученных результатов при конкретном уровне достоверности [85]. Этот показатель характеризует рассеяние значений, приписываемых измеряемой величине. Валидационными характеристиками методики являются специфичность, правильность, прецизионность, линейность, аналитическая область, предел

обнаружения, предел количественного определения, и устойчивость (робастность) [32, 50, 59].

Поскольку валидация аналитических методик является частью системы менеджмента качества, требования по ее обеспечению и необходимые рекомендации предусмотрены в зарубежных и отечественных стандартах и руководствах [15,16, 78, 139].

Согласно руководящим документам, аналитические методики, которые используются при оценке качества лекарственных средств, должны валидироваться при внесении изменений в технологию производства, изменении производственной площадки, изменении состава лекарственного средства, а также при разработке новых или модификации имеющихся методик. Валидация аналитического метода гарантирует прецизионность методики и возможность ее применения в процессе контроля качества лекарственных средств.

Валидацию вновь разработанных и модифицированных методик определения фенола и тиомерсала проводили согласно рекомендациям руководящих документов, определяя валидационные характеристики, предписанные для методов количественного определения примесей, поскольку консерванты, используемые в производстве ИЛП, являются вспомогательными веществами. Определяли следующие характеристики:

- линейность – диапазон концентраций, с корреляцией изменения аналитического сигнала от концентрации аналита в стандартном растворе, описываемой уравнением регрессионной зависимости.

- аналитическая область – это максимально отвечающий задачам диапазон концентраций, внутри линейной области методики;

- специфичность – возможность, достоверного определения аналита в составе компонентной смеси с использованием данной методики. Для хроматографических методов показателем специфичности является разрешение пиков;

- промежуточную прецизионность – величина, характеризующее случайное рассеяние результатов и характеризуется стандартным отклонением и относительным стандартным отклонением (повторяемость и воспроизводимость);

- устойчивость – стабильность при отклонениях в проведении анализа;

- правильность – соответствие между условно истинным значением, и полученным значением измеряемой величины;

- предел обнаружения и предел количественного определения, для подтверждения возможности использования при определении остаточных количеств аналита.

Оценить правильность вновь разработанной аналитической методики и возможность ее применения при осуществлении контроля лекарственных препаратов на соответствие требованиям нормативных документов позволяет анализ сопоставимости результатов испытаний, с применением утвержденных валидированных методик [17].

1.3.1. Требования к аккредитованным лабораториям.

Внутрилабораторный контроль качества как часть системы менеджмента качества. Стандартные образцы

Актуальные требования к аккредитованным лабораториям, изложенные в ГОСТ Р ИСО 17025-2019, представляют собой свод положений в отношении всех аспектов организации работы лаборатории и, включая в том числе, внутрилабораторный контроль качества (ВКК) испытаний/измерений [12].

ВКК осуществляется лабораторией самостоятельно и подразумевает комплекс действий, позволяющих осуществлять контроль за проведением лабораторных испытаний/измерений на соответствие метрологических характеристик нормативным требованиям. Осуществление ВКК обеспечивает надежность полученных результатов и возможность своевременного устранения причин, способствующих получению

ошибочных результатов при выполнении сложных методик, которые включают несколько стадий с привлечением большой доли ручного труда.

ВКК обеспечивает получение достоверных и сопоставимых результатов исследований, в том числе проводимых в разное время, что необходимо для контрольных лабораторий, выполняющих рутинные анализы и для научно-исследовательских лабораторий [10].

Внутрилабораторный контроль качества можно представить в виде оперативного контроля и контроля стабильности.

Оперативный контроль подразумевает мониторинг статистических показателей (повторяемости, внутрилабораторной прецизионности, точности) отдельно взятой процедуры [17].

Контроль стабильности анализа проводят на основании сравнения и статистической обработки результатов нескольких процедур, проведенных в определенный промежуток времени. Оба вида контроля можно осуществлять с применением образца внутреннего контроля (контрольного образца) [10].

В целях соответствия требованиям системы менеджмента качества (СМК) при внедрении новой или модификации имеющейся методики в работу аккредитованной аналитической лаборатории, необходимо обеспечение метрологического контроля условий проведения анализа и результатов измерений [10, 12, 17]. При проведении оперативного контроля в качестве контрольного образца можно использовать образец с известным содержанием вещества, приготовленный из навески непосредственно перед анализом. Применение данного образца позволяет определить точность количественного анализа при помощи расчета отклонения, полученного экспериментальным путем значения от расчетного значения содержания вещества в образце. При проведении контроля стабильности для статистического анализа данных в соответствии с РМГ 76-2014 в качестве стандартного образца контроля стабильности определения целесообразно использовать контрольный образец с установленным и аттестованным диапазоном количественного содержания определяемого вещества [45]. В

качестве подобного контрольного образца может рассматриваться фармакопейный стандартный образец содержания вещества для контроля стабильности количественного определения, применение которого позволит проводить межлабораторный контроль, осуществлять трансфер методик и проведение межлабораторных сличительных испытаний [4, 5, 6, 20, 47, 229, 230]. Таким образом, аттестованный в установленном порядке стандартный образец для контроля стабильности измерений является важным метрологическим инструментом для обеспечения единства измерений [86].

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 2. Разработка и стандартизация методик количественного определения фенола в ИЛП

2.1. Разработка и валидация методики количественного определения фенола в ИЛП методом ГЖХ

Выбор колонки и условий хроматографирования

Начальным этапом разработки методики на основе метода ГЖХ является выбор хроматографической колонки. На основании рекомендаций производителя оборудования Agilent по разработке оригинальных методик, были выбраны колонки, применимые для хроматографирования фенола и его производных [52]. Для сравнения эффективности разделения из широкого спектра колонок, предлагаемых производителем, были выбраны колонки с фазами различной полярности и идентичными параметрами (длина, диаметр, толщина слоя неподвижной фазы):

- колонка с фазой низкой полярности HP-5;
- колонка с фазой высокой полярности DB-WAX.

Далее для каждой из колонок подбирали предварительные хроматографические условия: скорость потока газа-носителя, температуру термостата колонки, температуру инжектора и детектора, режим давления в колонке, режим деления потока, объем вводимой пробы. Приемлемость условий определяли, оценивая показатели эффективности разделения: число теоретических тарелок (чтт), фактор удерживания, разрешение пиков, относительное время удерживания и фактор симметрии пиков. Оценку результатов хроматографирования проводили в соответствии с рекомендациями ГФ РФ [24] и ЕФ [104].

На начальном этапе подбирали условия хроматографирования, при которых можно получить сигнал в форме визуально симметричного, имеющего одну вершину пика с отклонением значений площади пика не более 3% при десятикратном воспроизведении.

Подбор хроматографических условий проводили, исследуя раствор фенола с концентрацией 3 мг/мл, что соответствует диапазону требований к содержанию фенола в ИЛП (1,5 – 4,0 мг/мл), и позволяет исключить, необходимость дополнительного разведения образцов. Поскольку ИЛП представляют собой водные растворы, а этанол является характерным растворителем для газовой хроматографии, для приготовления данного раствора использовали смесь этанола с водой в соотношении 1:1.

При выборе объема вводимой пробы учитывали, что исходная концентрация фенола 3 мг/мл является высокой для такого чувствительного метода как ГЖХ. Это может быть причиной получения искаженных, несимметричных пиков или их раздвоения. Один из способов работы с концентрированными растворами - использование небольших объемов проб, вводимых в инжектор, как правило, не более 0,5 мкл. Однако дальнейшее снижение объема вводимой пробы может приводить к снижению точности количественного определения. Таким образом, исходно был выбран объем пробы - 0,5 мкл.

Далее, для снижения нагрузки на хроматографическую колонку и детектор при выбранных условиях (концентрация фенола 3 мг/мл и объем вводимой пробы 0,5 мкл), хроматографируемый объем пробы уменьшали после перехода в газовую фазу, путем увеличения деления потока, до получения пиков с допустимым показателем симметрии пика фенола. Конечным приемлемым значением деления потока стало 1:40, при котором хроматографируется 1/40 часть испарившейся пробы.

При подборе температуры инжектора учитывали, что с одной стороны, необходимо обеспечить моментальное испарение пробы и равномерное распределение пара в объеме испарителя, что исключает потерю эффективности разделения, связанную с вводом пробы. С другой стороны, учитывали, что слишком высокие температуры могут привести к разрушению определяемых веществ. Физические свойства аналита (точка кипения фенола около 182⁰С) и растворителей в газовой фазе, а также

стабильность фенола в газообразном состоянии при высоких температурах, позволили предположить, что температура 220⁰С может быть минимальным эффективным значением. Далее исследовали влияние повышения температуры инжектора на изменение показателей эффективности разделения. Максимальную эффективность удалось получить при 250⁰С, дальнейшее повышение температуры инжектора не приводило к видимым изменениям показателей эффективности разделения.

Температура детектора должна исключать конденсацию фенола на выходе из колонки, поскольку конденсация является причиной искажения пиков и неконтролируемой потери анализируемого вещества, что, в свою очередь, является источником систематической ошибки определения и низкой воспроизводимости результатов и таким образом, снижаются точностные характеристики методики. Температуру детектора выбирали, оценивая симметрию пиков и RSD площадей пиков при десятикратном воспроизведении.

Симметричные пики с RSD 1,3% были получены при температуре детектора 250⁰С и соблюдении предварительно установленных условий хроматографирования: объем пробы 0,5 мкл; деление потока 1:40; температура инжектора 250⁰С.

Для контроля эффективности разделения, а так же для расчета содержания аналита в газовой хроматографии традиционно применяется внутренний стандарт [24, 25, 103, 104]. Расчет методом "внутреннего стандарта" позволяет повысить точность методики, так как исключает возможные технические ошибки в процессе дозирования и проведения пробоподготовки.

В качестве внутреннего стандарта использовали сходные по химическим и физическим свойствам компоненты: 2-феноксиэтанол и бензиловый спирт. Дальнейший подбор условий хроматографирования проводили, исследуя раствор, содержащий фенол, бензиловый спирт и 2-феноксиэтанол в равных концентрациях - 3 мг/мл (Рисунки 1 и 2, Таблица 4).

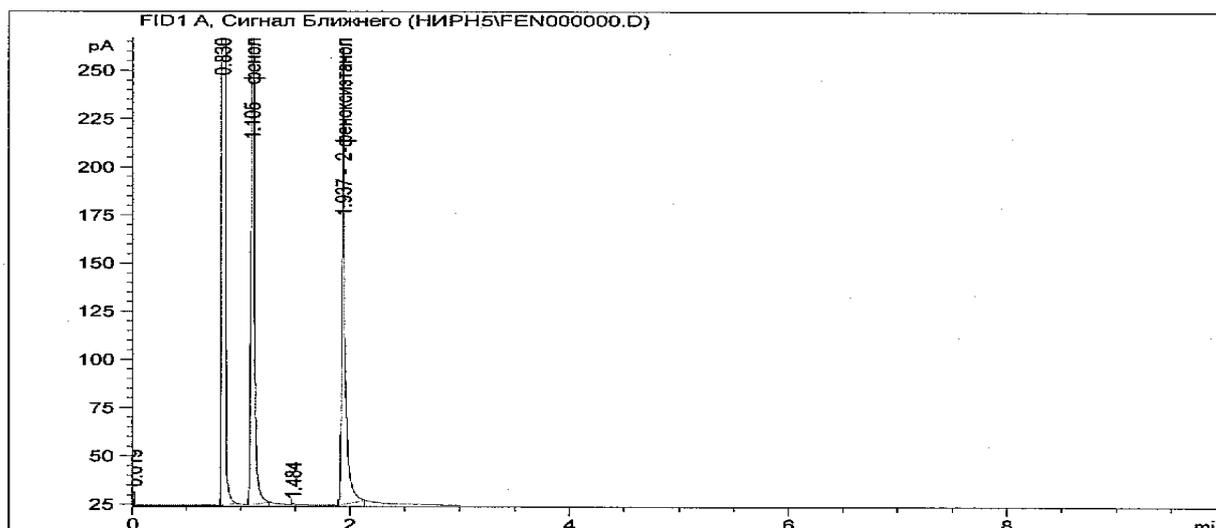


Рисунок 1 - Типичная хроматограмма, полученная на колонке HP-5

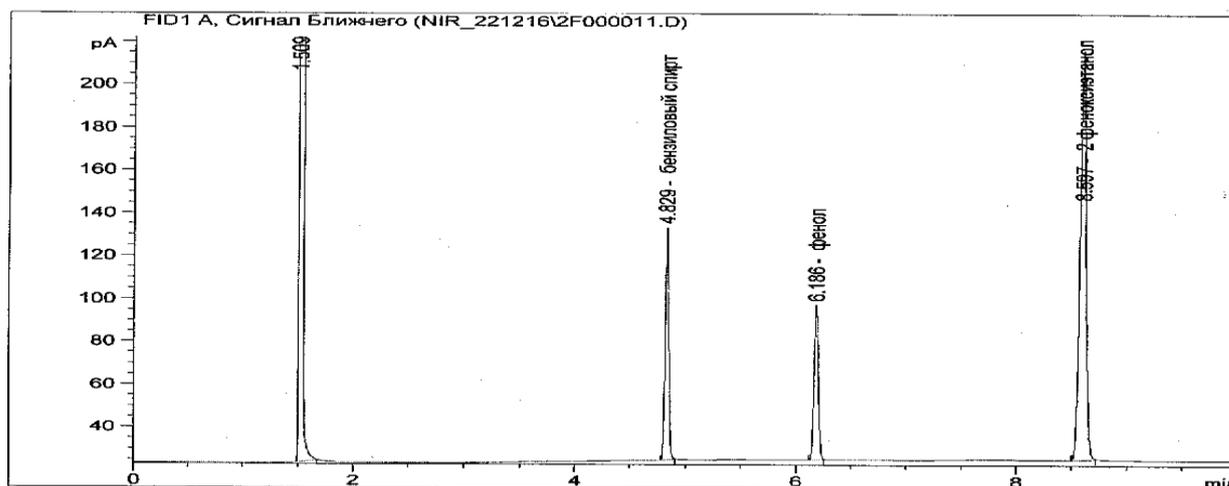


Рисунок 2 - Типичная хроматограмма, полученная на колонке DB-WAX

Таблица 4 - Сравнительный анализ показателей эффективности разделения смеси фенола и компонентов (по пику фенола)

Показатели эффективности разделения	Колонка HP-5	Колонка DB-WAX
Число теоретических тарелок	20699	124778
Фактор удерживания	1,33	5,7
Разрешение между пиками фенола и 2-феноксиэтанола	13,4	28,3
Время удерживания фенола относительно 2-феноксиэтанола	0,275	0,660
Фактор симметрии пика фенола	0,75	1,02

Как видно из рисунков 1, 2 и таблицы 4, более эффективное разделение пиков фенола и 2-феноксиэтанола наблюдается на колонке с фазой высокой

полярности DB-WAX. Что касается разделения пиков фенола и бензилового спирта - использование колонки HP-5 не эффективно (пик бензилового спирта отсутствует). В связи с этим дальнейшие исследования проводили с использованием колонки DB-WAX.

Далее начальные условия хроматографирования оптимизировали, с целью достичь максимальных значений показателей эффективности разделения для пиков фенола, 2-феноксэтанола и бензилового спирта.

Оптимизировать хроматографическое разделение возможно путем подбора температурного режима термостата колонки, который позволяет уменьшить время анализа и добиться увеличения эффективности разделения, при этом сохраняя значение фактора симметрии каждого пика близким к 1,0.

С этой целью исследовали различные варианты температурного режима термостата от 160⁰С до 230⁰С, контролируя показатели эффективности разделения (Таблица 5).

Таблица 5 - Исследование влияния температурного режима термостата колонки на эффективность разделения

Температура термостата колонки	Симметрия пиков компонентов раствора	Число теоретических тарелок	Разрешение пиков	Время хроматографирования, мин
от 160 ⁰ С до 190 ⁰ С	1,0 - 1,1	130 000 - 100 000	40-20	14-10
от 200 ⁰ С до 230 ⁰ С	1,2 и выше	70000 - 20000	4 - 19	10 - 6

Как видно из таблицы 5 с увеличением температуры термостата колонки, уменьшается время хроматографирования, но при этом уменьшается эффективность разделения, что особенно заметно при температурах от 200⁰С.

Добиться уменьшения времени хроматографирования и повысить при этом эффективность разделения помогает программирование температурного режима термостата колонки. Программу подбирали с учетом вышеуказанного влияния диапазонов температур на эффективность разделения в режиме постоянного давления. В результате, был получен температурный режим, заключающийся в пошаговом повышении

температуры в диапазоне от 160⁰С до 230⁰С с определенным временем выдержки на некоторых этапах.

При этом значительную разницу в изменении показателей эффективности разделения наблюдали при некоторых корректировках температурного режима. Так, например, увеличение времени выдержки при начальной температуре 160⁰С с 1 мин до 3 минут увеличивало время хроматографирования примерно на 2 минуты, но что увеличивалось для всех компонентов в среднем со 150 000 до 250 000. Значения показателей симметрии пиков при этом оставались близкими к 1,0. Дальнейшее увеличение выдержки при начальной температуре незначительно повышало показатели эффективности разделения, но при этом пропорционально увеличивалось время хроматографирования.

Далее был установлен градиент повышения температуры: выбрано значение 45⁰С/мин. При этом что для всех компонентов смеси в среднем составило около 200000. При значении градиента менее 45⁰С/мин наблюдалось различие что для компонентов смеси, например, при значении градиента 40⁰С/мин получены следующие значения что: для бензилового спирта около 180 000 и для фенола и 2-феноксэтанола около 360 000. Таким образом, был подобран температурный режим термостата колонки, при котором для всех компонентов смеси в равной степени обеспечивались близкие и достаточно высокие значения показателей эффективности разделения: число теоретических тарелок около 200 000, симметрия пиков около 1,0, разрешение пиков около 20 (Таблица 6).

Таблица 6 - Температурный режим термостата колонки

Градиент, ⁰ С/мин	Температура, ⁰ С	Выдержка, мин
-	160	3
45	200	0,8
45	230	3

С применением данного температурного режима исследовали влияние изменения скорости потока газа-носителя на показатели эффективности разделения смеси фенола и компонентов (Таблица 7).

Таблица 7 – Зависимость показателей эффективности разделения от скорости потока газа-носителя

Скорость потока газа носителя, мл/мин	Показатели эффективности разделения									Время хроматографирования, мин
	Бензиловый спирт			Фенол			2-Феноксиэтанол			
	Чтт	Фактор симмет-ри	Разрешение	Чтт	Фактор симметрии	Разрешение	Чтт	Фактор симметрии	Разрешение	
1,0	223678	0,95	73	234087	1,08	16	283571	1,56	20	7,5
1,2	198789	0,94	38	287045	0,90	17	312850	1,56	22	7
1,3	174368	1,02	39	329153	0,97	18	335434	1,74	23	7
1,4	232483	0,98	77	261734	0,98	17	295620	1,05	21	7
1,5	188655	1,06	41	342714	0,93	20	410661	0,98	0,55	7

Как следует из таблицы 7, при скорости потока от 1,0 до 1,3 мл/мин фактор симметрии пика 2-феноксиэтанола превышает рекомендуемое значение 1,5, а при скорости потока 1,5 мл/мин значение разрешения для пика 2- феноксиэтанола ниже рекомендуемого значения 2. Таким образом, оптимальное значение скорости потока газа-носителя в колонке, обеспечивающее приемлемые показатели эффективности разделения всех определяемых компонентов раствора - 1,4 мл/мин.

Таким образом, были подобраны следующие хроматографические условия, обеспечивающие приемлемые показатели эффективности разделения: объем пробы 0,5 мкл, температура инжектора 250⁰С, деление потока 1:40, скорость потока 1,4 мл/мин, температурный режим термостата колонки: начальная температура 160⁰С (3 мин), градиент 45⁰С/мин, до температуры 200⁰С, (0,8 мин), градиент 45⁰С/мин, до температуры 230⁰С. Температура детектора 250⁰С.

Исследование линейности актуального диапазона концентраций, установление аналитической области методики, выбор способа обработки результатов

Далее определяли линейную область методики в диапазоне актуальных значений концентраций, подбирали условия приготовления стандартных растворов. Выбирали компонент для использования в качестве внутреннего

стандарта, сравнивая показатели эффективности разделения и результаты расчетов в прямых и в относительных единицах (методом внутреннего стандарта) [24, 104].

На предмет линейности методики исследовали диапазон актуальных концентраций фенола от 0,2 мг/мл до 5,0 мг/мл, так как он включает возможный диапазон содержания фенола в препаратах ИЛП от 1,5 до 4,0 мг/мл. Для этого готовили две серии стандартных растворов, используя в качестве внутреннего стандарта бензиловый спирт (серия 1), и 2-феноксиэтанол (серия 2). Готовили стандартные калибровочные растворы из рабочего раствора фенола 5 мг/мл, с концентрациями фенола 0,2; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 мг/мл, взяв соответственно 0,04; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 мл рабочего раствора и доводя до 1мл водой очищенной, добавляя по 0,5 мл рабочего раствора внутреннего стандарта, концентрацией 5 мг/мл.

Для выбора внутреннего стандарта сравнивали показатели эффективности разделения (чтт и фактор симметрии пиков) фенола и компонентов для стандартных растворов с минимальной (0,2 мг/мл) и максимальной (5,0 мг/мл) концентрацией фенола из каждой серии, отличающейся внутренним стандартом (Таблицы 8 и 9).

Таблица 8 - Показатели эффективности разделения для стандартных растворов серии 1

Концентрация фенола в стандартном образце, мг/мл	По пику бензинового спирта		По пику фенола	
	Чтт	Фактор симметрии	Чтт	Фактор симметрии
0,2	98033	1,05	206359	1,15
5,0	156649	1,12	272176	1,01

Таблица 9 - Показатели эффективности разделения для стандартных растворов серии 2

Концентрация фенола в стандартном образце, мг/мл	По пику 2-феноксиэтанола		По пику фенола	
	Чтт	Фактор симметрии	Чтт	Фактор симметрии
0,2	292449	0,96	243931	1,1
5,0	316924	0,95	292207	0,94

Как следует из таблиц 8 и 9, значения факторов симметрии пиков для всех компонентов стандартных растворов соответствуют рекомендованному фармакопееми диапазону 0,8 - 1,5. Значения чтт для пиков фенола и 2-феноксэтанола сравнительно близки, для пика бензилового спирта этот показатель приблизительно в 1,5 раза ниже.

Далее, для данных серий стандартных растворов, с концентрациями 0,2; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 мг/мл, были рассчитаны значения стандартных отклонений и RSD времен удерживания пиков фенола и относительных времен удерживания, полученных относительно внутреннего стандарта (бензилового спирта или 2-феноксэтанола (Таблицы 10 и 11) [24, 104].

Таблица 10 – Данные расчетов стандартного отклонения и RSD времен удерживания для стандартных растворов серии 1

Концентрация фенола в растворе, мг/мл	Время удержания пика фенола, мин	Время удержания пика бензилового спирта, мин	Относительные времена удерживания
0,2	5,308	4,545	1,167877
1,0	5,303	4,540	1,168062
2,0	5,301	4,539	1,167878
3,0	5,299	4,537	1,167952
4,0	5,296	4,533	1,168321
5,0	5,295	4,530	1,168874
S	0,005	0,005	0,000
RSD	0,091	0,117	0,033

Таблица 11 - Данные расчетов стандартного отклонения и RSD времен удерживания для стандартных растворов серии 2

Концентрация фенола в растворе мг/мл	Время удержания пика фенола, мин	Время удержания пика 2-феноксэтанола, мин	Относительные времена удерживания
0,2	5,304	6,319	0,839373
1,0	5,301	6,318	0,839031
2,0	5,300	6,317	0,839006
3,0	5,298	6,316	0,838822
4,0	5,296	6,313	0,838904
5,0	5,295	6,311	0,839011
S	0,003	0,003	0,000
RSD	0,063	0,049	0,022

Как следует из таблиц 10 и 11 полученные значения стандартного отклонения времен удерживания пиков исследуемых веществ, не превышает 0,005 минут, что отвечает фармакопейным рекомендациям: не более 0,033 мин (не более 2 секунд) [24, 104], отклонения значений относительных времен удерживания близки к нулю. Однако, для растворов серии 2, значения стандартного отклонения и RSD времен удерживания пиков фенола и компонентов ниже, чем для растворов серии 1, таким образом, в качестве внутреннего стандарта был выбран 2-феноксиэтанол.

Поскольку бензиловый спирт в дальнейших экспериментах не использовали, температурный режим термостата колонки скорректировали так, чтобы обеспечить максимальное ЧТТ для пиков фенола и 2-феноксиэтанола (Таблица 12).

Таблица 12 - Новый температурный режим термостата колонки

Градиент, °С/мин	Температура, °С	Выдержка, мин
-	160	3
40	200	0,6
40	220	3

Линейность методики оценивали по коэффициенту детерминации, RSD значений каждой точки регрессионной зависимости и отклонению расчетных значений Y_i от экспериментальных значений y_i .

На начальном этапе линейность зависимости площади пика фенола от его концентрации оценивали, используя два способа расчета: прямой и в относительных единицах (по пику 2-феноксиэтанола).

Как видно из рисунков 3 и 4 регрессионные зависимости площадей пика от концентрации фенола визуально линейны, коэффициенты детерминации регрессионных зависимостей превышают минимальное рекомендуемое значение (0,99), при этом при расчете в относительных единицах коэффициент детерминации регрессионной зависимости выше - 0,999.

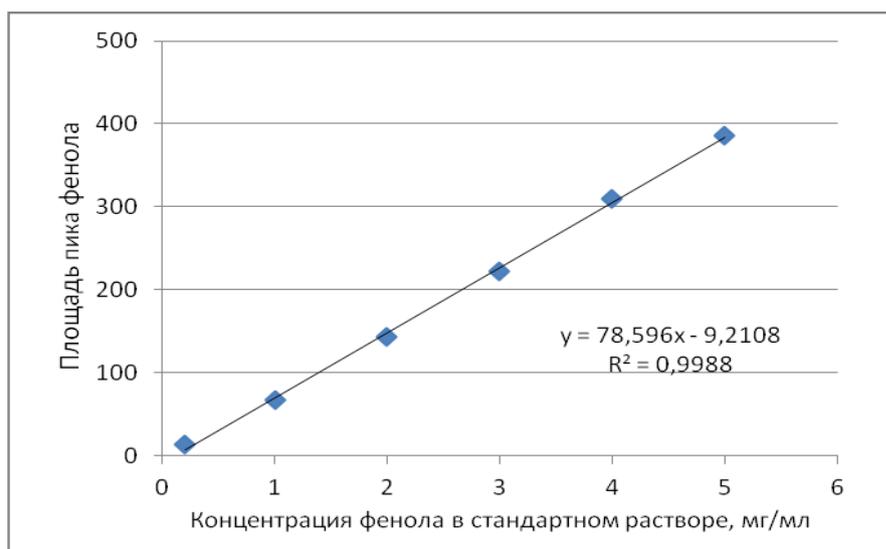


Рисунок 3 – Регрессионная зависимость площади пика фенола от его концентрации

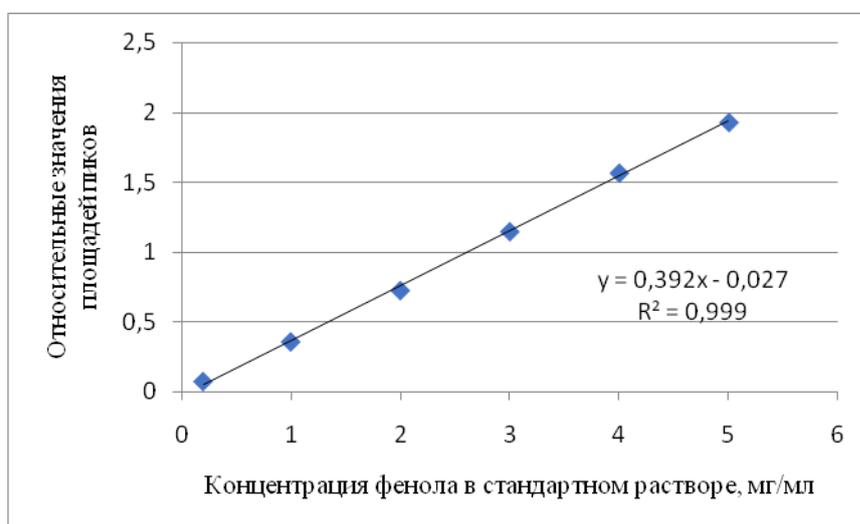


Рисунок 4 - Регрессионная зависимость относительной площади пика фенола от его концентрации

Кроме того, анализ относительных отклонений для каждой концентрации (Таблица 13) также выявил преимущество относительного способа расчета.

Таким образом, статистические показатели для двух способов расчета и регрессионные зависимости соответствуют требованиям, изложенным в ГФ РФ к калибровочному диапазону аналитических методик, но наиболее высокую повторяемость показывают расчеты в относительных единицах, полученных с применением метода внутреннего стандарта [24].

Таблица 13 - Оценка RSD значений площадей пика с применением способов расчета в прямых и относительных единицах для каждой концентрации стандартных растворов

Концентрация фенола, мг/мл	Площадь пика вн.ст.	Площадь пика фенола	Относительные значения площадей пиков
0,2	184,1	13,4	0,073
	183,5	13,9	0,075
	184,3	13,2	0,072
<i>X</i>	<i>184,0</i>	<i>13,5</i>	<i>0,073</i>
<i>S</i>	<i>0,42</i>	<i>0,36</i>	<i>0,002</i>
<i>RSD%</i>	<i>0,23</i>	<i>2,67</i>	<i>2,131</i>
1	187,5	66,2	0,353
	187	67	0,358
	190,1	68,1	0,358
<i>X</i>	<i>188,2</i>	<i>67,1</i>	<i>0,357</i>
<i>S</i>	<i>1,66</i>	<i>0,95</i>	<i>0,003</i>
<i>RSD%</i>	<i>0,88</i>	<i>1,42</i>	<i>0,810</i>
2	194,5	140,9	0,724
	196,3	142,5	0,726
	198,6	143,7	0,724
<i>X</i>	<i>196,5</i>	<i>142,4</i>	<i>0,725</i>
<i>S</i>	<i>2,06</i>	<i>1,40</i>	<i>0,001</i>
<i>RSD%</i>	<i>1,05</i>	<i>0,99</i>	<i>0,165</i>
3	192,5	219,3	1,139
	193	222,9	1,155
	193,6	222,3	1,148
<i>X</i>	<i>193,0</i>	<i>221,5</i>	<i>1,147</i>
<i>S</i>	<i>0,55</i>	<i>1,93</i>	<i>0,008</i>
<i>RSD%</i>	<i>0,29</i>	<i>0,87</i>	<i>0,699</i>
4	193,3	301,4	1,559
	199,2	312,2	1,567
	199,5	313,5	1,571
<i>X</i>	<i>197,3</i>	<i>309,8</i>	<i>1,566</i>
<i>S</i>	<i>3,50</i>	<i>6,64</i>	<i>0,006</i>
<i>RSD%</i>	<i>1,77</i>	<i>2,15</i>	<i>0,390</i>
5	200,2	386,2	1,929
	198	381,1	1,925
	202,3	391,1	1,933
<i>X</i>	<i>200,2</i>	<i>386,1</i>	<i>1,929</i>
<i>S</i>	<i>2,15</i>	<i>5,00</i>	<i>0,004</i>
<i>RSD%</i>	<i>1,07</i>	<i>1,29</i>	<i>0,207</i>

Далее все расчеты проводили методом внутреннего стандарта. В качестве внутреннего стандарта использовали 2-феноксиэтанол.

Оценивали RSD значений относительных площадей пика фенола в условиях промежуточной прецизионности, проведя три независимых испытания (Таблица 14).

Таблица 14 - Оценка RSD значений относительных площадей пика фенола, полученных для каждой концентрации стандартных растворов в условиях промежуточной прецизионности

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	SRD, %
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

Как следует из таблицы 14, значения RSD не превышают 1%, для всех концентраций, кроме самой низкой 0,2 мг/мл, для которой RSD составило 2,6% в условиях промежуточной прецизионности.

Поскольку даже при высоком коэффициенте детерминации 0,999, могут наблюдаться отклонения от линейной области отдельных точек, особенно в области высоких и низких концентраций, в соответствии с рекомендациями ICH по валидации аналитических методик [50, 93, 139], оценивали отклонение расчетных значений Y_i площадей пиков от экспериментальных значений y_i для каждой из концентраций (Рисунок 5, Таблица 15).

Визуальная оценка линейности показывает незначительные отклонения расчетных значений относительных площадей пиков фенола от экспериментальных (Рисунок 5).

Величины отклонений (t) расчетных значений от экспериментальных рассчитывали по формуле 4 (Таблица 15).

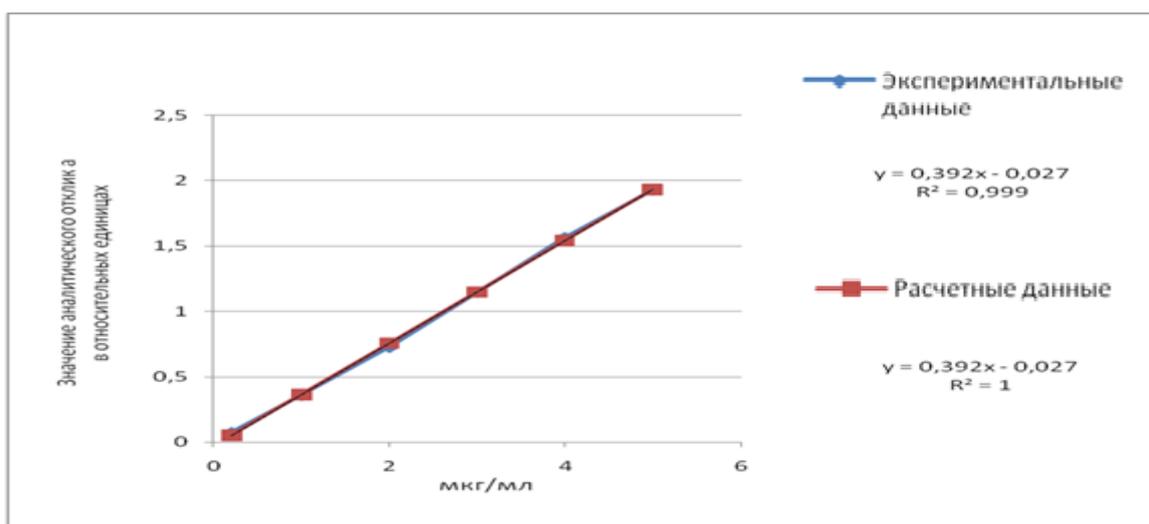


Рисунок 5 – Оценка линейности методики

Таблица 15 - Оценка отклонений расчетных значений аналитического отклика от экспериментальных значений для каждой из концентраций регрессионной зависимости

Концентрации фенола в стандартных растворах, мкг/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

Стандартное отклонение экспериментальных значений от расчетных (SD_0), рассчитанное по формуле 5, составило 0,02325.

Стандартное отклонение экспериментальных значений от среднего значения относительной площади пика (SD_y), рассчитанное по формуле 6, составило 0,7137.

Среднее значение относительной площади пика (\bar{y}) рассчитанное по формуле 7 составило 0,966. При этом количество точек регрессионной зависимости (n) равно 6.

Величину t сравнивали с критическим (табличным) значением критерия Стьюдента t (95%, $f=n-2$) которое составляет 2,776 (95%, $f=4$).

Как следует из таблицы 15, результаты расчетов отклонения экспериментальных значений относительных площадей пиков фенола от расчетных значений для каждой точки регрессионной зависимости, ниже критического табличного значения критерия (2,776), что подтверждает линейность методики в исследуемом диапазоне концентраций от 0,2 до 5,0 мг/мл.

Коэффициент детерминации регрессионной зависимости: выше 0,999, а также RSD значений относительных площадей пика фенола, не превышающих 3% в условиях воспроизводимости, показывают возможность построения калибровочной характеристики с использованием трех калибровочных стандартов.

Аналитическую область методики выбрали в диапазоне от 1,0 мг/мл до 5,0 мг/мл, с более чем 20% запасом нижней и верхней границ от возможного содержания фенола в ИЛП (от 1,5 мг/мл до 4,0 мг/мл). Калибровочную характеристику строили с использованием трех стандартных растворов с концентрациями 1,0; 3,0 и 5,0 мг/мл.

Аналитическую область методики выбирали с учетом содержания фенола в ИЛП. Поэтому за аналитическую область методики приняли диапазон концентраций от 1,0 до 5,0 мг/мл фенола с более чем 20%-ным запасом.

Предел количественного определения (ПКО) и предел обнаружения (ПО) рассчитывали в соответствии с указаниями в ОФС «Валидация аналитических методик» ГФ РФ [26]. Значения данных показателей при расчете составили: $ПКО = 10 \times S/b = 0,079$ мг/мл и $ПО = 3,3 \times S/b = 0,0261$. Расчет вели, учитывая уравнения калибровочных зависимостей, полученные при определении линейности.

Расчет содержания фенола в испытуемых образцах производился с использованием уравнения регрессионной зависимости относительной

площади пика от концентрации фенола. При расчете так же учитывали массу точной навески, взятой для приготовления рабочего стандартного раствора фенола и чистоту использованного реактива фенола.

Таким образом, при обработке экспериментальных данных показана линейность методики в диапазоне от 0,2 мг/мл до 5,0 мг/мл. Расчет методом внутреннего стандарта (в относительных единицах) повышает пецизионность методики. Выбран внутренний стандарт – 2-феноксиэтанол.

На стадии выбора внутреннего стандарта скорректирован температурный режим термостата колонки: начальная температура 160⁰С (3 мин), градиент 40⁰С/мин до температуры 200⁰С (0,6 мин), градиент 40⁰С/мин до температуры 220⁰С.

Аналитическая область методики установлена в диапазоне концентраций от 1,0 до 5,0 мг/мл фенола, с использованием трех стандартных растворов с концентрациями 1,0; 3,0 и 5,0 мг/мл.

Остальные условия хроматографирования остались без изменений.

Специфичность, точность (правильность и прецизионность)

Возможное влияние компонентов ИЛП на определение фенола и его производных исследовали на примере вакцин и препаратов аллергенов, содержащих помимо фенола, белки, полисахариды, вспомогательные вещества органической и неорганической природы. Также в качестве испытуемых растворов модельные смеси вакцин с добавлением фенола, 2-феноксиэтанола и формальдегида в различных концентрациях (образец 14, модельные смеси 1-4) (Рисунки 6-10).

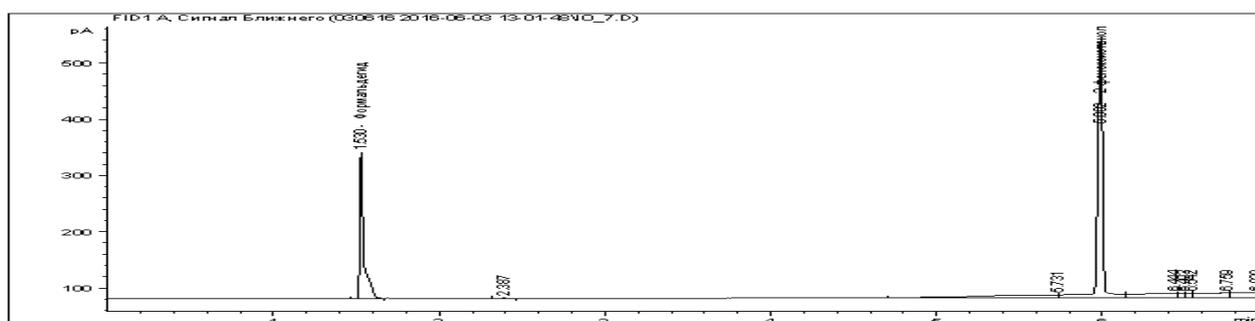


Рисунок 6 - Хроматограмма образца 14

смеси), смещение базовой линии, обусловленное температурным режимом, не влияет на идентификацию пиков фенола и 2-феноксиэтанола в следовых концентрациях (Рисунки 7 и 9). Присутствие консерванта тиомерсала не позволяет идентифицировать пики фенола и его производных (Рисунок 10), в сравнении с бесконсервантной формой того же препарата (Рисунок 9). Однако, препараты, в состав которых входит одновременно тиомерсал и фенол, отсутствуют. Таким образом, показано отсутствие влияния компонентного состава ИЛП на определение фенола, что дает возможность прямого определения фенола без предварительной пробоподготовки, например, экстракции.

Испытания образцов № 1-4, 10 проводили в условиях промежуточной прецизионности: пять независимых испытаний по две параллельные пробы для каждого образца (Таблица 16).

Таблица 16 – Первичные данные и обработка результатов определения концентраций фенола в испытуемых образцах ИЛП методом ГХ

Образец	Испытание 1	Испытание 2	Испытание 3	Испытание 4	Испытание 5	X _{ср}	S	RSD%
№1	2,48	2,48	2,51	2,39	2,41	2,46	0,036	1,45
	2,46	2,48	2,47	2,45	2,45			
№2	2,48	2,48	2,51	2,37	2,45	2,44	0,100	4,09
	2,51	2,5	2,48	2,44	2,45			
№3	2,17	2,15	2,04	1,97	2,11	2,09	0,086	4,11
	2,17	2,15	2,04	2,12	1,93			
№4	1,30	1,29	1,32	1,29	1,28	1,29	0,022	1,73
	1,31	1,29	1,24	1,31	1,28			
№10	1,87	1,89	1,86	1,83	1,83	1,87	0,028	1,48
	1,89	1,9	1,89	1,83	1,86			

Как следует из таблицы 16, результаты содержания фенола в испытуемых образцах ИЛП, полученные с применением разработанной методики, соответствуют требованиям НД (Таблица 1). RSD полученных результатов в условиях промежуточной прецизионности – не превышают 5%.

Результаты, представленные в таблице 16, сравнивали с аналогичными выборками данных полученных с применением спектрофотометрического и колориметрического методов (Таблица 17).

Таблица 17 – Сравнительный анализ результатов определения фенола

Образец ИЛП	Средние значения концентраций фенола в мг/мл, полученные различными методами.			Хобщ,ср	Scp	RSD%
	Колори метрический	Спектрофото метрический	ГЖХ			
	Хср1 (n=10)	Хср2(n=10)	Хср3(n=10)			
№1	2,06	2,08	2,09	2,08	0,015	0,7
№2	2,41	2,46	2,46	2,44	0,029	1,2
№3	2,56	2,59	2,44	2,53	0,079	3,1
№4	1,23	1,27	1,29	1,26	0,031	2,4
№10	1,77	2,13	1,87	1,92	0,186	9,7

Как следует из таблицы 17, максимальное значение RSD не превышает 10%, для четырех из 5 образцов значение RSD не превышает 3,1%, для результатов, полученных с применением разных методов.

Таким образом, результаты определения фенола в модельных растворах и образцах ИЛП подтверждают возможность применения разработанной методики для количественного определения фенола, методом ГЖХ в ИЛП.

Кроме того, специфичность методики оценивали, сравнивая хроматограммы холостого (этанол 96%), стандартного и испытуемого растворов. В качестве стандартного раствора использовали смесь раствора фенола с концентрацией 3 мг/мл (1 мл) и раствора 2-феноксизэтанола с концентрацией 5 мг/мл (0,5 мл). Испытуемые растворы готовили также как и стандартные, используя вместо раствора фенола образцы ИЛП (1-12) (Рисунки 11-13).

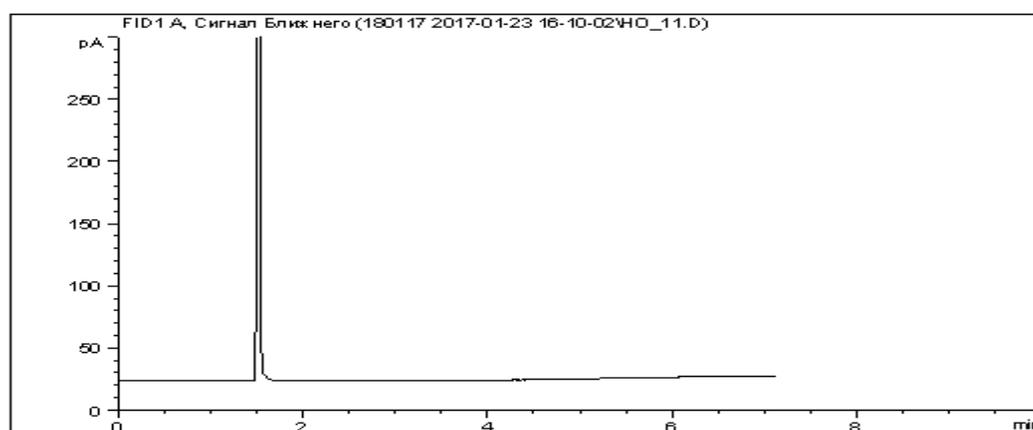


Рисунок 11 - Хроматограмма холостого раствора

На хроматограмме холостого раствора пики фенола и 2-феноксиэтанола отсутствуют (Рисунок 11). На хроматограммах стандартного и испытуемого растворов присутствуют пики фенола и 2-феноксиэтанола, совпадающие по временам удерживания и интенсивности (Рисунки 12-13): пик фенола около 5,277 - 5,278 и пик 2-феноксиэтанола около 6,282.

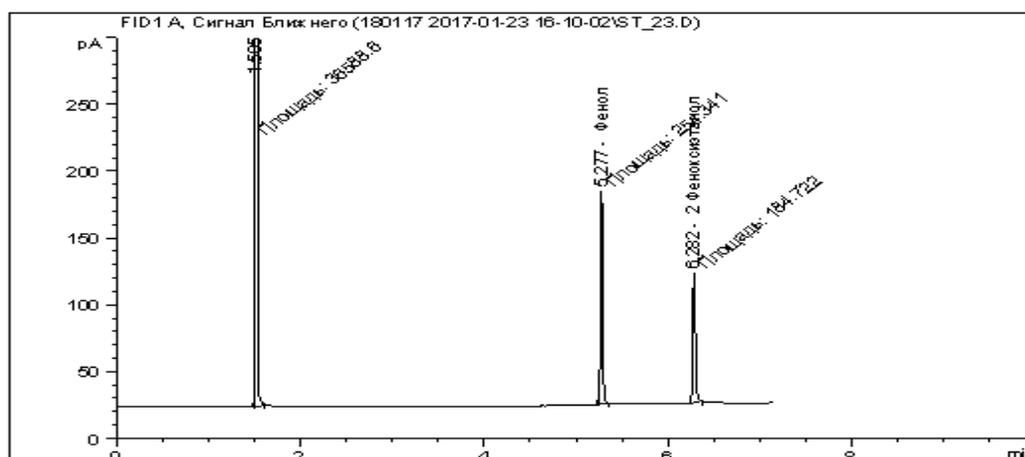


Рисунок 12 - Типичная хроматограмма стандартного раствора

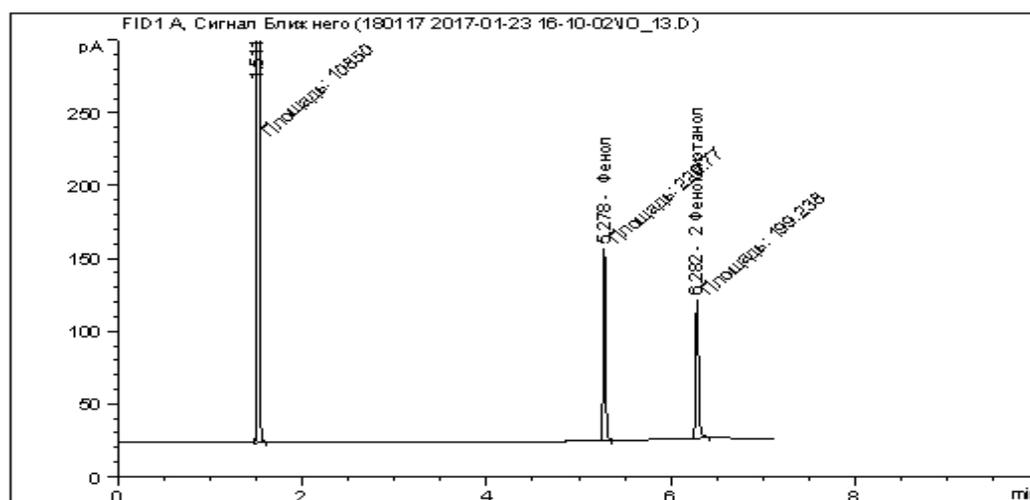


Рисунок 13 - Типичная хроматограмма испытуемого раствора

На хроматограммах испытуемых растворов отсутствуют дополнительные пики в области времен удерживания пиков фенола и 2-феноксиэтанола.

Полученные результаты подтверждают отсутствие неспецифического влияния компонентов матрицы ИЛП на разделение смеси и возможность однозначной идентификации пика фенола.

Правильность и прецизионность оценивали, используя образец 3 ИЛП, содержащий фенол в концентрации от 2,25 до 2,75 мг/мл и модельные

растворы образца 3 с добавлением известного количества фенола. Для этого использовали в качестве испытуемых растворов модельные растворы образца 3 с добавлением известного количества фенола (ИР2 - ИР5) и без него (ИР1):

ИР1 - 1,0 мл образца 3 + 0,25 мл раствора 2-феноксиэтанола 10 мг/мл + 0,25 мл этанола,

ИР2 – 1,0 мл образца 3 + 0,25 мл раствора 2-феноксиэтанола 10 мг/мл + 0,04 мл раствора фенола 5 мг/мл + 0,21 мл этанола,

ИР3 – 1,0 мл образца 3 + 0,25 мл раствора 2-феноксиэтанола 10 мг/мл + 0,08 мл раствора фенола 5 мг/мл + 0,17 мл этанола,

ИР4 – 1,0 мл образца 3 + 0,25 мл раствора 2-феноксиэтанола 10 мг/мл + 0,12 мл раствора фенола 5 мг/мл + 0,13 мл этанола,

ИР5 – 1,0 мл образца 3 + 0,25 мл раствора 2-феноксиэтанола 10 мг/мл + 0,2 мл раствора фенола 5 мг/мл + 0,05 мл этанола.

Концентрацию фенола в испытуемом растворе для каждого измерения рассчитывали по уравнению калибровочной характеристики, полученному в день испытания (Таблица 18), используя относительные значения площадей пиков (Таблица 19).

Проводили три испытания в условиях промежуточной прецизионности, используя две параллельные пробы по три введения инжектора на каждую (Таблицы 18, 19).

Таблица 18 – Уравнения калибровочных характеристик

Показатели калибровочной характеристики	Испытание 1	Испытание 2	Испытание 3
Уравнения калибровочной характеристики	$y=0,465x-0,0483$	$y=0,45x+0,0167$	$y=0,4525x+0,0258$
Коэффициент детерминации калибровочной характеристики r^2	0,9998	0,9998	0,9997

Таблица 19 - Первичные значения площадей пиков и расчетные значения относительных площадей пиков, полученные для каждого испытуемого раствора ИР1-ИР5

Наименование испытуемого раствора/номер повторности	Количество фенола, добавленное в пробу, мг	испытание 1			испытание 2			испытание 3		
		Площадь пика вн.ст.	Площадь пика фенола	Относительная площадь пика	Площадь пика вн.ст.	Площадь пика фенола	Относительная площадь пика	Площадь пика вн.ст.	Площадь пика фенола	Относительная площадь пика
ИР1/1	0	198,1	231,5	1,169	176,8	205,4	1,162	170,0	206,5	1,215
		202,0	234,4	1,160	179,1	207,9	1,161	170,3	203,2	1,193
		199,2	229,8	1,154	178,7	207,6	1,162	170,1	204,5	1,202
ИР1/2	0	184,5	212,1	1,150	176,6	207,1	1,173	164,1	200,6	1,222
		187,4	214,0	1,142	177,8	207,5	1,167	159,8	197,4	1,235
		186,0	213,8	1,149	176,1	206,9	1,175	164,0	203,2	1,239
ИР2/1	0,2	187,2	231,4	1,236	177,2	219,3	1,238	162,8	201,3	1,292
		184,6	230,2	1,247	181,6	225,1	1,240	165,5	215,0	1,299
		187,9	230,7	1,228	171,8	216,3	1,259	165,5	216,3	1,307
ИР2/2	0,2	182,2	226,7	1,244	174,4	220,5	1,264	167,4	217,8	1,301
		189,1	232,1	1,227	173,7	218,8	1,260	162,9	217,0	1,332
		180,8	225,7	1,248	173,9	219,4	1,262	164,1	215,1	1,311
ИР3/1	0,4	182,9	246,1	1,346	173,1	234,5	1,355	166,1	231,2	1,392
		186,0	247,8	1,332	174,2	237	1,361	163,4	230,2	1,409
		183,6	248,0	1,351	173,8	236,5	1,361	165,9	231,4	1,395
ИР3/2	0,4	180,9	246,3	1,362	173	233,2	1,348	170,4	233,8	1,372
		183,3	245,6	1,340	173	234,7	1,357	167,0	231,7	1,387
		182,1	245,0	1,345	173,5	235	1,354	169,0	233,7	1,383

Продолжение таблицы 19

ИР 4/1	0,6	186,1	267,4	1,437	172,7	250,6	1,451	169,8	249,5	1,469
		179,1	260,0	1,452	169,4	252,3	1,489	166,5	249,9	1,501
		182,1	261,9	1,438	172,4	253	1,468	166,4	249,1	1,497
ИР 4/2	0,6	182,0	260,5	1,431	159,9	235,8	1,475	153,0	230,4	1,506
		187,5	270,9	1,445	159	233,7	1,470	151,8	229,9	1,514
		186,3	266,4	1,430	166,6	239,9	1,440	166,6	239,9	1,440
ИР5/1	1,0	182,5	294,9	1,616	167	282	1,689	166,9	280,3	1,679
		182,0	298,2	1,638	172,4	285,2	1,654	168,3	282,7	1,680
		178,0	289,5	1,626	169,7	282,6	1,665	163,8	280,5	1,712
ИР 5/2	1,0	180,2	292,6	1,624	168,6	282,5	1,676	165,4	279,9	1,692
		180,1	293,0	1,627	169,3	281,4	1,662	166,2	278,4	1,675
		179,6	290,2	1,616	169,5	283,1	1,670	164,6	277,2	1,684

Промежуточную прецизионность методики оценивали, рассчитывая стандартное отклонение и RSD средних значений по результатам трех испытаний (Таблица 20).

Таблица 20 – Оценка промежуточной прецизионности методики

Наименование испытуемого раствора	испытание 1	испытание 2	испытание 3	\bar{x}	$S\sigma$	RSD σ ,%
ИР1	2,62	2,54	2,63	2,59	0,04	1,54
	2,60	2,54	2,58			
	2,58	2,54	2,60			
	2,58	2,57	2,64			
	2,56	2,56	2,67			
	2,58	2,57	2,68			
\bar{x}	2,59	2,56	2,63			
ИР2	2,76	2,71	2,80	2,78	0,04	1,56
	2,79	2,72	2,81			
	2,74	2,76	2,83			
	2,78	2,77	2,82			
	2,74	2,76	2,89			
	2,79	2,77	2,84			
\bar{x}	2,77	2,75	2,83			
ИР3	3,00	2,97	3,02	3,00	0,02	0,64
	2,97	2,99	3,06			
	3,01	2,99	3,03			
	3,03	2,96	2,98			
	2,99	2,98	3,01			
	3,00	2,97	3,00			
\bar{x}	3,00	2,98	3,01			
ИР4	3,19	3,19	3,19	3,22	0,02	0,52
	3,23	3,27	3,26			
	3,20	3,22	3,25			
	3,18	3,24	3,27			
	3,21	3,23	3,29			
	3,18	3,16	3,13			
\bar{x}	3,20	3,22	3,23			
ИР5	3,58	3,72	3,65	3,65	0,04	1,18
	3,63	3,64	3,66			
	3,60	3,66	3,73			
	3,60	3,69	3,68			
	3,60	3,66	3,64			
	3,58	3,67	3,66			
\bar{x}	3,60	3,67	3,67			

Значение RSD полученных результатов не превышает 2% при оценке промежуточной прецизионности методики (Таблица 20).

Для оценки правильности методики рассчитывали величину степени извлечения (R) и отклонение степени извлечения от 100% (E) фенола по формулам 27 и 28 соответственно, в образцах ИР2-ИР5 [78]. За теоретическое значение (x_i) принимали количество фенола, полученное в ИР1 с учетом добавленного количества (Таблица 21).

Таблица 21 – Степень извлечения и отклонение степени извлечения фенола от 100% в образцах ИР2-ИР5

Идентификационный номер испытуемого раствора	Теоретическое значение концентрации фенола (x_i), мг/мл	Экспериментальное значение концентрации фенола (y_i), мг/мл ($n=18$)	Степень извлечения (R), %	Отклонение степени извлечения от 100%, (E)
ИР2	2,79	2,78	99,7	- 0,3
ИР3	2,99	3,00	100,2	+ 0,2
ИР4	3,19	3,22	100,8	+ 0,8
ИР5	3,59	3,65	101,6	+ 1,6
Среднее значение процента выявления			100,6	
Стандартное отклонение процента выявления			0,81	
RSD процента выявления, %			0,80	

Как следует из таблицы 21, при оценке правильности методики получены значения степени извлечения (R) 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%) [79, 139].

Дополнительно правильность и отсутствие систематической ошибки методики оценивали путем анализа регрессионной зависимости между теоретическими (x_i) и экспериментальными (y_i) значениями фенола (Таблица 21, Рисунок 14).

Регрессионная зависимость, представленная на рисунке 14А, визуалью линейна. Далее оценивали статистическую значимость отклонений углового коэффициента от 1 и коэффициента сдвига от 0, при $n=4$.

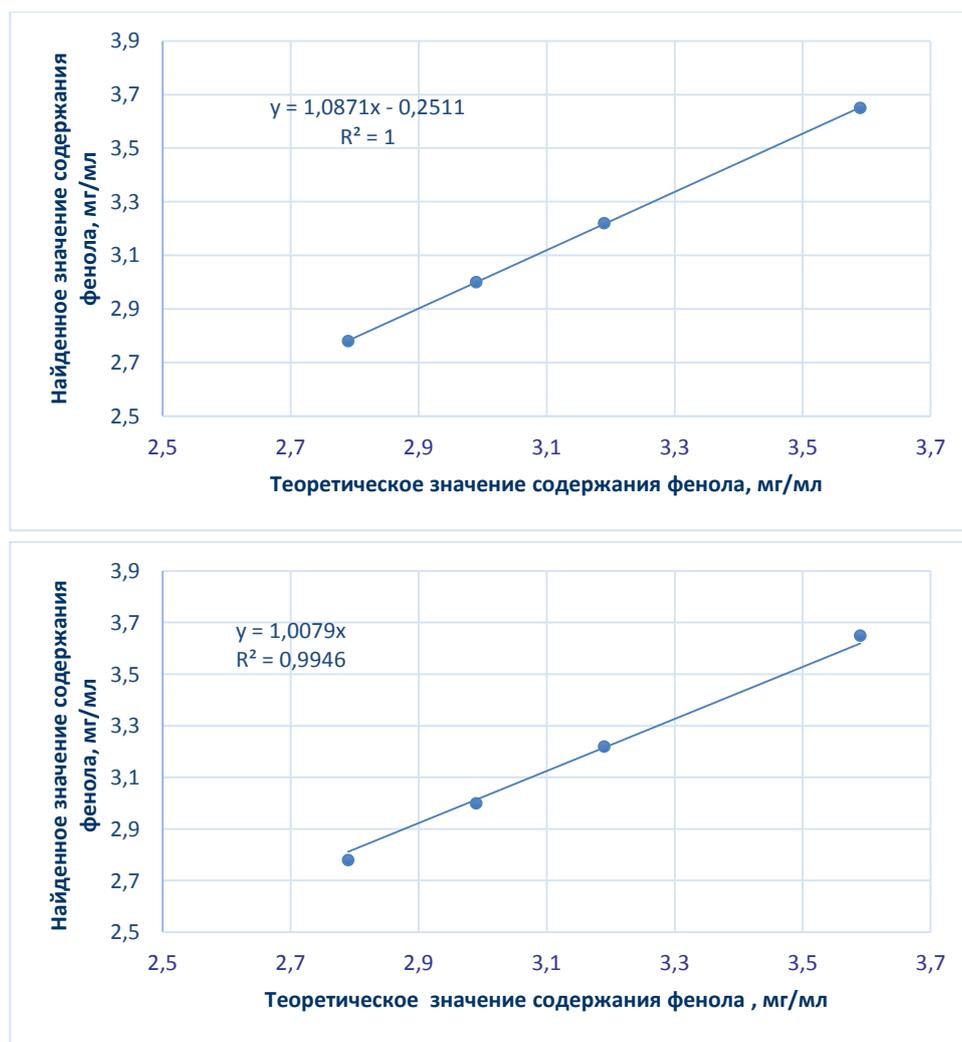


Рисунок 14 - Регрессионная зависимость между теоретическим и экспериментальным значениями содержания фенола в ИР2-ИР5 (А, Б)²

Получили следующие значения статистических величин:

Дисперсия значений x_i относительно y_i (S_0^2) рассчитанная по формуле 8 составила 0,000687175, где число степеней свободы (f), рассчитанное по формуле 9 равно 2.

Дисперсия углового коэффициента уравнения калибровочной характеристики (S_b^2), рассчитанная по формуле 10 составила 0,001963357.

Дисперсия коэффициента сдвига уравнения калибровочной характеристики (S_a^2), рассчитанная по формуле 11 составила 0,01952970.

² А - зависимость с учетом коэффициента сдвига (а), Б - зависимость без учета коэффициента сдвига (а)

Стандартные отклонения коэффициентов калибровочной характеристики (S_b) и (S_a), рассчитанные по формулам 12 и 13 составили 0,04431 и 0,13974874 соответственно.

Полуширина доверительных интервалов отклонений коэффициентов калибровочной характеристики (Δb) и (Δa), рассчитанная по формулам 14 и 15 составила 0,1905 и 0,6009 соответственно, при доверительной вероятности 95%.

Данные расчета показывают, что значение углового коэффициента - калибровочной характеристики 1,0871 (Рисунок 14А) отвечает диапазону $1 \pm 0,1905$ и статистически не отличен от 1. Значение коэффициента сдвига - 0,2511, отвечает диапазону $0 \pm 0,6009$ и статистически не отличен от 0. Коэффициент детерминации регрессионной зависимости равен 1,0000.

Регрессионная зависимость между теоретическими и экспериментально найденными значениями концентраций фенола, а также показатели степени извлечения и отклонения степени извлечения от 100%, подтверждают правильность методики.

Статистическую значимость систематической ошибки методики доказывали с помощью регрессионного анализа, сравнивая регрессионные зависимости между теоретическими x_i и экспериментальными y_i значениями концентраций фенола с учетом и без учета коэффициента сдвига уравнения (Рисунок 14А, 14Б, Таблица 21) [50, 93]. Значение F-критерия ($F(P, f_1 = N - 1, f_2 = N - 2)$), рассчитанное по формуле 16 составило 1,00016, при $N=72$ и степенях свободы $f_1=71, f_2=70$ при доверительной вероятности 95%.

Дисперсии отклонений теоретических значений от экспериментальных ($S_{0_1}^2$ и $S_{0_2}^2$), полученные при обчете зависимостей без учета и с учетом коэффициента сдвига, рассчитанные по формулам 17 и 18 составили $1,405845E-5$ и $1,963357E-5$ соответственно [93].

Полученное расчетное значение критерия Фишера равно 1,00016 меньше критического табличного значения F (95%, $f_1=71, f_2=70$) равного 1,35,

таким образом, подтверждается отсутствие систематической ошибки методики [50, 93].

Таким образом, разработана следующая методика определения:

Оборудование и реактивы

Газовый хроматограф с пламенно-ионизационным детектором.

Холостой образец – этанол 96%, используемый для приготовления рабочего стандартного раствора и раствора внутреннего стандарта.

Внутренний стандарт – раствор 2-феноксиэтанола в этаноле, концентрацией 5 мг/мл. Приготовление: 50,0 мг 2-феноксиэтанола растворяют в этаноле, объем раствора 10 мл.

Рабочий стандартный раствор фенола - раствор фенола в этаноле концентрацией 5 мг/мл. Приготовление: 50,0 мг фенола (точная навеска) растворяют в этаноле, объем раствора 10 мл.

Испытуемый раствор. 1,0 мл образца ИЛП, содержащий фенол в концентрации 1,5-4,0 мг/мл вносят в вialу для хроматографирования объемом 1,5 мл, добавляют 0,5 мл внутреннего стандарта, перемешивают. Испытуемый раствор готовят в двух повторностях.

Для построения *калибровочной характеристики* готовят стандартные растворы с концентрациями 1,0; 3,0 и 5,0 мг/мл. Для этого в отдельные вialы, объемом 1,5 мл, помещают 0,2; 0,6 и 1,0 мл рабочего стандартного раствора фенола, доводят объем водой очищенной до 1 мл, добавляют по 0,5мл раствора внутреннего стандарта, перемешивают.

Разработаны следующие хроматографические условия:

Для колонки с фазой полиэтиленгликоль и размерами 30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм были подобраны хроматографические условия, обеспечивающие максимальную эффективность хроматографической системы (фактор симметрии пиков, чтт, разрешение пиков) для смеси фенола и компонентов: 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.

Для расчета используют метод внутреннего стандарта [24].

В ходе разработки методики и валидационных исследований были установлены критерии оценки пригодности хроматографической системы, выполнение которых обеспечивает качество полученных результатов. 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, чтт не менее 180000.

Таблица 22 - Валидационные параметры методики определения фенола ГЖХ

Валидационный параметр	Определяемая величина	Критерии приемлемости	Полученный результат	Соответствие (да/нет)
Специфичность	Отсутствие пиков с временами удерживания близкими к временам удерживания фенола и 2-феноксизтанола.	Отсутствие влияния компонентов матрицы на определение.	В области удерживания пиков фенола и 2-феноксизтанола отсутствуют посторонние пики.	Да
Промежуточная прецизионность	RSD	≤ 10,0%	1,56%	Да
Линейность и диапазон	Визуальная оценка калибровочной характеристики	Линейная регрессия	Линейная регрессия	Да
	Коэффициент корреляции (R)	$R \geq 0,99$	0,999	Да
Правильность	Среднее значение выявления	98,0%-102,0%	100,6%	Да
ПО	Минимальное обнаруживаемая концентрация	-	0,026мг/мл	Да
ПКО	Минимальное определяемое количество	-	0,079мг/мл	Да

Все валидационные характеристики методики, установленные в ходе испытаний (Таблица 22) соответствуют фармакопейным требованиям и подтверждают возможность ее применения при контроле качества ИЛП [24, 104].

2.2. Разработка и валидация методики определения фенола в ИЛП методом ВЭЖХ

Выбор колонки и условий хроматографирования

Определение фенола и родственных ему соединений методом ВЭЖХ является хорошо известным аналитическим способом количественной оценки данного вещества (смеси веществ) в различных по своему составу и назначению средах [22, 35, 54, 57, 82, 112, 156, 159, 172, 178, 194, 201, 208, 210, 211, 219, 223, 236].

Из вышеуказанных оригинальных источников и методических рекомендаций по определению фенола известно, что традиционно используется метод ОФ ВЭЖХ, где:

- в качестве хроматографической колонки, как правило, используют колонку с неподвижной фазой C_{18} . При этом в зависимости от сложности состава исследуемой смеси и количества определяемых родственных фенольных соединений, могут быть использованы колонки следующих параметров: длина – от 50 до 250 мм, внутренний диаметр – от 2,1 до 4,6 мкм, размер зерна – от 1,7 до 5 мкм;

- в качестве элюента используют ацетонитрил или метанол, в смеси с 0,1-5,0% водными растворами органических кислот (муравьиной, уксусной или ТФУ), либо ацетатным или фосфатным буферными растворами с низким значением pH;

- детектирование продуктов разделения проводят в УФ-спектре при длине волны 269-270 нм (максимум поглощения фенола), а также с помощью масс-детектирования (преимущественно для определения следовых количеств фенола в составе проб, содержащих сложную смесь родственных компонентов и подвергающихся сложной предварительной пробоподготовке, включающей экстракцию и концентрирование аналитов) [31].

При выборе колонки и условий хроматографирования исходили из вышеуказанных сведений, а также состава ИЛП и исходной концентрации фенола.

Известно, что выбор параметров колонки зависит от сложности состава исследуемой смеси и количества определяемых родственных соединений: чем больше длина колонки, меньше ее внутренний диаметр и степень зернения, тем эффективнее разделение близких по строению молекул. Однако оптимизация эффективности разделения за счет характеристик колонки, как правило, приводит к увеличению времени хроматографирования, что может многократно увеличить расход подвижной фазы и время анализа в целом. Поскольку в составе препаратов ИЛП не содержатся соединения фенольного ряда и фенол одновременно, а диапазон концентраций фенола достаточно высок, была выбрана колонка C_{18} с размерами $150 \text{ мм} \times 4,6 \text{ мкм}$, зернением 5 мкм .

Детектирование проводили с помощью диодно-матричного детектора, при 270 нм .

Состав подвижной фазы (выбор компонентов и их соотношение), а также степень разведения образцов ИЛП подбирали, с учетом рекомендаций по критериям приемлемости - наличие сигнала в форме визуально симметричного, имеющего одну вершину пика, с отклонением значений площади не более 3% при десятикратном воспроизведении ГФ РФ [24] и ЕФ [104]. Также учитывали, что по сравнению с метанолом, ацетонитрил обладает большей элюирующей силой. Таким образом, использование ацетонитрила меньшей концентрации в сочетании с раствором уксусной кислоты, может обеспечить достаточно высокую скорость элюирования и, как следствие, уменьшить время хроматографирования.

Одновременно подбирали скорость потока, объем инъекции и степень разведения испытуемого препарата, используя образец 3 и контролируя критерии приемлемости.

Лучшие результаты разделения были получены в следующих условиях:

- 1 часть ацетонитрила на 4 части $0,5\%$ уксусной кислоты;
- скорость потока $1,0 \text{ мл/мин}$ в изократическом режиме;

- степень разведения образца 1:25 (конечная концентрация фенола в испытуемом растворе от 0,09 до 0,11 мг/мл);

- объем инъекции - 20 мкл.

В данных условиях получили визуально симметричные, одиночные пики с коэффициентом симметрии 0,9 и отклонением значений площади 1,0% при десятикратном воспроизведении. Время хроматографирования составило 12 минут (Рисунок 15).

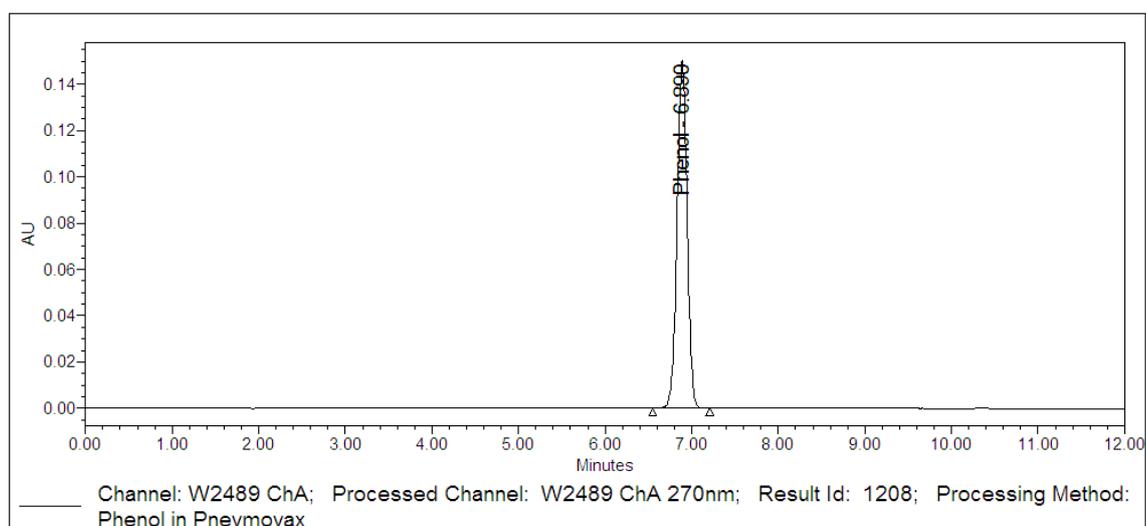


Рисунок 15 - Типичная хроматограмма образца ИЛП

Исследование линейности актуального диапазона концентраций, установление аналитической области методики, выбор способа обработки результатов

При разработке методики определения фенола ГЖХ нами был выбран метод внутреннего стандарта. Данный выбор связан с физикой процесса хроматографирования в газовой фазе, высокой чувствительностью метода, малым объемом вводимой пробы и высокой концентрацией аналита в растворе. В нашей методике объем вводимой в испаритель пробы составляет 0,5 мкл и после перехода в газовую фазу, деление пробы составляет 1:40, таким образом, через колонку проходит одна сороковая часть испарившейся пробы. При таких малых объемах возрастает доля неопределенности измерений, что сказывается на точности результатов, этой ошибки измерений можно избежать, применяя метод внутреннего стандарта.

В жидкостной хроматографии аналиты хроматографируются в более стабильной жидкой фазе, чувствительность метода ниже метода ГЖХ, а объемы проб больше. Метод внутреннего стандарта применяется здесь редко и, как правило, из-за особенностей анализируемых веществ (например, стабильности) и возможной сложности пробоподготовки, предполагающей значительные потери аналита.

В нашем случае, объем пробы составляет 20 мкл, пробоподготовка заключается в разведении образца в раз 25, спектрофотометрический способ детектирования при специфичной длине волны обеспечивает определение циклических соединений. Таким образом, для оптимизации экспериментальной части и упрощения методики мы отказались от использования внутреннего стандарта.

При выборе, диапазон аналитической области и способ приготовления калибровочных стандартов подбирали, таким образом, чтобы он соответствовал концентрациям фенола в ИЛП, при разведении в 25 раз. Готовили раствор фенола, с концентрацией 0,1 мг/мл по точной навеске 0,1000 г, путем последовательных разведений водой очищенной. Регрессионной зависимость значений площади пика от концентрации фенола строили в диапазоне от 0,05 мг/мл до 0,15 мг/мл путем изменения объема инъекции раствора фенола 0,1 мг/мл, что обеспечивает ее большую линейность, поскольку не предполагает дополнительных разведений для каждой концентрации. Для этого инжесктировали 0,010; 0,015; 0,020; 0,025 и 0,030 мл раствора фенола 0,1 мг/мл (за содержание фенола принимали значения около 0,050; 0,075; 0,100; 0,125; 0,150 мг соответственно, с учетом чистоты реактива и массы навески) (Рисунок 16).

Линейность методики оценивали по коэффициенту детерминации, относительному стандартному отклонению каждой точки регрессионной прямой и отклонению расчетных значений Y_i от экспериментальных значений y_i .

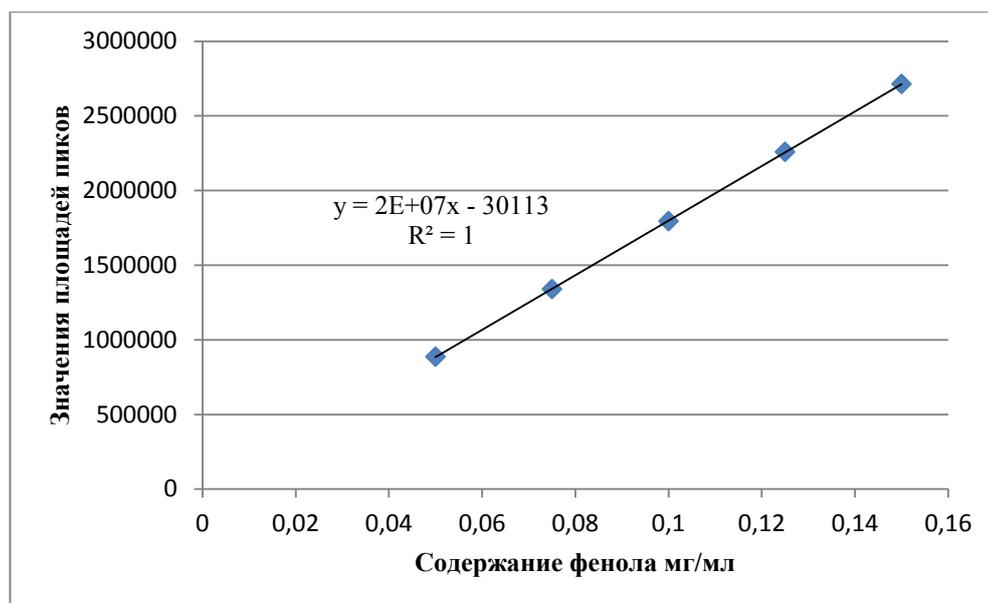


Рисунок 16 - Регрессионная зависимость площади пика от концентрации фенола

Как видно из рисунка 16, регрессионная зависимость площади пика от концентрации фенола визуально линейна. Значение коэффициента детерминации равно 1, подтверждает близкую к абсолютной линейность регрессионной зависимости в диапазоне концентраций фенола от 0,05 мг/мл до 0,15 мг/мл.

RSD значений площадей пика фенола оценивали в условиях промежуточной прецизионности, проведя три независимых испытания.

Таблица 23 - Оценка RSD значений площадей пика фенола, полученных для каждой концентрации стандартных растворов в условиях промежуточной прецизионности

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, %
0,050	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

Как следует из таблицы 23, значения RSD не превышают 0,3%, для всех концентраций в условиях промежуточной прецизионности.

В соответствии с рекомендациями ICH по валидации аналитических методик [50, 93], оценивали отклонение расчетных значений Y_i площадей пиков фенола от экспериментальных значений y_i (t) для каждой из концентраций калибровочной характеристики (Рисунок 17, Таблица 23).

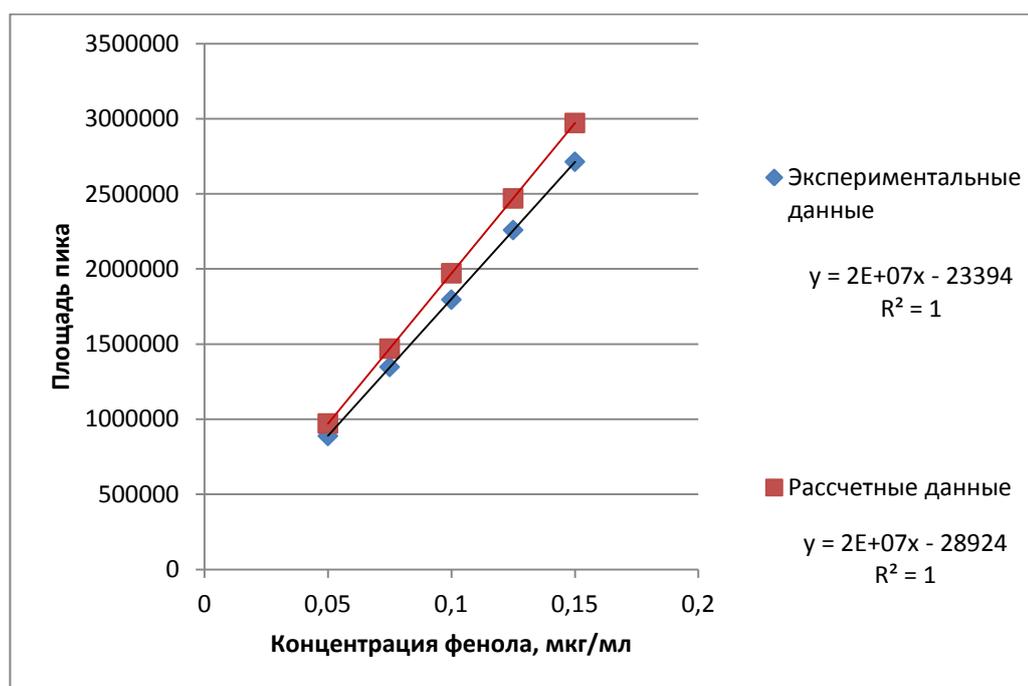


Рисунок 17 – Оценка линейности

Визуальная оценка линейности показывает незначительные отклонения расчетных значений относительных площадей пиков фенола от экспериментальных (Рисунок 17).

Величины отклонений (t) расчетных значений от экспериментальных рассчитывали по формуле 4 (Таблица 24).

Стандартное отклонение экспериментальных значений от расчетных (SD_0), рассчитанное по формуле 5, составило 236113,74.

Стандартное отклонение экспериментальных значений от среднего значения площади пика (SD_y), рассчитанное по формуле 6, составило 723224.

Среднее значение площади пика (\bar{y}) рассчитанное по формуле 7 составило 1798416,6. При этом количество экспериментальных точек (n) равно 5.

Таблица 24 - Оценка отклонений расчетных значений площади пика от экспериментальных значений для каждой из концентраций калибровочной характеристики

Концентрации фенола в стандартных растворах, мг/мл, x_i	Экспериментальные значения площади пика, y_i	Расчетные значения 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

Расчитанное значение t сравнивали с критическим (табличным) значением критерия Стьюдента t (95%, $f=n-2$) которое составляет 3,18 (95%, $f=3$).

Как следует из таблицы 24, результаты расчетов отклонения экспериментальных значений площадей пиков фенола от расчетных значений для каждой точки калибровочной характеристики, ниже критического табличного значения критерия (3,18), что подтверждает корректность методики в исследуемом диапазоне концентраций.

Предел количественного определения (ПКО) и предел обнаружения (ПО) рассчитывали в соответствии с указаниями в ОФС «Валидация аналитических методик» ГФ РФ [26]. Значения данных показателей при расчете составили: ПКО = $10 \times S/b = 0,00217$ мг/мл и ПО = $3,3 \times S/b = 0,00072$ [26]. Расчет вели, учитывая уравнения калибровочных зависимостей, полученные при определении линейности.

Расчет содержания фенола в испытуемых образцах производился с использованием уравнения регрессионной зависимости площади пика от концентрации фенола. При расчете так же учитывали массу точной навески, взятой для приготовления рабочего стандартного раствора фенола и чистоту использованного реактива фенола.

Таким образом, на этапе испытаний по разработке методики, выбрана колонка с фазой C18 с размерами 150 мм×4,6 мкм, зернением 5 мкм, 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. Время хроматографирования -12 мин. Показана линейность методики в диапазоне концентраций фенола от 0,05 мг/мл до 0,15 мг/мл, соответствующем концентрации фенола в образцах, разведенных в 25 раз, и прецизионность калибровочной характеристики. Исследуемый диапазон концентраций выбран в качестве аналитической области методики.

Специфичность, точность (правильность и прецизионность)

С применением разработанной методики проанализировали 13 образцов ИЛП, с различным составом матрицы и содержанием фенола. Исследовали возможное влияние состава матрицы ИЛП на количественное определение фенола методом ВЭЖХ и прецизионность полученных результатов (Таблица 25).

Как следует из таблицы 25, полученные результаты определения фенола с применением методики ВЭЖХ соответствуют требованиям к содержанию фенола для всех препаратов (Таблица 1).

Таблица 25 - Определение фенола в образцах ИЛП методом ВЭЖХ

Обозначение образца ИЛП	Первичные данные содержания фенола в образцах ИЛП в мг/мл по данным пяти испытаний					\bar{x} , мг/мл	S, мг/мл	RSD, %
	1	2	3	4	5			
Образец 1	2,00	1,99	1,99	2,02	1,98	1,99	0,01	0,75
	2,00	1,99	1,99	2,01	1,97			
Образец 2	2,31	2,30	2,31	2,33	2,29	2,31	0,01	0,62
	2,32	2,30	2,30	2,33	2,29			
Образец 3	2,62	2,60	2,60	2,63	2,60	2,61	0,01	0,55
	2,62	2,60	2,60	2,63	2,58			
Образец 4	1,19	1,19	1,19	1,20	1,18	1,19	0,01	0,58
	1,19	1,18	1,18	1,20	1,19			
Образец 5	1,16	1,16	1,16	1,17	1,15	1,16	0,01	0,62
	1,16	1,15	1,16	1,17	1,15			
Образец 6	1,21	1,21	1,20	1,20	1,21	1,21	0,01	0,59
	1,21	1,21	1,20	1,20	1,21			
Образец 7	1,21	1,21	1,20	1,19	1,21	1,20	0,01	0,70
	1,21	1,20	1,20	1,19	1,21			

Окончание таблицы 25

Образец 8	2,33	2,33	2,33	2,33	2,31	2,32	0,01	0,49
	2,32	2,31	2,31	2,34	2,31			
Образец 9	2,45	2,44	2,44	2,47	2,44	2,46	0,06	2,59
	2,46	2,44	2,44	2,44	2,43			
Образец 10	1,73	1,73	1,72	1,71	1,72	1,73	0,01	0,59
	1,74	1,75	1,72	1,71	1,72			
Образец 11	2,67	2,66	2,66	2,68	2,84	2,70	0,07	2,50
	2,67	2,65	2,66	2,68	2,81			
Образец 12	2,95	2,93	2,92	2,95	3,05	2,96	0,05	1,79
	2,95	2,93	2,92	2,95	3,07			
Образец 13	2,35	2,31	2,31	2,33	2,29	2,31	0,02	0,76
	2,32	2,30	2,31	2,33	2,29			

RSD значений в условиях промежуточной прецизионности не превышают 2,6 % для всех образцов. На полученных хроматограммах (Рисунки 18 - 19) всех испытуемых растворов отсутствовали пики, совпадающие по времени удерживания с пиками фенола.

Дополнительно возможность применения методики оценивали, исследуя равнозначные выборки с применением фармакопейных методик спектрофотометрической (ГФ РФ) и колориметрической (ЕФ) (Таблица 26). Таблица 26 – Сравнение средних значений (n=10) результатов определения фенола, полученных разработанной методикой в сравнении с фармакопейными

Обозначение образца ИЛП	Колориметрическая методика, мг/мл, \bar{X}_1 (n=10)	Спектрофотометрическая методика, мг/мл, \bar{X}_2 (n=10)	Методика ВЭЖХ, мг/мл, \bar{X}_3 (n=10)	\bar{X} общ, мг/мл	$S_{ср}$, мг/мл	RSD,%
Образец 1	2,06	2,08	1,99	2,04	0,04	1,94
Образец 2	2,41	2,46	2,31	2,39	0,05	2,17
Образец 3	2,56	2,59	2,61	2,59	0,08	3,06
Образец 4	1,23	1,27	1,19	1,23	0,03	2,21
Образец 5	1,20	1,19	1,16	1,18	0,01	1,26
Образец 6	1,25	1,27	1,21	1,24	0,03	2,20
Образец 7	1,25	1,24	1,20	1,23	0,02	1,53
Образец 8	2,44	2,98	2,32	2,58	0,15	5,76
Образец 9	2,60	2,86	2,46	2,64	0,12	4,40
Образец 10	1,77	2,13	1,73	1,87	0,12	6,14
Образец 11	2,80	2,86	2,70	2,78	0,06	2,23

Окончание таблицы 26

Образец 12	3,04	3,09	2,96	3,03	0,06	1,84
Образец 13	2,42	2,44	2,31	2,39	0,04	1,68

Из таблицы 26 следует, что относительное стандартное отклонение результатов измерения, полученных в сравнительном анализе трех методик, не превышает 6,2%, для 10 из 13 образцов значение RSD не более 3%.

Таким образом, результаты определения фенола в сравнении с фармакопейными методами, подтверждают возможность применения модифицированной методики ВЭЖХ для определения фенола в составе исследуемых групп ИЛП.

Специфичность методики подтверждается отсутствием пиков на хроматограмме испытуемого раствора, совпадающих со временем удерживания пика фенола (Рисунок 18).

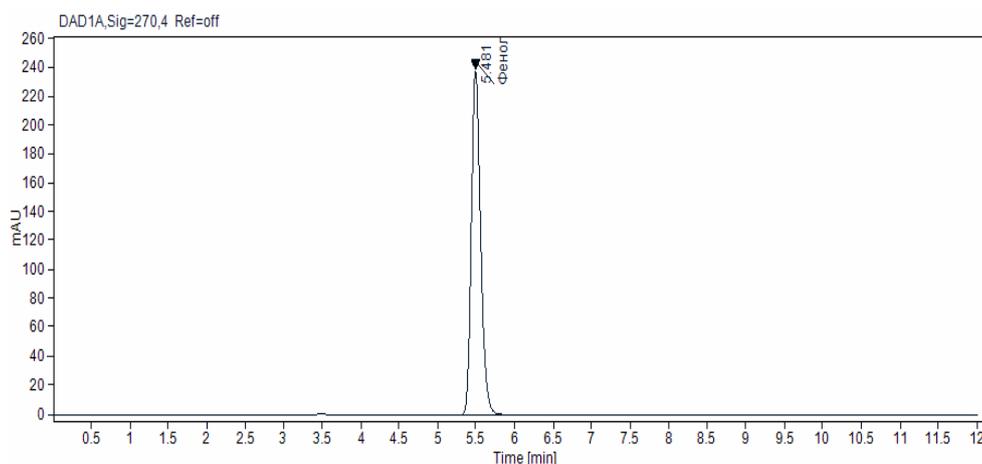


Рисунок 18 - Типичная хроматограмма испытуемого раствора образца ИЛП

Сравнивали хроматограммы холостого раствора (вода очищенная), стандартных растворов и испытуемого образца 1 (Рисунок 19). В качестве стандартных растворов делали инъекции раствора фенола, концентрацией 0,1 мг/мл, объемом 10, 20 и 30 мкл в качестве испытуемых растворов исследовали образец 1, разведенный 1:25, объем инъекции 20 мкл.

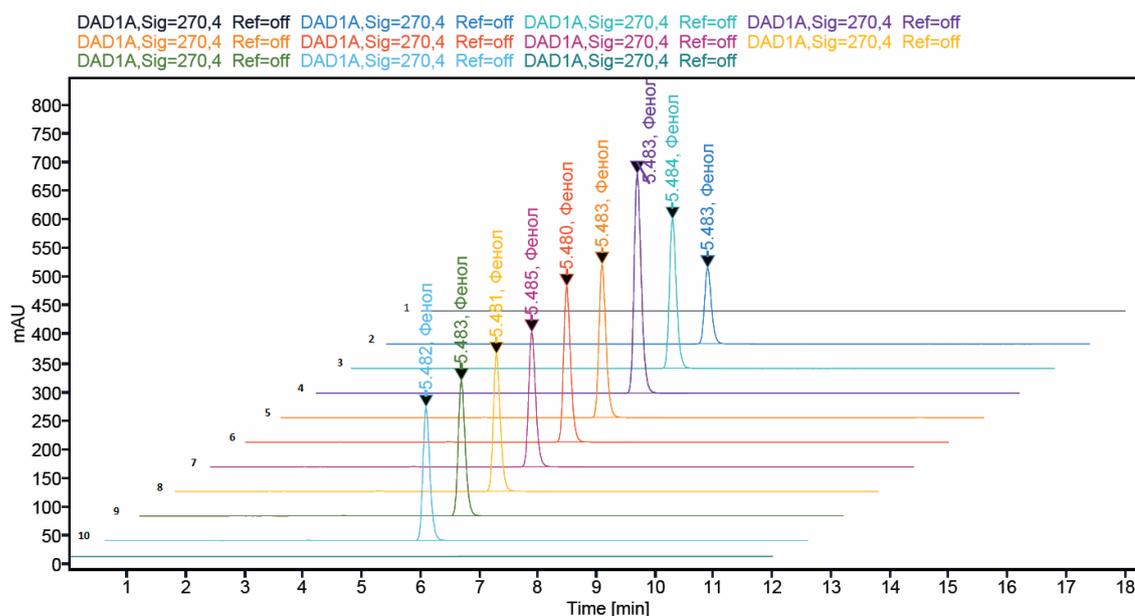


Рисунок 19 – Совмещенные хроматограммы³

На рисунке 19 видно, что на хроматограмме растворителя отсутствуют определяемые пики. По хроматограммам стандартного раствора и образца 1 на рисунке 19 определяли отклонения времен удерживания пика фенола. На хроматограммах стандартных растворов пределы времен выхода пика фенола составили: 5,483 - 5,484 минут (среднее значение 5,483 минуты). На хроматограммах испытуемых растворов образца 1: 5,480 – 5,485 минут (среднее значение 5,482 минуты). Таким образом, незначительные отклонения времен удерживания пика фенола на хроматограммах испытуемого раствора не превышает $\pm 0,003$ минуты (менее 2 секунды).

Полученные результаты подтверждают отсутствие неспецифического влияния компонентов испытуемых образцов ИЛП на возможность однозначной идентификации пика фенола.

Правильность и прецизионность оценивали, используя образец 6 ИЛП, содержащий фенол в концентрации до 1,50 мг/мл (ИР1) и модельные растворы образца 6 с добавлением известного количества фенола (ИР2 -ИР5).

³ 1 – хроматограмма 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 испытуемого растворов образцов ИЛП

Приготовление модельных растворов:

ИР1 - 1,0 мл образца 6 разбавляли в мерной колбе водой очищенной до 25 мл,

ИР2 – 1,0 мл образца 6 + 0,2 мл раствора фенола, концентрацией 1 мг/мл разбавляли в мерной колбе водой очищенной до 25 мл,

ИР3 – 1,0 мл образца 6 + 0,4 мл раствора фенола, концентрацией 1 мг/мл разбавляли в мерной колбе водой очищенной до 25 мл,

ИР4 – 1,0 мл образца 6 + 0,6 мл раствора фенола, концентрацией 1 мг/мл разбавляли в мерной колбе водой очищенной до 25 мл,

ИР5 – 1,0 мл образца 6 + 1,0 мл раствора фенола, концентрацией 1 мг/мл разбавляли в мерной колбе водой очищенной до 25 мл.

Проводили три испытания в условиях промежуточной прецизионности, используя две параллельные пробы по три введения инжектора на каждую (Таблица 27).

Таблица 27 - Первичные значения площадей пиков, полученные для каждого испытуемого раствора ИР1-ИР5

Наименование испытуемого раствора/номер повторности	Количество фенола, добавленное в пробу, мг	Площадь пика фенола		
		Испытание 1	Испытание 2	Испытание 3
<u>ИР1/1</u>	0	946755	933995	948290
		933594	948957	933461
		932019	931243	938135
<u>ИР1/2</u>	0	931069	942085	939932
		938135	939032	942290
		927984	941358	933461
<u>ИР2/1</u>	0,2	1119567	1131781	1115437
		1128542	1115437	1095655
		1101524	1129248	1091182
<u>ИР2/2</u>	0,2	1095670	1094252	1081215
		1088142	1089151	1087534
		1081547	1097122	1083752
<u>ИР3/1</u>	0,4	1237842	1248238	1252613
		1217328	1237181	1244710
		1257678	1233557	1240209

Окончание таблицы 27

<u>ИР3/2</u>	0,4	1272389	1261311	1238750
		1264182	1254852	1231699
		1265574	1246746	1239968
<u>ИР4/1</u>	0,6	1415574	1395574	1386533
		1395487	1384758	1390235
		1399572	1391457	1400123
<u>ИР4/2</u>	0,6	1405326	1395217	1409787
		1407114	1397656	1398887
		1405401	1387991	1403211
<u>ИР5/1</u>	1,0	1715628	1815628	1719163
		1745236	1807543	1721541
		1743428	1813269	1718552
<u>ИР5/2</u>	1,0	1728673	1814315	1710718
		1740246	1814115	1713092
		1779825	1819163	1712818

Концентрацию фенола в испытуемом растворе для каждого измерения рассчитывали, используя значения площадей пиков (Таблица 27) по уравнению калибровочной характеристики, полученному в день испытания (Таблица 28).

Таблица 28 – Уравнения калибровочных характеристик для каждого испытания

Показатели калибровочной характеристики	Испытание 1	Испытание 2	Испытание 3
Уравнения калибровочной характеристики	$y=2E+07x-32551$	$y=2E+07x -25760$	$y=2E+07x-32551$
Коэффициент детерминации калибровочной характеристики r^2	1,00	1,00	1,00

На основании полученных значений содержания фенола в испытуемых растворах оценивали промежуточную прецизионность методики, рассчитывая стандартное отклонение средних и RSD средних значений по результатам трех испытаний (Таблица 29).

Таблица 29 – Оценка промежуточной прецизионности методики

Наименование испытуемого раствора	испытание 1	испытание 2	испытание 3	\bar{x}	$S\sigma$	$RSD\sigma, \%$
<u>ИР1</u>	1,22	1,20	1,23	1,21	0,004	0,34
	1,21	1,22	1,21			
	1,21	1,20	1,21			
	1,20	1,21	1,22			
	1,21	1,21	1,22			
	1,20	1,21	1,21			
\bar{x}	1,21	1,21	1,21			
<u>ИР2</u>	1,44	1,45	1,43	1,41	0,007	0,52
	1,45	1,43	1,41			
	1,42	1,44	1,40			
	1,41	1,40	1,39			
	1,40	1,39	1,40			
	1,39	1,40	1,40			
\bar{x}	1,42	1,42	1,41			
<u>ИР3</u>	1,59	1,59	1,61	1,60	0,008	0,53
	1,56	1,58	1,60			
	1,61	1,57	1,59			
	1,63	1,61	1,59			
	1,62	1,60	1,58			
	1,62	1,59	1,59			
\bar{x}	1,61	1,59	1,59			
<u>ИР4</u>	1,81	1,78	1,77	1,79	0,012	0,69
	1,79	1,76	1,78			
	1,79	1,77	1,79			
	1,80	1,78	1,80			
	1,80	1,78	1,79			
	1,80	1,77	1,79			
\bar{x}	1,80	1,77	1,79			
<u>ИР5</u>	2,19	2,30	2,19	2,23	0,058	2,62
	2,22	2,29	2,19			
	2,22	2,30	2,19			
	2,20	2,30	2,18			
	2,22	2,30	2,18			
	2,27	2,31	2,18			
\bar{x}	2,22	2,30	2,19			

Значение RSD полученных результатов не превышает 3% при оценке промежуточной прецизионности методики (Таблица 29).

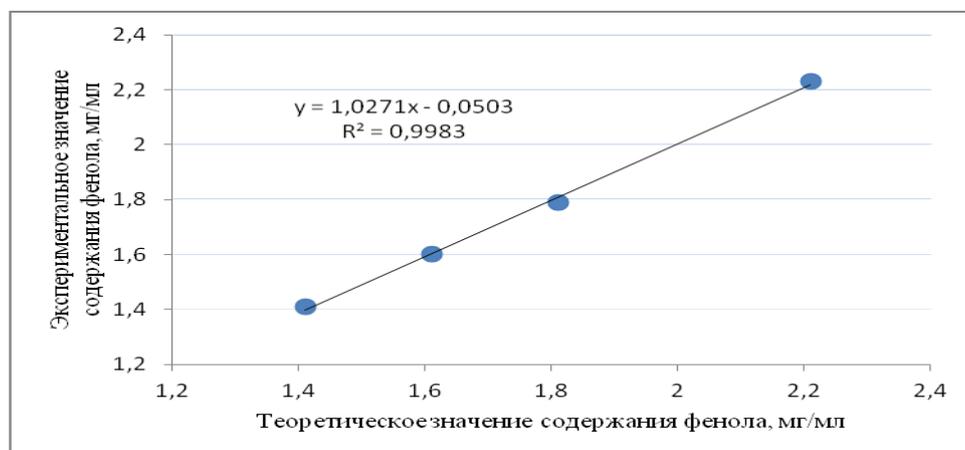
Для оценки правильности методики рассчитывали величину степени извлечения (R) и отклонение степени извлечения от 100% (E) фенола по формулам 27 и 28 соответственно, в образцах ИР2-ИР5. За теоретическое значение (x_i) принимали количество фенола, полученное в ИР1 с учетом добавленного количества (Таблица 30).

Таблица 30 – Степень извлечения фенола и отклонение степени извлечения фенола от 100%

Наименование испытуемого раствора	x_i - теоретическое значение содержание фенола, мг/мл	y_i - экспериментальное значение содержания фенола, мг/мл	Степень извлечения (R), %	Отклонение степени извлечения от 100% (E)
<u>ИР2</u>	1,41	1,41	100,0	0,0
<u>ИР3</u>	1,61	1,60	99,4	-0,6
<u>ИР4</u>	1,81	1,79	98,9	-1,1
<u>ИР5</u>	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	

Как следует из таблицы 30, 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%).

Дополнительно правильность и отсутствие систематической ошибки методики оценивали путем анализа регрессионной зависимости между теоретическим (x_i) и экспериментальным (y_i) значениями фенола (Таблица 30, Рисунок 20).



А

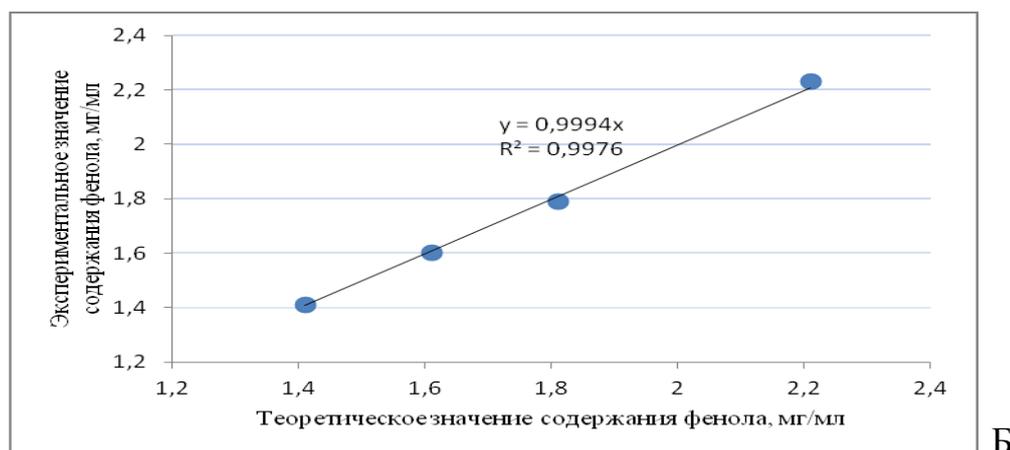


Рисунок 20 - Регрессионная зависимость между теоретическим и экспериментальными значениями содержания фенола в ИР2-ИР5 (А, Б)⁴

Регрессионная зависимость, представленная на рисунке 20А, визуально линейна. Далее оценивали статистическую значимость отклонений углового коэффициента и коэффициента сдвига при $n=4$.

Получили следующие значения статистических величин:

Дисперсия значений x_i относительно y_i (S_0^2) рассчитанная по формуле 8 составила 0,000681835, где число степеней свободы (f), рассчитанное по формуле 9 равно 2.

Дисперсия углового коэффициента уравнения калибровочной характеристики (S_b^2), рассчитанная по формуле 10 составила 0,0019481.

Дисперсия коэффициента сдвига уравнения калибровочной характеристики (S_a^2), рассчитанная по формуле 11 составила 0,00620489331.

Стандартные отклонения коэффициентов калибровочной характеристики (S_b) и (S_a), рассчитанные по формулам 12 и 13 составили 0,044137286 и 0,078771145 соответственно.

Полуширина доверительных интервалов отклонений коэффициентов калибровочной характеристики (Δb) и (Δa), рассчитанная по формулам 14 и 15 составила 0,1898 и 0,3387 соответственно, при доверительной вероятности 95%.

⁴ А - зависимость с учетом коэффициента сдвига (а). Б - зависимость без учета коэффициента сдвига (а).

Данные расчета показывают, что значение углового коэффициента 1,0271 калибровочной характеристики (Рисунок 20А) отвечает диапазону $1 \pm 0,1898$, и статистически не отличны от 1,0. Значение коэффициента сдвига 0,0503, отвечает диапазону $0 \pm 0,3387$ и статистически не отлично от 0,0 коэффициент детерминации регрессионной зависимости равен 1,0.

Регрессионная зависимость между теоретическими и экспериментально найденными значениями концентраций фенола, а также показатели степени извлечения и отклонения степени извлечения от 100%, подтверждают правильность методики.

Статистическую значимость систематической ошибки методики доказывали с помощью регрессионного анализа, сравнивая регрессионные зависимости между теоретическими x_i и экспериментальными y_i значениями концентраций фенола с учетом и без учета коэффициента сдвига (Рисунок 20А, 20Б, Таблица 30) [50, 93]. Значение F-критерия ($F(P, f_1 = N - 1, f_2 = N - 2)$), рассчитанное по формуле 16 составило 0,6778, при $N=72$ и степенях свободы $f_1=71$, $f_2=70$ при доверительной вероятности 95%.

Дисперсии отклонений теоретических значений от экспериментальных ($S_{0,1}^2$ и $S_{0,2}^2$), полученные при обсчете зависимостей, без учета и с учетом коэффициента сдвига, рассчитанные по формулам 17 и 18, составили $6,18845E-6$ и $1,9481E-5$ соответственно [93].

Полученное расчетное значение критерия Фишера = 0,6778 меньше критического табличного значения $F(95\%, f_1=71, f_2=70) = 1,35$, таким образом, подтверждается отсутствие систематической ошибки методики [50, 93].

Таким образом, разработана следующая методика определения фенола:

Обрудование и реактивы

Высокоэффективный жидкостной хроматограф с диодным матричным детектором, обеспечивающим измерение при 270 нм.

Стандартный раствор фенола (0,1 мг/мл) готовят по точной навеске 0,1000 г фенола, путем последовательного разведения.

Испытуемый раствор готовят разведением 1,0 мл образца препарата в мерной колбе, объемом 25 мл водой очищенной.

Разработаны следующие хроматографические условия:

Выбрана 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.

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, чгт пика фенола должно быть не менее 5000.

Результаты валидационных исследований представлены в таблице 31.

Таблица 31 - Валидационные параметры методики определения фенола ВЭЖХ

Валидационный параметр	Определяемая величина	Критерии приемлемости	Полученный результат	Соответствие (да/нет)
Специфичность	Отсутствие пиков с временами удерживания близкими к временам удерживания фенола и 2-феноксизэтанола.	Отсутствие влияния компонентов матрицы на определение.	В области удерживания пиков фенола и 2-феноксизэтанола отсутствуют посторонние пики.	Да
Промежуточная прецизионность	RSD	$\leq 10,0\%$	2,6%	Да
Линейность и диапазон	Визуальная оценка калибровочной характеристики	Линейная регрессия	Линейная регрессия	Да
	Коэффициент корреляции (R)	$R \geq 0,99$	1	Да
Правильность	Среднее значение выявления	98,0%-102,0%	99,8%	Да

Окончание таблицы 31

ПО	Минимальное обнаруживаемая концентрация	-	$0,72 \times 10^{-3}$ мг/мл	Да
ПКО	Минимальное определяемое количество	-	$2,17 \times 10^{-3}$ мг/мл	Да

Все валидационные характеристики методики, установленные в ходе испытаний (Таблица 31) соответствуют фармакопейным требованиям и подтверждают возможность применения разработанной методики для контроля качества ИЛП по показателю «фенол» [24, 104].

2.3. Аттестация стандартных образцов содержания фенола в ИЛП. Оценка сопоставимости результатов, полученных спектрометрическим, ВЭЖХ и ГЖХ методами

Согласно требованиям ГОСТ ИСО 17025-2019 для аккредитованных лабораторий, необходимо обеспечения внутрिलाбораторного контроля качества при воспроизведении методик. Наиболее надежным метрологическим инструментом подтверждения правильности воспроизведения методики являются стандартные образцы. В качестве аттестованной характеристики данных стандартных образцов используют установленный диапазон приемлемых значений аналита.

Для оценки возможности аттестации единого стандартного образца для контроля стабильности проведения испытаний при количественном определении фенола, изучали сопоставимость результатов, полученных с применением фармакопейной спектрофотометрической методики и вновь разработанных методик на основе методов ВЭЖХ и ГЖХ.

Выбор материала для аттестации стандартного образца

В соответствии с руководящими документами ВОЗ по изготовлению биологических стандартных образцов, производили выбор материала для стандартного образца (СО) содержания фенола в ИЛП, предназначенного для контроля правильности проведения испытаний по показателю «фенол», а так же планировали процедуру аттестации СО [5, 139, 229, 230].

Критериями выбора являлись равномерность дозирования и стабильность количественного содержания аналита. Поэтому был выбран материал в герметичной упаковке для обеспечения стабильности фенола, обладающего повышенной кислотностью (константа диссоциации pK_a $9,89 \pm 0,01$), разводящая жидкость для неинфекционных аллергенов, производства ФГУП НПО «Микроген», Россия. Данный материал имеет установленный срок годности, допустимое содержание фенола в разводящей жидкости 2,0 - 4,0 мг/мл сопоставимо с диапазоном содержания фенола в ИЛП (Таблица 1) [29].

Для оценки однородности дозирования образцов кандидата в СО содержания фенола, рассчитывали первый показатель приемлемости результатов испытаний (AV), в соответствии с ГФ РФ [27]. Показатель AV рассчитанный по формуле 21, где константа приемлемости ($k(95\%, f=9)$) равна 2,4, составил 8,4%, при максимально допустимом значении (L1), равном 15,0%. RSD полученной выборки составило 2,5%. Результаты показывают равномерность дозирования фенола в образцах кандидата в СО.

Стабильность кандидата в СО исследовали методом естественного старения, путем получения равнозначных выборок результатов количественного определения фенола, с разницей в два года. Объемы выборок составили по 40 результатов. Далее определяли статистическую значимость различий данных выборок по двум выборочным средним (\bar{x}_1 и \bar{x}_2), методом критерия Стьюдента по формулам 19, 20. Для чего использовали арифметические средние выборок, рассчитанные по формуле 1, которые составили $\bar{x}_1 = 3,11$ мг/мл и $\bar{x}_2 = 3,10$ мг/мл, и стандартные отклонения, рассчитанные по формуле 2, которые составили $S_1 = 0,06$ мг/мл и $S_2 = 0,09$ мг/мл соответственно.

Расчетное значение критерия Стьюдента составило – 0,571, при критическом значении – 1,991 (95%, $f=78$), что означает отсутствие статистически значимых различий с вероятностью 95% и позволяют сделать вывод о стабильности содержания фенола в образцах кандидата в СО, в

течение двух лет. Исследование показало, что выбранный материал пригоден для аттестации СО содержания фенола в ИЛП.

Установление аттестованной характеристики СО для методики СФ.

*Исследование возможности применения СО,
аттестованного СФ методом для метода ВЭЖХ*

При расчете аттестованной характеристики СО использовали результаты испытаний сорока образцов отобранной серии разводящей жидкости.

Арифметическое среднее содержания фенола в исследуемых образцах кандидата в СО (\bar{x}), рассчитанное по формуле 1, составило 2,94 мг/мл, стандартное отклонение полученных результатов (S), рассчитанное по формуле 2 составило 0,19 мг/мл.

Значение аттестованной характеристики, рассчитанное по формуле (29) получено в диапазоне от 2,56 до 3,32 мг/мл. Фармакопейному стандартному образцу содержания фенола для контроля правильности испытаний по показателю «фенол» присвоен номер ФСО 3.1.00449.

Далее исследовали возможность применения СО содержания фенола, аттестованного методикой СФ, для контроля испытаний проводимых с применением методик, имеющих принципиальные методические отличия, путем подтверждения сопоставимости результатов, при оценке равнозначных выборок данных.

Сопоставимость результатов для двух выборок данных объемом по сорок измерений, полученных с применением методик СФ и ВЭЖХ, проводили, применяя однофакторный дисперсионный анализ с вычислением критерия Фишера (Таблица 32).

Как следует из таблицы 32, значение F -критерия ($F(P, v_{\text{меж}} = n - 1, v_{\text{вну}} = n \times (m - 1))$) рассчитанное по формуле 22, составило 0,9343.

Значения внутригрупповой ($S_{\text{вну}}^2$) и межгрупповой ($S_{\text{меж}}^2$) дисперсий, рассчитаны по формулам 23 и 24, соответственно.

Таблица 32 - Результаты оценки сопоставимости разработанной (ВЭЖХ) и фармакопейной (СФ) методик определения фенола

Статистические характеристики		Методы определения фенола	
		СФ	ВЭЖХ
Среднее арифметическое содержания фенола в СО ($n = 40$) (мг/мл)	\bar{x}	2,94	2,90
Стандартное отклонение	S	0,19	0,18
Дисперсия	S^2	0,0361	0,0324
Среднее арифметическое содержания фенола в СО по двум выборкам ($n = 40$) (мг/мл)	$\bar{x}_{\text{ср}}$	2,92	
Стандартное отклонение средних	$S_{\text{ср}}$	0,028284	
Дисперсия средних значений	$S_{\text{ср}}^2$	0,000799984656	
Внутригрупповая дисперсия	$S_{\text{внут}}$	0,03425	
Межгрупповая дисперсия	$S_{\text{меж}}$	0,03199938624	
Значение критерия Фишера	F	0,9343	
Табличное значение критерия Фишера (при доверительной вероятности 95%)	$F_{\text{крит}}$	3,96	

Средние арифметические содержания фенола, полученные СФ и ВЭЖХ методиками (\bar{x}_1 и \bar{x}_2 , соответственно), среднее арифметическое по двум выборкам ($\bar{x}_{\text{ср}}$) рассчитаны по формуле 1.

Стандартные отклонения для результатов, полученных СФ и ВЭЖХ методиками (S_1 и S_2 , соответственно) и стандартное отклонение средних арифметических ($S_{\text{ср}}$) рассчитаны по формуле 2.

Внутригрупповое ($V_{\text{вну}}$) и межгрупповое ($V_{\text{меж}}$) число степеней свободы, рассчитанные по формулам 25 и 26 составили 78 и 1, соответственно.

Полученное при анализе экспериментальных данных значение критерия Фишера составило 0,9343, что ниже критического табличного значения $F_{\text{крит}} = 3,96$ (95%, $V_{\text{меж}} = 1$, $V_{\text{вну}} = 78$). Полученные данные свидетельствует об отсутствии статистически значимых различий

результатов определения фенола СФ и ВЭЖХ методиками и сопоставимости полученных результатов.

Аттестация СО содержания фенола методом ГЖХ

Возможность применения ФСО 3.1.00449 для контроля стабильности измерений методом ГЖХ исследовали, изучая сопоставимость равнозначных выборок ($n=40$) результатов определения фенола СФ и ГЖХ методиками (Таблица 33).

Как следует из таблицы 33, значение F -критерия ($F(P, v_{\text{меж}} = n - 1, v_{\text{вну}} = n \times (m - 1))$), рассчитанное по формуле 22, составило 23.

Значения внутригрупповой ($S_{\text{вну}}^2$) и межгрупповой ($S_{\text{меж}}^2$) дисперсий, рассчитаны по формулам 23 и 24, соответственно.

Таблица 33 - Результаты оценки сопоставимости разработанной (ГЖХ) и фармакопейной (СФ) методик определения фенола

Статистические характеристики		Методы определения фенола	
		ГЖХ	СФ
Среднее арифметическое содержания фенола в СО ($n = 40$) (мг/мл)	\bar{x}	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 арифметическое содержания фенола в СО по двум выборкам ($n = 40$) (мг/мл)	$X_{\text{ср}}$	3,02	
Стандартное отклонение средних значений	$S_{\text{ср}}$	0,1131	
Дисперсия средних	S^2	0,01279	
Внутригрупповая дисперсия	$S_{\text{внут}}$	0,022245	
Межгрупповая дисперсия	$S_{\text{меж}}$	0,5116	
Значение критерия Фишера	F	23	
Табличное значение критерия Фишера (при доверительной вероятности 95%)	$F_{\text{крит}}$	3,96	

Средние арифметические значения результатов определения фенола СФ и ГЖХ методиками (\bar{x}_1 и \bar{x}_2 , соответственно), среднее арифметическое по двум выборкам (\bar{x}_{cp}) рассчитаны по формуле 1.

Стандартные отклонения для результатов, полученных СФ и ГЖХ методиками (S_1 и S_2 , соответственно) и стандартное отклонение средних арифметических (S_{cp}) рассчитаны по формуле 2.

Внутригрупповое ($V_{вну}$) и межгрупповое ($V_{меж}$) число степеней свободы, рассчитанные по формулам 25 и 26 составили 78 и 1, соответственно.

Полученное при обработке экспериментальных данных значение критерия Фишера составило 23,0, что превышает критическое значение $F_{крит} = 3,96$ (95%, $V_{меж} = 1$, $V_{вну} = 78$), что свидетельствует о несопоставимости результатов, полученных СФ и ГЖХ методиками, благодаря статистически значимым различиям полученных результатов.

Статистическая значимость различий между результатами СФ и ГЖХ методик, обусловлена более высокой прецизионностью методики ГЖХ по сравнению с методикой СФ (что видно по показателям прецизионности: стандартному отклонению, RSD и дисперсии, значения которых значительно ниже для методики ГЖХ). Тогда как показатель правильности – среднее арифметическое значение содержания фенола не имеет значительных различий.

Таким образом, применение ФСО 3.1.00449 при контроле проведения испытаний по показателю «фенол» методикой ГЖХ неприменимо.

Аттестованную характеристику СО для методики ГЖХ устанавливали по результатам испытаний сорока образцов кандидата в СО.

Аттестованная характеристика СО, рассчитанная по формуле (29) получена в диапазоне от 2,92 до 3,28 мг/мл.

Фармакопейному стандартному образцу присвоен номер ФСО 3.1.00451 «Стандартный образец содержания фенола (газожидкостная хроматография)».

2.4. Резюме

В результате проведенных исследований, была разработана методика определения фенола в составе ИЛП с применением метода ГЖХ. Подобран тип хроматографической колонки, разработаны условия хроматографирования, отработан порядок приготовления калибровочных растворов, исследован калибровочный диапазон и установлена аналитическая область методики, показана возможность определения фенола в ИЛП без предварительной пробоподготовки образцов.

Для расчета содержания фенола в испытуемых образцах выбран метод внутреннего стандарта, в качестве внутреннего стандарта выбран 2-феноксиэтанол.

Разработана методика для определения фенола в составе ИЛП с применением метода ВЭЖХ. Подобрана колонка для хроматографирования подвижная фаза и условия хроматографирования, подобран калибровочный диапазон и определена аналитическая область методики, отработан порядок дозирования стандартного раствора при построении калибровки, определена степень предварительного разведения испытуемого препарата, показана возможность определения фенола в образцах ИЛП без предварительной пробоподготовки. Предложен способ расчета количественного содержания фенола в образцах ИЛП с учетом массы навески и чистоты реактива, используемого для построения калибровочной характеристики.

Разработанные методики валидированы в соответствии с рекомендациями руководящих документов.

Показана возможность применения разработанных методик для контроля качества разных групп препаратов ИЛП по показателю «Фенол».

Разработанная методика включена в ОФС 1.7.2.0028.18 ГФ РФ «Количественное определение фенола в биологических лекарственных препаратах», внесен дополнительный метод обращено-фазовой ВЭЖХ.

Разработан проект ОФС для ГФ РФ «Количественное определение фенола в иммунобиологических лекарственных препаратах методом ГЖХ» для внесения в ГФ РФ.

Разработаны и утверждены методические рекомендации «Количественное определение фенола в иммунобиологических лекарственных препаратах методом газожидкостной хроматографии».

Зарегистрирован Патент Российской Федерации №2693518 на изобретение «Способ количественного определения фенола в биологических лекарственных препаратах методом газожидкостной хроматографии».

Проведены испытания стабильности и однородности дозирования образцов кандидата в СО содержания фенола. По результатам испытаний был выбран материал для аттестации.

Данные статистического анализа сравнительных испытаний показали сопоставимость результатов, полученных с применением методик СФ и ВЭЖХ и возможность использования СО содержания фенола для контроля стабильности испытаний, аттестованного одной из вышеуказанных методик.

Разработаны и аттестованы фармакопейные стандартные образцы содержания фенола: ФСО 3.1.00499 «Стандартный образец содержания фенола (колориметрия, спектрофотометрия, ВЭЖХ)» и ФСО 3.1.00451 «Стандартный образец содержания фенола (газожидкостная хроматография)» для контроля стабильности испытаний по показателю «фенол», создана техническая документация на данные стандартные образцы, включающая паспорт ФСО, инструкцию по применению, макет этикетки.

ГЛАВА 3. Разработка и стандартизация методики определения тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах методом ААС ХП

3.1. Разработка и валидация методики определения тиомерсала в ИЛП

Особенность разработки методики количественного определения тиомерсала на основе метода ААС ХП, заключается в оценке чувствительности оборудования и исходного содержания тиомерсала в образцах ИЛП, выборе аналитической области методики, на основании изучения линейности актуального диапазона, а также, выборе и отработке условий пробоподготовки, необходимой для минерализации органической матрицы, мешающей высвобождению, переносу и детектированию ионов ртути. Несмотря на то, что детектирование ионов ртути методом ААС ХП производится путем измерения поглощения при 253,7 нм и исходно является высокоспецифичным, наличие высоких концентраций посторонних веществ, а также ионов ртути в связанном состоянии в составе органического соединения (тиомерсал) $C_9H_9SO_2HgNa$ может приводить к существенному искажению результатов определения, вплоть до полной неприемлемости переноса ионов и их детектирования.

Исследование линейности актуального диапазона концентраций и установление аналитической области методики

Диапазон калибровочной характеристики выбирали, учитывая ограничивающие факторы: чувствительность анализатора ртути - 1 мкг/л и содержанию ртути в испытуемых ИЛП.

Использование прибора с высокой чувствительностью, предполагает необходимость значительного разведения исходного исследуемого образца ИЛП, содержание связанной ртути в котором может быть до 60,0 мкг/мл.

Был исследован диапазон концентраций ртути от 2,0 до 100,0 мкг/л, исследовали концентрации стандартных растворов 2,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 35,0; 40,0; 50,0; 70,0; и 100,0 мкг/л. Для приготовления растворов

использовали ГСО ионов ртути, в качестве растворителя использовали 3% раствор хлористоводородной кислоты (Рисунок 21).

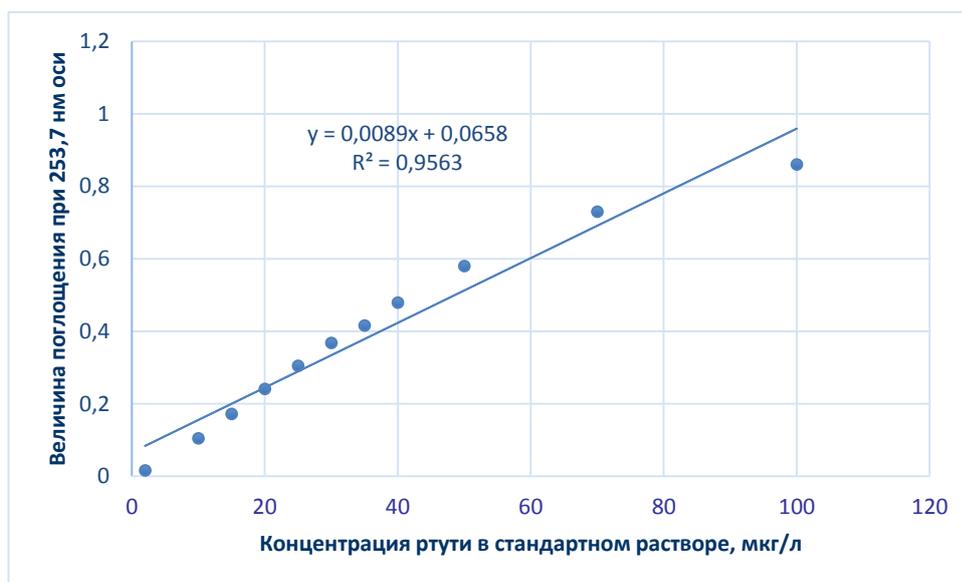


Рисунок 21 - Характеристическая зависимость поглощения ($A_{253,7 \text{ нм}}$) от концентрации ртути, в диапазоне от 2,0 до 100,0 мкг/л

Как следует из рисунка 21, коэффициент корреляции характеристической зависимости 0,956 ниже рекомендуемого значения 0,99 для методов ААС. Кроме того, регрессионная зависимость, в области концентраций выше 50 мкг/л, утрачивает линейность и выходит на плато, что свидетельствует о значительном снижении чувствительности определения и может вносить вклад в систематическую ошибку методики.

Таблица 34 – Зависимость величины поглощения от концентрации растворов ртути

Концентрация ионов ртути, мкг/л	Поглощение $A_{253,7 \text{ нм}}$, ($n=3$)	Характеристики регрессионной зависимости
10	0,1045	$y=0,012x-0,012$ $R^2=0,997$
15	0,1718	
20	0,2409	
25	0,3047	
30	0,3679	
35	0,4159	
40	0,4791	

Визуально линейная регрессионная зависимость наблюдается в диапазоне концентраций ртути от 10,0 до 40,0 мкг/л. Данный диапазон исследовали, используя те же данные (Таблица 34, Рисунок 22).

Линейность в диапазоне концентраций от 10,0 до 40,0 мкг/л оценивали по коэффициенту детерминации, RSD каждой точки регрессионной прямой и отклонению расчетных значений (Y_i) от экспериментальных (y_i).

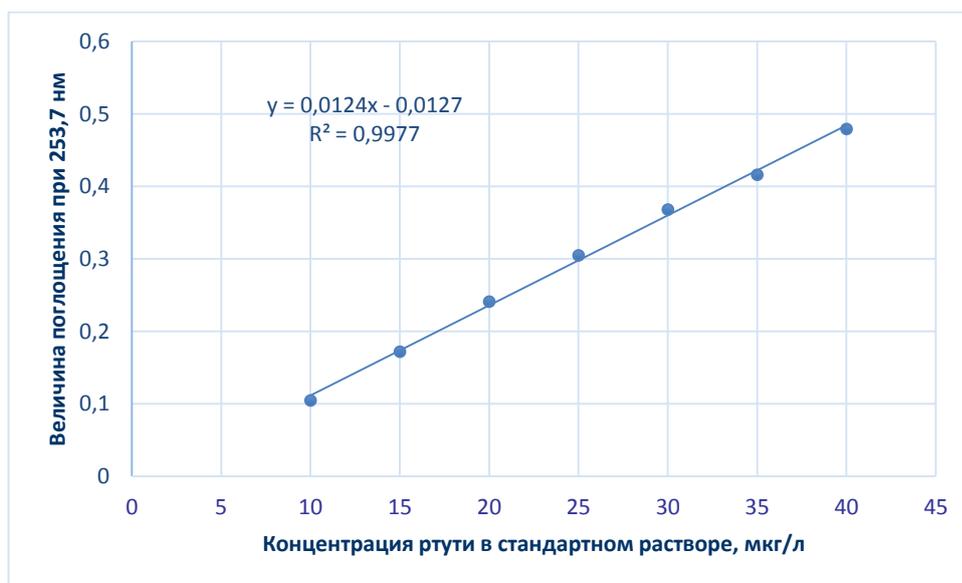


Рисунок 22 – Характеристическая зависимость поглощения излучения ($A_{253,7 \text{ нм}}$) нм от концентрации ртути в диапазоне от 10,0 до 40,0 мкг/л

Как видно из рисунка 22, выбранная область концентраций (Таблица 34), отвечает установленным критериям пригодности - регрессионная зависимость визуально линейна, коэффициент детерминации 0,9977.

Оценивали RSD значений поглощения в условиях промежуточной прецизионности, проведя пять независимых испытаний. Для оценки прецизионности результатов в актуальном диапазоне концентраций использовали ГСО ртути 8004-93 (Таблица 35).

Как следует из таблицы 35, значения RSD поглощения для каждой из концентраций не превышает 6% в условиях промежуточной прецизионности.

В соответствии с рекомендациями ИСН по валидации аналитических методик [50, 78, 93], отклонение расчетных значений поглощения Y_i от

экспериментальных значений y_i (t) для каждой из концентраций исследуемого диапазона (Рисунок 23, Таблица 35).

Таблица 35 – Оценка RSD значений поглощения для стандартных растворов.

Концентрация стандартного раствора, мкг/л	Средние арифметические величины поглощения для каждой из концентрации стандартных растворов (n=3)					Статистические показатели трех независимых испытаний		
	Испытание 1	Испытание 2	Испытание 3	Испытание 4	Испытание 5	\bar{X}_{cp} полощен ия	S_{cp} поглощен ия	RSD, %
10	0,1109	0,1119	0,1166	0,1279	0,1159	0,11664	0,006759	5,8
15	0,1690	0,1617	0,1755	0,1878	0,1768	0,17416	0,009704	5,6
20	0,2316	0,2143	0,2274	0,2435	0,2327	0,22990	0,010551	4,6
25	0,2794	0,2596	0,2847	0,3059	0,2762	0,28116	0,016712	5,9
30	0,3311	0,3136	0,3361	0,3510	0,3241	0,33118	0,013930	4,2
35	0,3813	0,3580	0,3867	0,4043	0,3759	0,38124	0,016809	4,4
40	0,4258	0,4044	0,4310	0,4520	0,4163	0,42590	0,017760	4,2

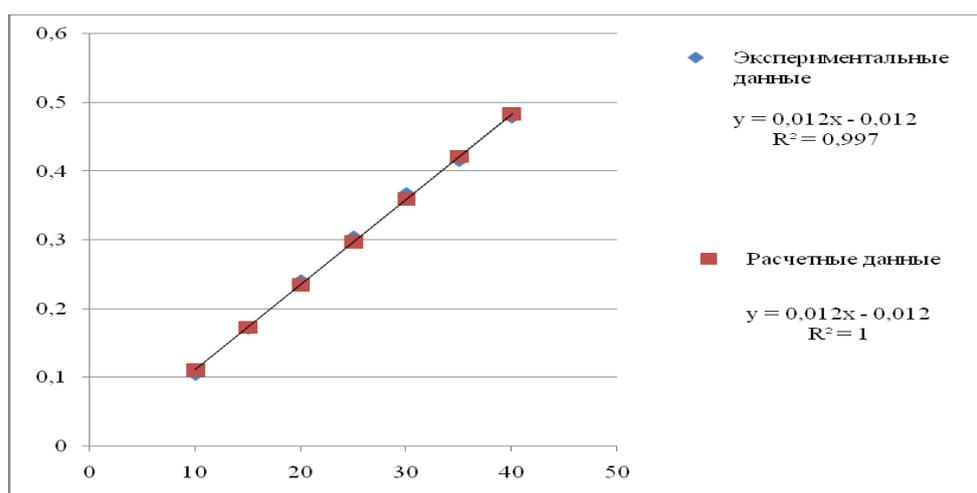


Рисунок 23 – Оценка линейности

Визуальная оценка линейности показывает незначительные отклонения расчетных от экспериментальных величин поглощения в исследуемом диапазоне (Рисунок 23).

Величины отклонений (t (95%, $f=N-2$)) расчетных значений от экспериментальных рассчитывали по формуле 4 (Таблица 36).

Стандартное отклонение расчетных значений от экспериментальных поглощения (SD_0), рассчитанное по формуле 5, составило 0,0071466.

Стандартное отклонение экспериментальных значений от среднего значения поглощения (SD_y), рассчитанное по формуле 6, составило 0,1343236.

Среднее значение поглощения (\bar{y}) рассчитанное по формуле 7 составило 0,297829. При этом количество экспериментальных точек (n) равно 7.

Таблица 36 - 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 данных 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

Величину полученного отклонения сравнивали с критическим (табличным) значением критерия Стьюдента t (95%, $f=n-2$) которое составляет 2,5706 (95%, $f=5$).

Как следует из таблицы 36, результаты расчетов отклонения экспериментальных значений поглощения от расчетных значений для каждой точки регрессионной зависимости, ниже критического табличного значения критерия (2,5706), что подтверждает корректность методики в исследуемом диапазоне концентраций.

Для построения калибровочной характеристики исследовали возможность использования стандартных растворов ионов ртути альтернативных производителей, на примере ГСО и стандартного раствора для атомно-абсорбционной спектроскопии фирмы Perkin Elmer. Результаты приведены на рисунке 24 и в таблице 37.

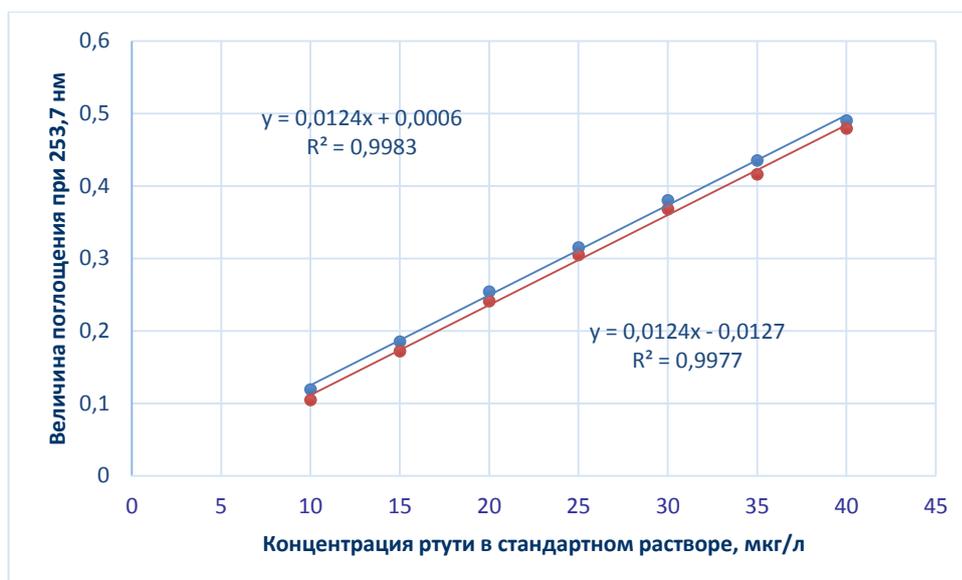


Рисунок 24 - Характеристические зависимости, построенные с применением альтернативных стандартов ртути

Таблица 37 - Уравнения характеристических зависимостей, построенных с применением альтернативных стандартов ртути

Наименование стандарта	Уравнение линейной регрессии	Коэффициент детерминации
Стандартный раствор Perkin Elmer	$y=0,0124x+0,0006$	0,9983
ГСО ртути	$y=0,0124x-0,0127$	0,9977

Как следует из таблицы 37 и рисунка 24, регрессионные зависимости визуально линейны, коэффициенты корреляции выше рекомендованных 0,99.

Таким образом, определена аналитическая область методики в диапазоне концентраций от 10,0 до 40,0 мкг/л. Сравнительная оценка калибровочных характеристик свидетельствует о возможности применения альтернативных стандартов ионов ртути для методики ААС ХП.

Выбор условий пробоподготовки

Метод ААС ХП основан на детекции холодного пара свободной ртути. Так как в составе ИЛП ртуть находится в связанном состоянии, являясь частью ртутьорганического соединения тиомерсала, разработка методики определения тиомерсала методом ААС ХП заключалась в первую очередь в выборе условий пробоподготовки испытуемых образцов.

Целью проведения пробоподготовки являлся подбор условий минерализации тиомерсала и других органических компонентов сложной матрицы препаратов для получения раствора, содержащего ионы ртути и исключения органической составляющей и ее возможного влияния на результат определения ртути.

Из литературных источников существует несколько способов минерализации: нагреванием с соляной, серной и азотной кислотами, кислотами и микроволновой обработкой, серной кислотой и перекисью водорода, серной кислотой и перманганатом, озонированием растворов, дисперсионной ионно-жидкостной микротвердофазной экстракцией [19, 96, 109, 133, 202].

При выборе условий ориентировались на описанный способ минерализации ИЛП в колориметрической методике определения тиомерсала в реакции с дитизоном, с применением серной кислоты и насыщенного раствора перманганата калия, и стадией количественного переноса после нагревания [19].

Исследовали соотношения и, количество реагентов, объем образца, необходимый для минерализации и степень разведения испытуемого раствора.

Согласно колориметрической методике, для минерализации 0,2 мл образца ИЛП используется 1,2 мл разведенной по объему серной кислоты 50% и 5 мл раствора калия перманганата 5%, избыток окислителя нейтрализуется добавлением 1,5 мл раствора гидроксиламина сульфата 20%.

Используя данный состав реагентов, подбирали объем разведения образцов, взяв для испытаний три серии образца 28. Испытание повторяли в условиях промежуточной прецизионности (Таблица 38)

Как следует из таблицы 38, величина поглощения при разведении в 2000 раз ближе к середине установленной аналитической области методики, что способствует снижению ошибки результата. Таким образом, для дальнейшей работы использовали данную степень разведения.

Таблица 38 – Выбор степени разведения испытуемого раствора

Наименование образца	Степень разведения	Первичные данные, величина поглощения $A_{253,7\text{ нм}}$		Содержание тиомерсала в испытуемом образце, мкг/мл	
		Испытание 1	Испытание 2	Испытание 1	Испытание 2
Образец 28 серия 1	в 2500 раз	0,2563	0,2499	109,5	106,9
	в 2000 раз	0,3199	0,3164	108,2	106,9
	в 1500 раз	0,3992	0,4368	100,5	110,0
Образец 28 серия 2	в 2500 раз	0,2654	0,2488	113,0	106,5
	в 2000 раз	0,3151	0,3137	106,6	106,5
	в 1500 раз	0,3774	0,4312	95,4	108,4
Образец 28 серия 3	в 2500 раз	0,2482	0,2421	106,0	103,4
	в 2000 раз	0,3469	0,2973	115	100,9
	в 1500 раз	0,4187	0,4500	105	113,0

Так же исключили стадию количественного переноса пробы, которая не приемлема для метода с высокой чувствительностью, для уменьшения влияния на точность результатов.

Конечный объем испытуемого раствора уменьшали, до минимального количества тиомерсала, позволяющего обеспечить воспроизводимость результатов. Отбирали в количестве по 10 мкл, 25 мкл и 100 мкл испытуемого образца, добавляли пропорционально уменьшенные количества реагентов для минерализации и пропорционально уменьшали конечный объем разведения. Для испытания взяли три серии образца 28 (Таблица 39).

Таблица 39 – Исследование влияния изменения конечного объема испытуемого раствора на результаты определения тиомерсала

Наименование образца	Объем образца, взятый на испытание, мкл	Конечный объем разведения пробы, мл	Содержание тиомерсала в образцах, мкг/мл	Среднее значение концентрации, мкг/мл	Стандартное отклонение, мкг/мл	RSD, %
Образец 28 серия 4	100	200	93,91	96,7	2,4	2,5
			98,09			
			98,01			
	25	50	96,27	97,3	1,2	1,2
			98,57			
			97,0			
	10	20	93,87	91,5	2,1	2,3
			90,25			
			90,3			

Окончание таблицы 39

Образец 28 серия 5	100	200	94,29	96,3	1,8	1,8
			97,64			
			97,0			
	25	50	102,3	102,7	0,6	0,6
			103,4			
			102,5			
	10	20	94,05	93,7	0,6	0,6
			94,02			
			93,01			

Как следует из таблицы 39, изменения конечного объема испытуемого раствора не оказывает заметного влияния на результат испытаний, однако значения RSD в среднем меньше для растворов, приготовленных в объеме 50 мл. Кроме того, значения содержания тиомерсала, полученные с конечным объемом 20 мл, в среднем ниже значений для проб с объемом 200 и 50 мл.

Содержание тиомерсала в образце С, в мкг/мл рассчитывали используя регрессионную зависимость величины поглощения от концентрации ртути, учитывая объем образца, взятый на анализ, конечный объем испытуемого раствора, после проведения пробоподготовки, коэффициент пересчета ртути на тиомерсал.

Отличия соединений ртути в стандартных растворах ионов ртути и испытуемых растворов (тиомерсал) являются причиной отличий пробоподготовки данных растворов и, как следствие, состава детектируемой реакционной смеси. В связи с этим необходимо изучить возможное влияние данных отличий на результаты определения, а также возможность использования раствора тиомерсала, приготовленного по точной навеске, в качестве раствора сравнения.

Для этого использовали раствор тиомерсала с теоретической концентрацией 100 мкг/мл, (соответствующей диапазону требований к содержанию тиомерсала в ИЛП), приготовленный по навеске в воде очищенной, исследуя пробы, с разным объемом данного раствора. Определяли степень извлечения (R, %) и относительную неопределенность извлечения (ϵ , %), аналита в растворе, рассчитанные по формулам 27 и 28,

соответственно, а так же прецизионность результатов и линейность регрессионной зависимости поглощения от объема раствора тиомерсала, с теоретической концентрацией 100 мкг/мл (x_i).

Таблица 40 - Исследование степени извлечения и отклонения степени извлечения тиомерсала от 100% (растворитель - вода очищенная)

Объем раствора тиомерсала концентрацией 100 мкг/мл, мкл	Поглощение, $A_{253,7 \text{ нм}}$	Концентрация ртути, определенная по калибровке, мкг/л	y_i - экспериментальное значение концентрации в модельном растворе, мкг/мл,	Степень извлечения (R), %	Отклонение степени извлечения от 100%, (E)
10	0,0986	7,69	77,6	77,6	-22,4
15	0,1341	10,83	72,9	72,9	-27,1
20	0,1968	16,39	82,7	82,7	-17,3
25	0,2617	22,14	89,4	89,4	-10,6
30	0,3183	27,15	91,3	91,3	-8,7
35	0,2954	25,12	72,4	72,4	-27,6
40	0,3242	27,68	69,8	69,8	-30,2
Среднее экспериментальное значение концентрации в модельном растворе, мкг/мл			79,4		
Стандартное отклонение, мкг/мл			8,6		
RSD, %			10,8		

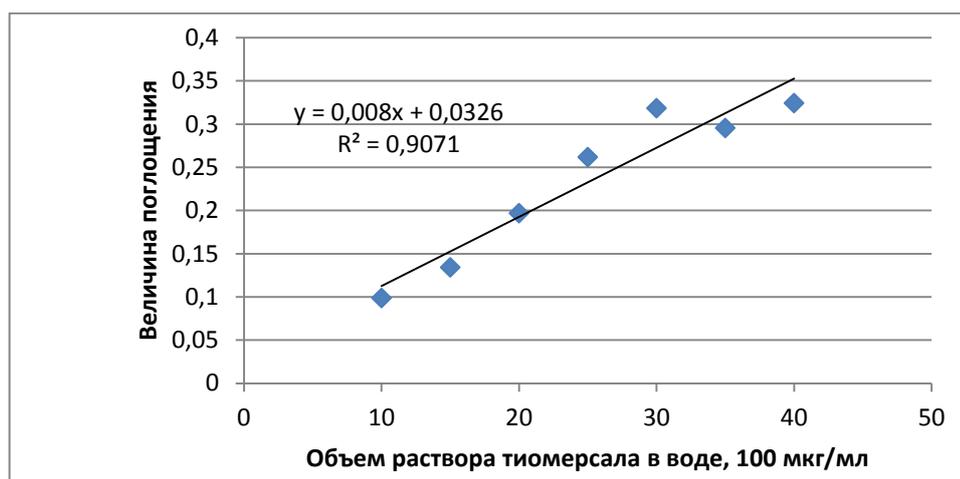


Рисунок 25 - Регрессионная зависимость поглощения от объема раствора тиомерсала, в воде очищенной с концентрацией 100 мкг/мл

Как следует из таблицы 40 и рисунка 25, результаты определения ртути в водном растворе тиомерсала неудовлетворительны: коэффициент

детерминации менее 0,99, средняя степень извлечения около 80%, отклонение степени извлечения от 100% лежит в области отрицательных величин и в среднем составляет около -20% (что выше рекомендуемых 15%) [78, 139]. Причиной недостатка выявления ионов ртути может быть отсутствие свободных ионов в водном растворе тиомерсала, поскольку ртутьорганические связи (С-Hg), ввиду малой полярности, стабильны в водных средах.

На основании данного предположения были приготовлены растворы тиомерсала по вышеуказанной схеме, где в качестве растворителя использовали 0,9% раствор натрия хлорида (Таблица 41, Рисунок 26) и фосфатный буферный раствор рН 7,2 (Таблицы 42, Рисунки 27). Выбор данных растворителей обусловлен их наличием в составе ИЛП.

Таблица 41 - Исследование степени извлечения и отклонения степени извлечения тиомерсала от 100% (растворитель - 0,9% натрия хлорид)

Объем раствора тиомерсала концентрацией 100 мкг/мл, мкл	Поглощение, $A_{253,7\text{ нм}}$	Концентрация ртути, определенная по калибровке, мкг/л	y_i -экспериментальное значение концентрации в модельном растворе, мкг/мл	Степень извлечения (R), %	Отклонение степени извлечения от 100 % (E)
10	0,1183	8,4	84,6	84,6	-15,4
15	0,1767	13,6	91,8	91,8	-8,2
20	0,2407	19,4	98,0	98,0	-2,0
25	0,2844	23,4	94,3	94,3	-5,7
30	0,3417	28,5	95,9	95,9	-4,1
35	0,3829	32,2	92,9	92,9	-7,1
40	0,4461	37,9	95,7	95,7	-4,3
Среднее экспериментальное значение концентрации в модельном растворе, мкг/мл			93,3		
Стандартное отклонение, мкг/мл			4,3		
RSD,%			4,7		

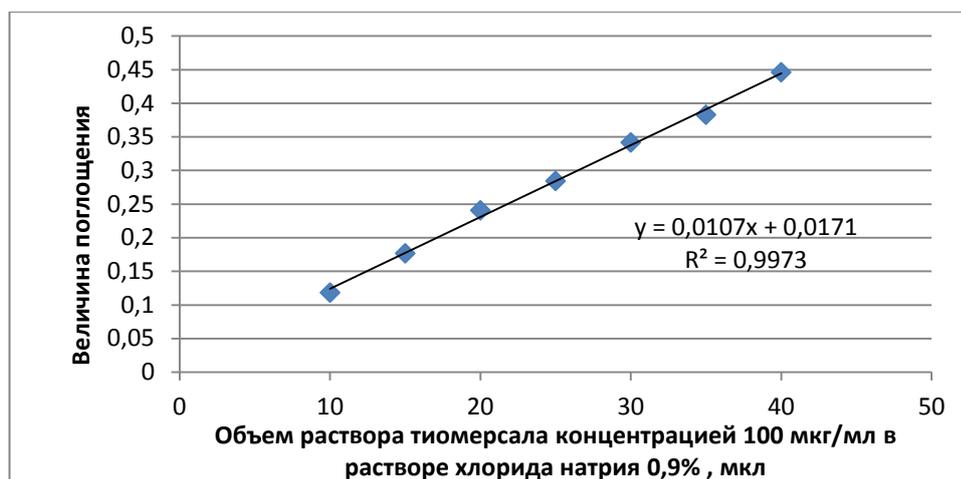


Рисунок 26 - Регрессионная зависимость поглощения от объема раствора тиомерсала, с концентрацией 100 мкг/мл, в растворе натрия хлорида 0,9%

Таблица 42 - Степень извлечения, отклонение степени извлечения тиомерсала от 100% (растворитель – ФБР pH 7,2)

Объем раствора тиомерсала концентрацией 100 мкг/мл, мкл	Поглощение, $A_{253,7 \text{ нм}}$	Концентрация ртути, определенная по калибровке, мкг/л	Y_i -экспериментальное значение концентрации в модельном растворе, мкг/мл,	Степень извлечения (R), %	Отклонение степени извлечения от 100 % (E)
10	0,1369	9,584	96,8	96,8	-3,2
15	0,1950	14,55	98,0	98,0	-2,0
20	0,2618	20,26	102,3	102,3	2,3
25	0,3193	25,17	101,7	101,7	1,7
30	0,3800	30,36	102,2	102,2	2,2
35	0,4448	35,9	103,6	103,6	3,6
40	0,4997	40,59	102,5	102,5	2,5
Среднее экспериментальное значение концентрации в модельном растворе, мкг/мл			101,0		
Стандартное отклонение, мкг/мл			2,6		
RSD, %			2,5		

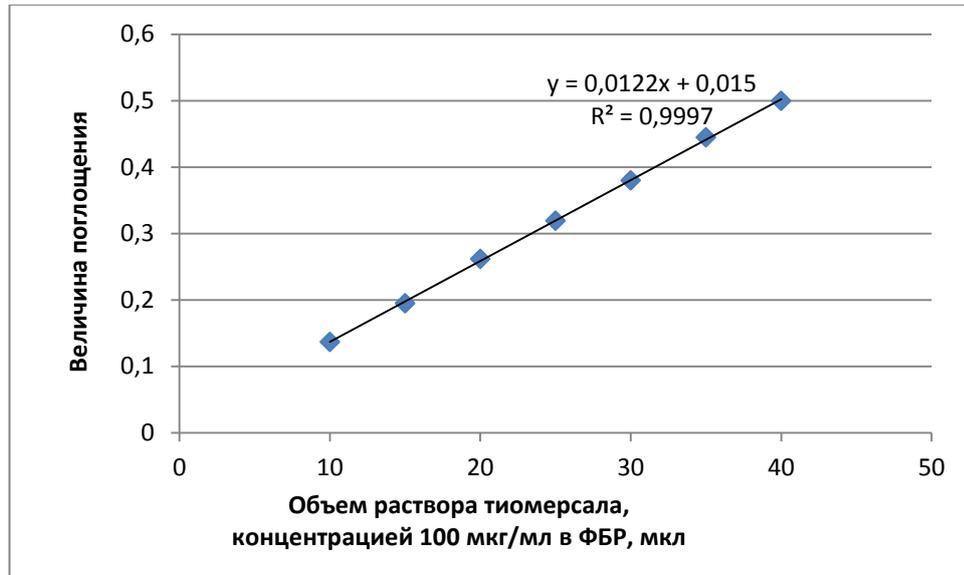


Рисунок 27 - Регрессионная зависимость поглощения от объема раствора тиомерсала, с концентрацией 100 мкг/мл, в ФБР рН 7,2

Как следует из таблиц 41, 42 и рисунков 26, 27, наибольшие отклонения степени извлечения могут наблюдаться в растворах с содержанием тиомерсала близким к пределу количественного определения ртути. При этом значения отклонения степени извлечения от 100% в случае использования фосфатного буферного раствора (среднее значение по модулю – 2,5 %) в среднем ниже значений, полученных при использовании раствора натрия хлорида (среднее значение по модулю - 6,68%) и имеют положительное и отрицательное распределение, что свидетельствует о минимизации ошибки определения. Регрессионные зависимости поглощения от объема раствора тиомерсала визуально линейны, коэффициенты детерминации 0,9973 и 0,9997 соответственно, выше установленного минимального значения 0,99.

Таким образом, для построения калибровочной характеристики целесообразно использование раствора тиомерсала в фосфатном буферном растворе рН 7,2, используя при этом, регрессионную зависимость величины поглощения от концентрации тиомерсала в пробе в мкг/л для расчета содержания тиомерсала в испытуемых образцах (Таблица 43, Рисунок 28).

Таблица 43 – Значения калибровочной характеристики в диапазоне концентраций тиомерсала от 20 до 80 мкг/л

Содержание тиомерсала, мкг/л	Поглощение, $A_{253,7 \text{ нм}}$	Уравнения калибровочной характеристики
20	0,1369	$y=0,0061x+0,015$ $R^2=0,9997$
30	0,1950	
40	0,2618	
50	0,3193	
60	0,3800	
70	0,4448	
80	0,4997	

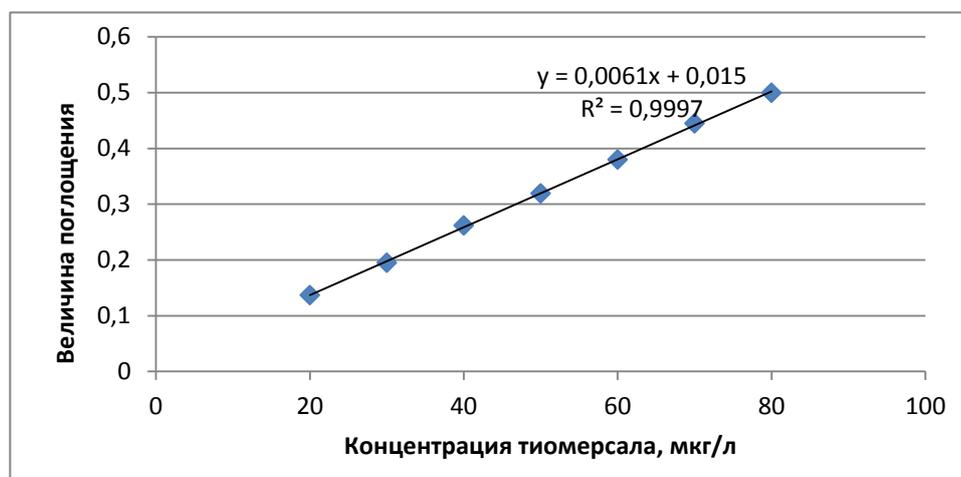


Рисунок 28 – Калибровочная характеристика регрессионной зависимости, по раствору тиомерсала

Содержание тиомерсала в образце С, в мкг/мл рассчитывали с использованием уравнения регрессионной зависимости величины поглощения от концентрации тиомерсала, учитывая чистоту реактива, точную массу навески, объем образца, взятый на анализ, конечный объем испытуемого раствора после пробоподготовки.

Делали сравнительный расчет содержания тиомерсала в образцах ИЛП по калибровочным характеристикам, построенным с применением ГСО ионов ртути и раствора тиомерсала 100 мкг/мл в ФБР pH 7,2, приготовленного по навеске (Таблица 44).

Таблица 44 – Сравнительный анализ результатов расчета содержания тиомерсала в образцах ИЛП по двум калибровкам

Наименование образца	Содержание тиомерсала в препаратах по калибровке ГСО, мкг/мл	Содержание тиомерсала в препаратах по раствору тиомерсала, мкг/мл	RSD, %
Образец 15	114,8	110,4	2,8
Образец 16	99,5	97,7	1,3
Образец 17	94,2	93	0,9
Образец 24	88,2	85,5	2,2
Образец 25	92,2	90,1	1,6
Образец 26	88,8	90	0,9

Как следует из таблицы 44, RSD для разных способов расчета не превышают 2,8%, все полученные результаты соответствуют нормативным требованиям к содержанию тиомерсала в исследуемых образцах.

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 гидроксиламина сульфата (20%) - 200 мкл. Растворитель - хлористоводородная кислота (3%), общий объем - 50 мл.

Показана возможность применения растворов тиомерсала, приготовленных по точной навеске для построения калибровочной характеристики методики.

Предложены способы расчета тиомерсала в образцах препаратов при количественном определении по ионам ртути и по раствору тиомерсала.

Количественное определение тиомерсала в сорбированных ИЛП с применением методики ААС ХП

Дальнейшие испытания проводили, используя калибровочную характеристику по стандарту ртути.

Анализировали приемлемость разработанной методики ААС ХП для контроля сорбированных препаратов, содержащих в качестве адьюванта гель гидроксида алюминия, по показателю «Тиомерсал» (Таблица 45).

Таблица 45 - Количественное определение тиомерсала в сорбированных ИЛП с применением методики ААС ХП

Образец/количество серий	Требование НД к содержанию тиомерсала, мкг/мл	Среднее значение, мкг/мл	Диапазон значений результатов, мкг/мл
Образцы, содержащие тиомерсал			
Образец 15/6 серий	85-115	98,0	88,7 – 105,0
Образец 16/6 серий		89,0	85,2 – 94,4
Образец 17/4 серии		92,0	86,8 - 94,0
Образец 18/4 серии		95,0	91,6 – 98,9
Образец 19/4 серии		86,2	85,2 -87,1
Образец 20/4 серии		85,6	85,0 – 86,3
Образец 21/2 серии		70-100	76,0
Образцы бесконсервантных вакцин			
Образец 22/3 серии	Должен отсутствовать	Ниже предела обнаружения	-
Образец 23/2 серии		Ниже предела обнаружения	-

Как следует из таблицы 45, значения содержания тиомерсала в сорбированных препаратах, полученные с применением методики ААС ХП соответствует требованиям нормативных документов. В образцах бесконсервантных форм тиомерсал не обнаружен.

Далее проводили сравнительный анализ средних по двум измерениям значений содержания тиомерсала, полученных колориметрической методикой в реакции с дитизоном (ГФ РФ) и методикой ААС ХП. Исследовали образцы, различающиеся по составу, в том числе содержащие гель гидроксида алюминия (Таблица 46).

Таблица 46 – Испытания ИЛП по показателю «Тиомерсал» колориметрической и ААС ХП методиками

Исследуемый образец	Среднее значение (n=2), полученное колориметрической методикой, мкг/мл	Среднее значение (n=2), полученное методикой ААС ХП, мкг/мл	Стандартное отклонение	RSD, %
Образец 15	109,8	114,8	3,5	3,1
Образец 16	99,6	99,5	0,1	0,1
Образец 17	102,9	94,2	6,2	6,2
Образец 24	97,7	88,2	6,4	6,9
Образец 25	89,5	92,2	1,9	2,1

Окончание таблицы 46

Образец 26	88,2	88,8	0,4	0,5
Образец 27	102,4	105,5	2,2	2,1

Как следует из таблицы 46, значения RSD для результатов, полученных с применением двух разных методик, не превышают 6,9%. Полученные данные удовлетворяют требованиям к результатам испытаний.

Специфичность, точность (правильность, прецизионность)

Специфичность методики оценивали с применением образцов содержащих и не содержащих тиомерсал. Определения проводили в двух повторах в условиях промежуточной прецизионности (Таблица 47).

Таблица 47 - Оценка специфичности методики ААС ХП

Испытуемый образец	Поглощение $A_{253,7}$	Содержание тиомерсала, мкг/мл
Образец 30	0,0003	--
	0,0001	--
Образец 31	- 0,0001	--
	- 0,0001	--
Образец 28, серия 5	0,2550	99,8
	0,2464	96,4
Образец 29	0,3328	106,2
	0,3376	107,9

Как следует из таблицы 47, в образцах 30 и 31, не содержащих тиомерсал, наличие поглощения не наблюдается. В образцах 28, 29, содержащих консервант, тиомерсал определяется в количестве, соответствующем требованиям нормативной документации (85-115 мкг/мл). Результаты подтверждают специфичность методики ААС ХП.

Оценивали возможность влияния на специфичность методики ААС ХП, геля гидроксида алюминия. Для этого анализировали растворы, содержащие образец 15 в объеме от 10 до 40 мкл с шагом 5 мкл. Теоретическое содержание в образце тиомерсала – около 100 мкг/мл и ионов алюминия около - 1,0 мг/мл, согласно требованиям НД. За результат принимали среднее значение трех независимых испытаний (Таблица 48, Рисунок 29).

Таблица 48 - Оценка специфичности методики ААС ХП в присутствии геля гидроксида алюминия

Объем образца 15, мкл	Среднее значение величины поглощения (n=3)	Содержания ионов ртути в пробе, рассчитанное по калибровочной характеристике, мкг/л	Содержание тиомерсала в образце 15 с учетом разведения, 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
Коэффициент корреляции между объемом образца и содержанием тиомерсала.			0,9956

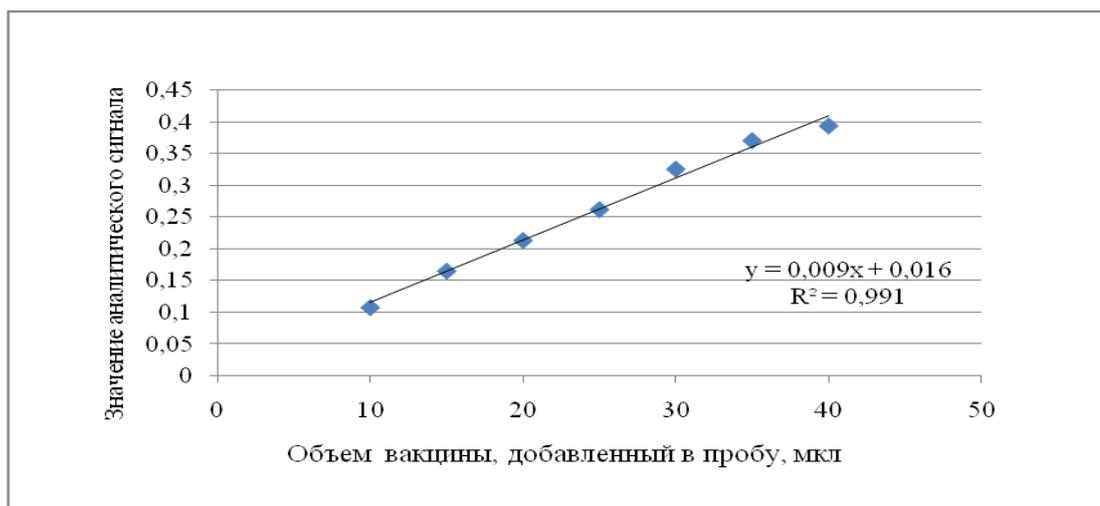


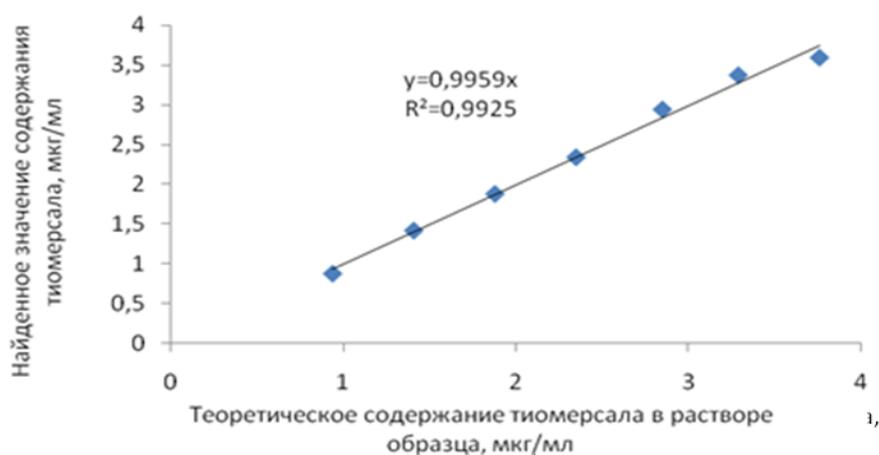
Рисунок 29 - Регрессионная зависимость величины поглощения от объема образца 15

Как следует из таблицы 48, с увеличением объема образца 15, а следовательно и концентрации тиомерсала и геля гидроксида алюминия в растворе, происходит пропорциональное увеличение величины поглощения, но открываемость тиомерсала в пересчете на разведение образца колеблется в допустимых пределах: RSD - 3,95%.

Как следует из рисунка 29, увеличение величины поглощения от объема образца линейно - коэффициент детерминации 0,991.

Статистическую значимость систематической ошибки, при доверительной вероятности 95%, определяли, применив регрессионный анализ с расчетом критерия Фишера. Для этого сравнивали регрессионные зависимости между теоретическими (x_i) и найденными (y_i) значениями концентраций тиомерсала с учетом и без учета коэффициента сдвига, характеризующего систематическую ошибку измерений (Рисунок 30, Таблица 49). За теоретическое значение содержания тиомерсала в образце принимали среднее значение двадцати одного результата ($n=21$) — 94,24 мкг/мл.

Значение F-критерия ($F(P, f_1 = N - 1, f_2 = N - 2)$), рассчитанное по формуле 16 составило 0,16, при $m=7$ и степенях свободы $f_1=6$, $f_2=5$ при доверительной вероятности 95%.



Б

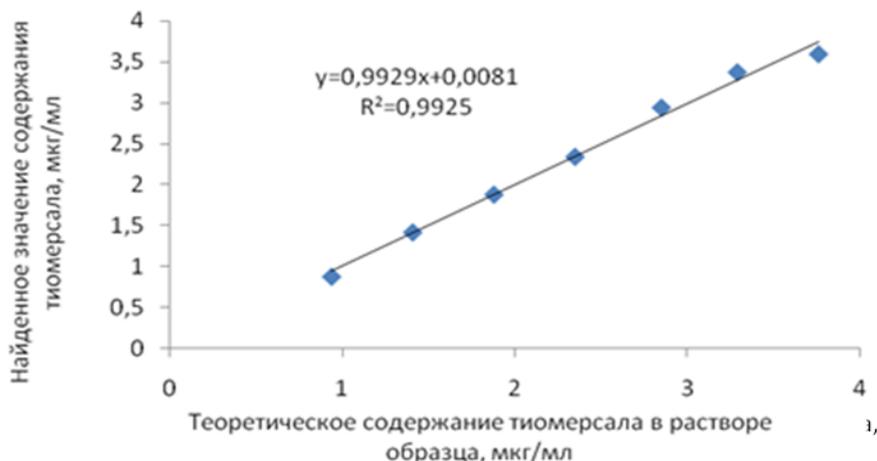


Рисунок 30 - Регрессионная зависимость между теоретическими (x_i) и экспериментальными (y_i) значениями концентраций тиомерсала с использованием методики ААС ХП, без учета (А) и с учетом (Б) коэффициента сдвига

Таблица 49 - Оценка систематической ошибки методики ААС ХП

Объем образца 15, 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 (Б) 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	$y = 0,9929x + 0,0081$ (Б) $R^2 = 0,9925$
30	2,85	2,94	
35	3,29	3,37	
40	3,76	3,59	

Дисперсии отклонений теоретических значений от экспериментальных ($S_{0_1}^2$ и $S_{0_2}^2$) – регрессионных зависимостей с учетом и без учета коэффициента сдвига, рассчитанные по формулам 17 и 18 составили 0,00913855 и 0,00943465 соответственно.

Полученное расчетное значение критерия Фишера (0,16) меньше критического табличного значения F (95%, $f_1=6$, $f_2=5$) равного 4,95, таким

образом, подтверждается отсутствие влияния систематической ошибки методики, при доверительной вероятности 95% [50, 93].

Повторяемость оценивали, используя четыре серии образца 28. Проводили четыре испытания в условиях повторяемости, используя по две параллельные пробы каждой серии (Таблица 50).

Таблица 50 – Оценка повторяемости количественного определения тиомерсала методом ААС ХП.

Образец 28	Среднее значение результатов (n=2) мкг/мл;				Хобщ, ср	Scp	RSD%
	Испытание 1	Испытание 2	Испытание 3	Испытание 4			
Серия 6	86,4	88,8	89,6	89,4	88,6	1,5	1,7
Серия 7	89,4	93,3	94,7	90,4	92,0	2,5	2,7
Серия 8	86,6	86,6	92,2	89,8	88,8	2,7	3,0
Серия 9	89,5	91,4	94,4	88,6	91,0	2,6	2,9

Как следует из таблицы 50 среднее значения RSD, полученные в условиях повторяемости, не превышает 3%, что удовлетворяет критериям приемлемости.

Для оценки прецизионности и правильности методики использовали в качестве испытуемых растворов модельные растворы (MP) образцов с предварительным разведением водой очищенной и добавлением известного количества тиомерсала, а так же растворы тиомерсала в ФБР pH 7,2 (PP), приготовленные по навеске:

- MP1 – образец 27 с предварительным разведением 1:2,
- MP2 – образец 28 серия 10 с предварительным разведением 1:2,
- MP3 – образец 28 серия 11 с предварительным разведением 1:2,
- MP4 – образец 28 серия 12 с предварительным разведением 1:2,
- MP5 – образец 27 без предварительного разведения,
- MP6 – образец 28 серия 10 без предварительного разведения,
- MP7 – образец 28 серия 11 без предварительного разведения,
- MP8 – образец 28 серия 12 без предварительного разведения,

MP9 – образец 27 без предварительного разведения, с добавлением тиомерсала 40 мкг,

MP10 – образец 28 серия 10 без предварительного разведения, с добавлением тиомерсала 40 мкг,

MP11 – образец 28 серия 11 без предварительного разведения, с добавлением тиомерсала 40 мкг,

MP12 – образец 28 серия 12 без предварительного разведения, с добавлением тиомерсала 40 мкг,

MP13 – образец 27 без предварительного разведения, с добавлением тиомерсала 10 мкг,

MP14 – образец 27 без предварительного разведения, с добавлением тиомерсала 20 мкг,

MP15 – образец 15 серия 4 с предварительным разведением 1:2,

MP16 – образец 15 серия 4 с предварительным разведением 1:2, с добавлением тиомерсала 10 мкг,

MP17 – образец 15 серия 4 с предварительным разведением 1:2, с добавлением тиомерсала 20 мкг,

MP18 – образец 15 серия 4 с предварительным разведением 1:2, с добавлением тиомерсала 40 мкг,

MP19 – образец 16 серия 2 с предварительным разведением 1:2,

MP20 – образец 16 серия 2 с предварительным разведением 1:2, с добавлением тиомерсала 10 мкг,

MP21 – образец 16 серия 2 с предварительным разведением 1:2, с добавлением тиомерсала 20 мкг,

MP22 – образец 16 серия 2 с предварительным разведением 1:2, с добавлением тиомерсала 40 мкг,

MP23 – образец 17 серия 1 с предварительным разведением 1:2,

MP24 – образец 17 серия 1 с предварительным разведением 1:2, с добавлением тиомерсала 10 мкг,

MP25 – образец 17 серия 1 с предварительным разведением 1:2, с добавлением тиомерсала 20 мкг,

MP26 – образец 17 серия 1 с предварительным разведением 1:2, с добавлением тиомерсала 40 мкг,

MP27 – образец 18 серия 4 без предварительного разведения

MP28 – образец 18 серия 4 без предварительного разведения, с добавлением тиомерсала 10 мкг,

MP29 – образец 18 серия 4 без предварительного разведения, с добавлением тиомерсала 20 мкг,

MP30 – образец 18 серия 4 без предварительного разведения, с добавлением тиомерсала 40 мкг,

MP31 – образец 24 без предварительного разведения

MP32 – образец 24 без предварительного разведения, с добавлением тиомерсала 10 мкг,

MP33 – образец 24 без предварительного разведения, с добавлением тиомерсала 20 мкг,

MP34 – образец 24 без предварительного разведения, с добавлением тиомерсала 40 мкг,

PP50 - раствор тиомерсала 50 мкг/мл,

PP100 - раствор тиомерсала 100 мкг/мл,

PP150 - раствор тиомерсала 150 мкг/мл.

Способ приготовления модельных растворов:

MP1 – MP4, MP15, MP19, MP23: 1,0 мл образца + 1,0 мл воды очищенной.

MP13, MP28, MP32: 2,0 мл образца + 2,0 мкл раствора тиомерсала 10 мг/мл, приготовленного по навеске.

MP14, MP29, MP33: 2,0 мл образца + 4,0 мкл раствора тиомерсала 10 мг/мл, приготовленного по навеске.

MP9 – MP12, MP30, MP34: 2,0 мл образца + 8,0 мкл раствора тиомерсала 10 мг/мл, приготовленного по навеске.

Таблица 51 - Оценка промежуточной прецизионности количественного определения тиомерсала методом ААС ХП

Диапазон концентраций содержания ионов ртути, мкг/л	Испытуемый раствор	Оператор 1. Содержание тиомерсала, мкг/мл			Оператор 2. Содержание тиомерсала, мкг/мл			Среднее значение, мкг/мл	Стандартное отклонение, мкг/мл	RSD, %
Низкие концентрации (от 10 до 20)	MP1	52,4	54,0	57,8	54,8	53,5	58,2	55,1	2,4	4,4
	MP2	41,9	41,9	43,2	48,9	43,3	46,1	44,2	2,8	6,3
	MP3	42,7	45,3	47,1	49,9	43,8	45,3	45,7	2,6	5,7
	MP4	45,1	45,5	44,4	46,8	43,0	45,5	45,1	1,3	2,9
	PP50	50,0	51,9	53,2	56,6	52,6	51,9	52,7	2,2	4,2
	Среднее значение RSD, %									
Средние концентрации (от 20 до 30)	MP5	106,2	108,1	110,2	112,1	105,7	108,1	108,4	2,4	2,2
	MP6	87,8	88,6	94,8	94,9	91,4	94,4	92,0	3,2	3,5
	MP7	92,2	94,5	100,7	102	93,6	95,1	96,4	4,0	4,2
	MP8	93,1	92,6	98,8	98,5	94,3	92,6	95,0	2,9	3,1
	PP100	107,5	105,4	108,5	113,1	109,7	105,2	108,2	3,0	2,8
	Среднее значение RSD, %									
Высокие концентрации (от 30 до 40)	MP9	133	138,4	145	150,4	137,5	138,4	140,5	6,2	4,4
	MP10	121,3	121,8	125	131,5	118,1	128,3	124,3	4,9	4,0
	MP11	123,6	127,1	129,3	137,2	124,7	127,1	128,2	4,9	3,8
	MP12	122,8	122,3	131,1	135,0	127,4	129,8	128,1	4,9	3,8
	PP150	147,5	148,8	157,7	159,9	150,4	148,8	152,2	5,3	3,5
	Среднее значение RSD, %									

MP16, MP20, MP24: 1,0 мл образца +1,0 мл воды очищенной + 2,0 мкл раствора тиомерсала 10 мг/мл, приготовленного по навеске.

MP17, MP21, MP25: 1,0 мл образца +1,0 мл воды очищенной + 4,0 мкл раствора тиомерсала 10 мг/мл, приготовленного по навеске.

MP18, MP22, MP26: 1,0 мл образца +1,0 мл воды очищенной + 8,0 мкл раствора тиомерсала 10 мг/мл, приготовленного по навеске.

Прецизионность оценивали, в нижних, средних и высоких пределах калибровочного диапазона, исследуя модельные растворы образцов ИЛП с предварительным разведением в 2 раза, без разведения и с добавлением 40 мкг тиомерсала. Два оператора проводили по три независимых испытания в условиях промежуточной прецизионности.

Как следует из таблицы 51, среднее значение RSD для нижнего диапазона концентраций (10 – 20 мкг/мл ртути) составил 4,7%, для среднего диапазона концентраций (20 – 30 мкг/мл ртути) – 3,2%, для диапазона высоких концентраций (30 – 40 мкг/мл ртути) – 3,9 %. Таким образом, среднее значение RSD, полученные в условиях промежуточной прецизионности, не превышает 5%. Полученные результаты удовлетворяют требованиям к прецизионности аналитических методик.

Правильность методики исследовали, рассчитывая величину степени извлечения ($R, \%$) и Отклонение степени извлечения от 100% (ϵ), аналита в растворе, рассчитанные по формулам 27 и 28, соответственно. Исследовали модельные растворы образцов ИЛП с добавками тиомерсала 10, 20 и 40 мкг/мл и растворы тиомерсала, приготовленные по точным навескам. За теоретическое содержание в модельных растворах (x_i) принимали экспериментальное значение, полученное в образце без добавки в сумме с известным добавленным количеством (Таблица 52).

Как следует из таблицы 52, 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%) [78, 139].

Таблица 52 – Оценка правильности методики ААС XII

Наименование испытуемого раствора	Теоретическое значение содержание тиомерсала (x_i), мкг/мл	Экспериментальное значение содержания тиомерсала (y_i), (n=3), мкг/мл	Степень извлечения R, %	Отклонение степени извлечения от 100% (E)
MP15	-	44,7	-	-
MP16	54,7	53,3	97,4	-2,60
MP17	64,7	65,3	100,9	0,9
MP18	84,7	85,6	101,1	1,06
MP19	-	45,5	-	-
MP20	55,5	56,6	101,9	1,98
MP21	65,5	69,8	106,6	6,56
MP22	85,5	90,7	106,1	6,08
MP23	-	46,1	-	-
MP24	56,1	56,5	100,7	0,70
MP25	66,1	68,0	102,9	2,87
MP26	86,1	91,9	106,7	6,74
MP27	-	107,2	-	-
MP28	117,2	116,1	99,0	-0,94
MP29	127,2	124,4	97,8	-2,20
MP30	147,2	141,3	96,0	-4,01
MP31	-	89,8	-	-
MP32	99,8	93,6	93,8	-6,21
MP33	109,8	105,5	96,1	-3,92
MP34	129,8	120,9	93,1	-6,86
MP5	-	93,0	-	-
MP13	103,0	102,2	99,2	-0,78
MP14	113,0	104,1	92,1	-7,88
MP9	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	

Результаты удовлетворяют требованиям к аналитическим методикам.

Предел количественного определения (ПКО) и предел обнаружения (ПО) рассчитывали в соответствии с указаниями в ОФС «Валидация аналитических методик» ГФ РФ [26]. Значения данных показателей при расчете составили: ПКО = $10 \times S/b = 3,43$ мкг/л и ПО = $3,3 \times S/b = 1,13$ мкг/л. Расчет вели, учитывая уравнения калибровочных зависимостей, полученные при определении линейности.

Чувствительность методики подтверждает возможность ее применения для обнаружения следовых количеств тиомерсала в готовых бесконсервантных формах.

Робастность

На примере испытаний модельных растворов тиомерсала 100 мкг/мл и образцов ИЛП, исследовали робастность методики, а именно влияние изменения состава растворителя, количества реагентов, количество образца, конечного объема испытуемого раствора на полученные результаты.

Рассчитывали отклонение полученных результатов от теоретического - 100 мкг/мл и от среднего значений концентрации исследуемых растворов. Величина отклонения не должна превышать 10% (Таблица 53 - 54).

Таблица 53 - Робастность методики при испытании растворов тиомерсала

Состав разводящего Раствор	Объем образца, мл	Объем 50% серной кислоты, мл	Объем 5% калия перманганата, мл	Конечный объем испытуемого образца, мл	Результат, мкг/мл	Отклонение от теоретического значения концентрации, %	Отклонение от среднего значения, %
0,9% NaCl	0,1	1,0	3,0	200	97,52	2,48	2,26
	0,1	2,0	4,0	200	102,4	2,4	2,64
	0,025	1,0	0,8	50	100,1	0,1	0,33
	0,025	0,15	0,2	50	93,4	6,6	6,38
ФБР №1	0,1	1,0	3,0	200	102,3	2,3	2,54
	0,1	2,0	4,0	200	101,95	1,95	2,18
	0,025	1,0	0,8	50	103,1	3,1	3,34
	0,025	0,15	0,2	50	97,4	2,6	2,38
Среднее значение					99,77		
Стандартное отклонение					3,39		
RSD, %					3,40		

Таблица 54 - Робастность методики при испытании образцов ИЛП

Испытуемый образец	Объем образца, мл	Объем 50% серной кислоты, мл	Объем 5% калия перманганата, мл	Конечный объем испытуемого образца, мл	Результат, мкг/мл	Отклонение от среднего значения, %
Образец 15	0,1	1	3	200	114,9	1,4
	0,1	2	4	200	112,2	1,5
	0,025	1	0,8	50	114,3	0,6
	0,025	0,15	0,2	50	113,5	0,2
Среднее значение					113,7	
Стандартное отклонение					1,17	
RSD,%					1,03	
Образец 16	0,1	1	3	200	102,5	1,1
	0,1	2	4	200	100,1	1,3
	0,025	1	0,8	50	101,0	0,4
	0,025	0,15	0,2	50	102,1	0,7
Среднее значение					101,4	
Стандартное отклонение					0,94	
RSD,%					0,93	

Как следует из таблиц 53 - 54, в условиях смены состава растворителя, состава и объема реакционной смеси получены значения стандартного отклонения менее допустимого предела 10% (3,4% - для растворов тиомерсала, отличающихся составом растворителей и около 1% - для испытуемых образцов ИЛП).

Полученный результат подтверждает способность методики сохранять характеристики, найденные в оптимальных условиях проведения анализа.

Таким образом, разработана следующая методика определения тиомерсала в ИЛП:

Обрудование и реактивы

Анализатор ионов ртути с проточно-инжекционной системой дозирования.

Рабочий стандартный раствор ртути 10 мкг/мл готовят с использованием коммерческого стандарта с концентрацией ртути 1г/л, в качестве растворителя используют 3% раствор хлористоводородной кислоты. В качестве альтернативного варианта используют раствор тиомерсала: точную навеску тиомерсала около 0,1000 г растворяют путем

последовательных разведений в ФБР рН 7,2.

Условия пробоподготовки испытуемых образцов следующие: 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 гидроксиламина сульфата (20%) - 200 мкл. Растворитель - хлористоводородная кислота (3%), общий объем раствора - 50 мл.

Дозирование образцов осуществляется с помощью приточно-инжекционной дозирующей системы прибора, объем пробы 500 мкл, смешивается в сепараторе с восстанавливающим агентом, раствором хлорида олова 1,1% обеспечивающим получение атомарной ртути.

Результаты валидации методики представлены в таблице 55.

Таблица 55 - Сводная таблица валидационных параметров

Параметр	Мера	Критерии приемлемости	Результат	Соответствие (да/нет)
Специфичность	1. Ионы ртути не должны определяться в образцах не содержащих тиомерсал и определяться в образцах, содержащих тиомерсал.	Отсутствие сигналов от компонентов матрицы.	Ионы ртути отсутствуют в образцах не содержащих тиомерсал	Да
Повторяемость	RSD	$\leq 10,0\%$	2,6%	Да
Промежуточная прецизионность	RSD	$\leq 10,0\%$	Менее 5%	Да
Линейность и диапазон	Визуальная оценка калибровочной характеристики	Линейная регрессия	Линейная регрессия	Да
	Коэффициент корреляции (R)	$R \geq 0,99$	Более 0,99	Да
Правильность	Среднее значение выявления	90,0%-110,0%	102,5%	Да
ПО	Минимальная обнаруживаемая концентрация	-	$2,3 \times 10^{-3}$ мкг/мл	Да

Продолжение таблицы 55

ПКО	Минимальное определяемое количество	-	$6,9 \times 10^{-3}$ мкг/мл	Да
Робастность	При изменении матрицы модельного раствора, количества реагентов и объема реакционной смеси, RSD полученных значений не должно превышать 10%	$\leq 10,0\%$	3,4%	Да

Все валидационные характеристики методики, установленные в ходе испытаний, соответствуют фармакопейным требованиям и подтверждают возможность применения методики для контроля качества ИЛП по показателю «Тиомерсал» [26].

3.2. Аттестация стандартного образца содержания тиомерсала в ИЛП. Оценка сопоставимости результатов, полученных с применением колориметрической и ААС ХП методик

Исследовали возможность использования ФСО 3.1.00427 содержания мертиолята в сорбированных препаратах, аттестованного ранее колориметрической методикой В качестве для контроля испытаний ИЛП по показателю «тиомерсал» методикой ААС ХП. С этой целью оценивали сопоставимость результатов определения тиомерсала в ФСО 3.1.00427, полученных колориметрической и ААС ХП методиками.

Сопоставимость результатов, полученных с применением колориметрической и ААС ХП методик, рассчитывали с помощью однофакторного дисперсионного анализа с вычислением *F*-критерия, сравнивая равнозначные выборки результатов, полученных двумя методами, объемом по сорок измерений ($n=40$) (Таблица 56).

Таблица 56 - Оценка сопоставимости результатов определения тиомерсала колориметрической и ААС ХП методиками в ФСО 3.1.00427

Статистические характеристики		Методики определения тиомерсала	
		ААС ХП	КФ
Среднее значение (n=40)	X_{cp}	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)	$X_{cp\ cp}$	88,43	
Стандартное отклонение средних значений	S_{cp}	0,89	
Дисперсия средних	S^2	0,80	
Внутригрупповая дисперсия	$S_{внут}$	24,76	
Межгрупповая дисперсия	$S_{меж}$	31,83	
Значение критерия Фишера	F	1,29	
Табличное значение критерия Фишера (доверительная вероятность 95%)	$F_{крит}$	3,96	

Как следует из таблицы 56, значение F -критерия ($F(P, v_{меж} = n - 1, v_{вну} = n \times (m - 1))$) рассчитанное по формуле 22, составило 1,29.

Значения внутригрупповой ($S_{вну}^2$) и межгрупповой ($S_{меж}^2$) дисперсий, рассчитаны по формулам 23 и 24, соответственно.

Средние значения результатов определения тиомерсала колориметрической методикой и методикой ААС ХП (\bar{X}_1 и \bar{X}_2), среднее значение по двум выборкам (\bar{X}_{cp}) рассчитаны по формуле 1.

Стандартные отклонения (S_1 и S_2) и стандартное отклонение средних значений (S_{cp}) рассчитаны по формуле 2.

Внутригрупповое ($V_{вну}$) и межгрупповое ($V_{меж}$) число степеней свободы, рассчитанные по формулам 25 и 26, составили 78 и 1 соответственно.

Полученное при анализе экспериментальных данных значение критерия Фишера составило 1,29, что ниже критического табличного

значения $F_{\text{крит}} = 3,96$ (95%, $V_{\text{меж}} = 1$, $V_{\text{вну}} = 78$). Результаты свидетельствуют о возможности использования ФСО 3.1.00427 содержания тиомерсала в сорбированных препаратах, для методики ААС ХП.

3.3.Резюме

В результате проведенных исследований, была разработана методика определения тиомерсала в составе несорбированных и сорбированных ИЛП с применением метода ААС ХП, для приборов с проточно-инжекционной системой, с детектированием ультрафиолетового излучение при 253,7 нм, паров выделяемой ртути.

Показана возможность применения ГСО ионов ртути, а также альтернативных вариантов растворов ионов ртути для ААС, для построения калибровочной характеристики методики. Установлена аналитическая область методики в диапазоне от 10 до 40 мкг/л ионов ртути.

Показана возможность применения раствора тиомерсала, приготовленного по точной навеске для построения калибровочной характеристики в аналитическом диапазоне концентраций тиомерсала от 20 до 80 мкг/л. Предложен способ расчета содержания тиомерсала в образце с учетом навески тиомерсала и чистоты реактива.

Подобраны условия предварительной пробоподготовки и минерализации испытуемых образцов: 25 мкл испытуемого образца, минерализуется следующим составом реагентов - 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 раствора - 50 мл.

Методика соответствует требованиям к аналитическим методам контроля качества лекарственных препаратов и валидирована в соответствии с рекомендациями руководящих документов. Показана возможность

применения разработанной методики для контроля качества исследованных групп препаратов ИЛП по показателю «Тиомерсал».

Внесено изменение в ОФС 1.7.2.0025.15 «Количественное определение тиомерсала в биологических лекарственных препаратах»: указан дополнительный метод ААС ХП.

Расширена область применения ФСО 3.1.00427 содержания тиомерсала в сорбированных препаратах, аттестованного колориметрической методикой при воспроизведении методики ААС ХП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ряд ИЛП, такие как вакцины, анатоксины и аллергены, содержат в своем составе консерванты, что может быть обусловлено особенностями производства, составом и формой выпуска ИЛП. Содержание консервантов в ИЛП строго регламентируется фармакопейными требованиями и нормативными документами на препараты [21, 28, 102, 111].

Необходимость контроля показателей качества препаратов на соответствие требованиям закреплена законодательно [36]. В Российской Федерации производители ИЛП в качестве консервантов используют тиомерсал и фенол [29].

Фармакопейные методики количественной оценки фенола и тиомерсала в ИЛП основаны на колориметрических и спектрофотометрических методах [19, 23, 106]. Однако современные международные требования надлежащей лабораторной практики и соответствующие отечественные руководящие документы в области СМК предъявляют высокие требования к методикам лабораторного контроля качества, а именно, специфичности, чувствительности и точности определения [10, 12]. В то же время, современный уровень технологий в области лабораторного оснащения открывает широкие возможности для разработки и внедрения методик, основанных на высокоточных и высокоселективных методах [52].

Цель настоящего исследования - разработка методик определения в составе ИЛП фенола на базе методов ГЖХ и ВЭЖХ и тиомерсала на базе метода ААС ХП. Исследование возможности применения данных методик для контроля ИЛП по показателям «Фенол» и «Тиомерсал». Валидация и стандартизация разработанных методик, путем аттестации стандартных образцов содержания фенола и тиомерсала для контроля стабильности лабораторных испытаний по данным показателям. При проведении исследования применены общенаучные подходы и специальные методы: высокоэффективная жидкостная хроматография, газо-жидкостная

хроматография, атомно-абсорбционная спектрометрия холодного пара, спектрометрия.

В процессе разработки методики определения фенола ГЖХ, на начальном этапе, была экспериментально подобрана хроматографическая капиллярная колонка с полярной неподвижной фазой — полиэтиленгликоль, размерами $30 \text{ м} \times 0,25 \text{ мм} \times 0,25 \text{ мкм}$, показавшая более высокоэффективное разделение раствора, содержащего смесь фенола и компонентов.

Для данной колонки подобраны хроматографические условия, обеспечивающие максимальную эффективность хроматографической системы для смеси фенола и компонентов: объем пробы 0,5 мкл, температура инжектора 250°C , деление потока 1:40, скорость газа-носителя в колонке 1,4 мл/мин, режим термостата колонки: начальная температура - 160°C (3 мин), градиент $40^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до температуры 200°C (0,6 мин), градиент $40^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до температуры 220°C , температура детектора 250°C .

Подбор условий хроматографирования осуществлен, посредством контроля показателей эффективности разделения (таких как фактор симметрии пиков, чгт, разрешение пиков) смеси фенола и компонентов, и получения максимальных значений эффективности хроматографической системы [24, 104].

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 [26, 139]. В состав стандартных растворов был добавлен внутренний стандарт - 2-феноксиэтанол, выбранный на основании показателей эффективности разделения и расчета RSD времен удерживания [24, 104].

Выбран способ расчета в относительных единицах с использованием внутреннего стандарта [24]. При расчете концентрации фенола показана более высокая повторяемость (RSD не превышало 1%) при расчетах методом внутреннего стандарта по сравнению с прямым способом расчета.

Линейность методики оценивали по коэффициенту детерминации, составившему не менее 0,9990, RSD значений для каждой точки регрессионной зависимости, не превысившему 1,0% и оценки отклонения расчетных от экспериментальных значений с расчетом параметра t для каждой точки диапазона калибровочной характеристики и сравнении полученных значений с критерием Стьюдента – не превысивших критического значения критерия Стьюдента t (95%, $f=n-2$), составляющего 2,776 (95%, $f=4$) [26,50,139].

За аналитическую область приняли диапазон концентраций от 1,0 мг/мл до 5,0 мг/мл, с использованием трех стандартных растворов с концентрациями 1,0; 3,0 и 5,0 мг/мл.

Исследование влияния компонентов ИЛП на определения фенола методом ГЖХ, при испытании образцов и модельных смесей и сравнительный анализ результатов испытаний в сравнении с колориметрической и спектрофотометрической методиками, показали возможность прямого определения фенола в ИЛП без предварительной пробоподготовки. Специфичность методики подтверждается отсутствием пиков с временами удерживания фенола и 2-феноксиэтанола на хроматограммах холостого раствора, совпадением значений времен удерживания пиков на хроматограммах испытуемого и стандартного растворов, отсутствием посторонних сигналов в области времен удерживания фенола и 2-феноксиэтанола [26, 139].

Значения RSD полученных результатов при оценке промежуточной прецизионности методики не превысило 2% в исследованиях модельных образцов ИЛП с добавками фенола 0,2; 0,4; 0,6 и 1 мг, при обсчете значений трех независимых испытаний [9, 93].

При оценке правильности методики получены значения величины степени извлечения (R) $100,6 \pm 0,8\%$, и отклонение степени извлечения от 100% (E) от (-0,3%) до (+1,6%) фенола в модельных растворах с известным добавленным количеством. Таким образом, правильность методики,

находится в пределах 2% от условно истинной величины, при допустимых 15% [78, 139].

Анализ регрессионной зависимости между теоретическими (x_i) и экспериментальными (y_i) значениями фенола показал отсутствие статистической значимости отклонений углового коэффициента от 1 и коэффициента сдвига от 0, коэффициент детерминации равен 1, что подтверждает правильность методики [26].

Регрессионный анализ и расчет F-критерия Фишера показал отсутствие статистической значимости систематической ошибки методики, рассчитанное значение F-критерия ($F(P, f_1 = m - 1, f_2 = m - 2)$), составило 1,00016, при $N=72$ и степенях свободы $f_1=71$, $f_2=70$ при доверительной вероятности 95%, что не превышает критического табличного значения $F_{\text{крит}} = 1,35$ (95%, $f_1=71$, $f_2=70$).

Валидационные характеристики методики, установленные в ходе испытаний, соответствуют фармакопейным требованиям [26].

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, чтт не менее 180000 [24,104].

На следующем этапе работы разработана методика определения фенола в ИЛП с применением метода ВЭЖХ. На основе литературных данных подобрана колонка с неподвижной фазой C18, размерами 150 мм×4,6 мкм, зернением 5 мкм, способ детектирования с помощью диодно-матричного УФ детектора при 270 нм [22, 35, 54, 57, 82, 112, 156, 159, 172, 178, 194, 201, 208, 210, 211, 219, 223, 236].

Экспериментально подобраны состав подвижной фазы – ацетонитрил в 0,5% уксусной кислоте в соотношении 1:4, степень разведения образцов ИЛП в 25 раз, объем инъекции 20 мкл при скорости потока 1,0 мл/мин, в изократическом режиме, с учетом рекомендаций по критериям приемлемости ГФ РФ [24] и ЕФ [104].

Аналитическая область установлена в диапазоне от 0,05 мг/мл до 0,15 мг/мл. Выбрали способ построения калибровочной характеристики путем инжектирования разных объемов стандартного рабочего раствора фенола, концентрацией 0,1 мг/мл, по трем стандартам, 0,05; 0,1; 0,15 мг. При оценке степени линейности, значение коэффициента детерминации составило 1,0000, RSD значений площадей пика фенола для каждой концентрации калибровочных растворов составило не более 0,3 %, отклонение расчетных значений от экспериментальных, для каждой концентрации, не превысило критического значения критерия Стьюдента [26, 50, 139].

Расчет содержания фенола производится по формуле, учитывающей массу навески и чистоты реактива, используемого для приготовления рабочего стандартного раствора фенола.

Специфичность методики показана при испытании тринадцати образцов ИЛП. RSD, полученные в условиях промежуточной прецизионности не превышают 2,6% для каждого из образцов, на хроматограммах испытуемых образцов отсутствуют пики, совпадающие по времени удерживания с пиками фенола, отклонение времен удерживания фенола на хроматограммах испытуемых и стандартных образцов $\pm 0,003$ минуты не превышает рекомендуемые 2 секунды. Значения RSD в сравнительном анализе с фармакопейными методами не превышает 6,2%, для 10 из 13 образцов не превышает 3% [26, 139].

Значения RSD полученных результатов при оценке промежуточной прецизионности методики не превысило 3% в исследованиях модельных образцов ИПЛ с добавками фенола 0,2; 0,4; 0,6 и 1 мг, при обсчете значений трех независимых испытаний [9, 93].

При оценке правильности методики получены значения величины степени извлечения (R) $99,8 \pm 0,9\%$, и отклонения степени извлечения от 100% (E) от (-0,6%) до (+0,9%) фенола в модельных растворах с известным добавленным количеством. Таким образом, правильность методики,

находится в пределах 2% от условно истинной величины, при допустимых 15% [78, 139].

Анализ регрессионной зависимости между теоретическими (x_i) и экспериментальными (y_i) значениями фенола показал отсутствие статистической значимости отклонений углового коэффициента от 1 и коэффициента сдвига от 0, коэффициент детерминации равен 0,9976 (выше минимально допустимых значений 0,99), что подтверждает правильность методики [26].

Регрессионный анализ и расчет F-критерия Фишера показал отсутствие статистической значимости систематической ошибки методики, рассчитанное значение F-критерия ($F(P, f_1 = m - 1, f_2 = m - 2)$), составило 0,6778, при $m=72$ и степенях свободы $f_1=71$, $f_2=70$ при доверительной вероятности 95%, что не превышает критического табличного значения $F_{\text{крит}} = 1,35$ (95%, $f_1=71$, $f_2=70$) [50, 93].

Валидационные характеристики методики, установленные в ходе испытаний, соответствуют фармакопейным требованиям [26].

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, чгт пика фенола должно быть не менее 5000 [24,104].

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 [27], 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 95%, со степенями свободы $V_{\text{меж}} = 1$, $V_{\text{вну}} = 78$ [9].

При анализе сопоставимости результатов определения фенола методиками ГЖХ и спектрофотометрической, значение F -критерия ($F(P, v_{\text{меж}} = n - 1, v_{\text{вну}} = n \times (m - 1))$) составило 23, что превышает критическое значение $F_{\text{крит}} = 3,96$ (95%, $V_{\text{меж}} = 1$, $V_{\text{вну}} = 78$, в связи с более высокой прецизионностью методики ГЖХ. Для данной методики аттестован ФСО 3.1.00451 с аттестованной характеристикой содержания фенола от 2,92 до 3,28 мг/мл [9].

В процессе разработки методики определения тиомерсала методом атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара ртути, исследовали актуальный диапазон концентраций от 2,0 до 100,0 мкг/л, используя коммерческие стандартные растворы ионов ртути. Определили линейную область - в диапазоне концентраций ртути от 10 до 40 мкг/л. Степень линейности методики оценивали по коэффициенту детерминации, составившему не менее 0,99, RSD значений для каждой точки регрессионной зависимости, не превысившему 6,0% и отклонению (t) расчетных значений от экспериментальных, для каждой точки диапазона калибровочной характеристики - не превысивших критического значения критерия Стьюдента t (95%, $f = n - 2$), которое составляет 2,5706 (95%, $f = 5$). Аналитическая область методики установлена в диапазоне концентраций от 10,0 мкг/л до 40,0 мкг/л, калибровочная характеристика строится по семи концентрациям: 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 35,0; 40,0 мкг/л [26, 139].

Отработаны условия пробоподготовки испытуемых образцов, экспериментально подобраны: количество образца, состав и соотношение реагентов для минерализации, оптимальное разведение и объем испытуемого раствора. В связи с различием пробоподготовки стандартных и испытуемых растворов, показана возможность использования растворов тиомерсала, приготовленных по навеске для построения калибровочной характеристики используя в качестве растворителя ФБР pH 7,2.

Предложен способ расчета содержания тиомерсала по калибровочной характеристике с использованием стандартных растворов ионов ртути и растворов тиомерсала, приготовленных по навеске с учетом массы навески и чистоты реактива. В сравнительных испытаниях ИЛП с разным способом построения калибровки, полученные значения RSD не превысили 3%.

Показана возможность применения разработанной методики для исследования сорбированных ИЛП, значения содержания тиомерсала, полученные для сорбированных ИЛП соответствуют требованиям НД, в сравнительных испытаниях с колориметрической методикой, значения RSD не превысило 7%.

Специфичность методики подтверждается при исследовании образцов, содержащих тиомерсал и бесконсервантных ИЛП, (в последних присутствие тиомерсала не обнаруживается). А так же, при исследовании растворов, содержащих разные объемы сорбированного образца: 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 35,0; 40,0 мкл, для которых показана линейная регрессионная зависимость поглощения от объема образца, с коэффициентом детерминации 0,991 [26, 139].

Отсутствие влияния систематической ошибки подтверждено при оценке значимости коэффициента сдвига уравнения регрессионной зависимости между теоретическими (x_i) и найденными (y_i) значениями. Значение F-критерия ($F(P, f_1 = m - 1, f_2 = m - 2)$), составило 0,16, при $N=7$ и степенях свободы $f_1=6$, $f_2=5$ при доверительной вероятности 95%, что не

превышает критического табличного значения F (95%, $f_1=6$, $f_2=5$) равного 4,95 [50, 93].

При оценке повторяемости и промежуточной прецизионности методики получены значения RSD не более 3% и не более 5% соответственно [26, 139].

При оценке правильности полученные значения степени извлечения для модельных растворов $R(\%)$ находятся в пределах 90,0% - 106,6%, для растворов тиомерсала 101,7% - 108,8%, что менее 10% от номинального значения (90 – 110%), максимальное значение отклонения степени извлечения от 100% $\varepsilon(\%)$ - (max 9,1%), находится в границах рекомендованных FDA и EMA не более 15 % [78, 139].

Полученные значения при определении ПО и ПКО составили 1,13 мкг/л и 3,43 мкг/л ртути соответственно, или $2,3 \times 10^{-3}$ мкг/мл и $6,9 \times 10^{-3}$ мкг/мл тиомерсала соответственно, что говорит о возможности применения методики для контроля остаточного содержания тиомерсала в бесконсервантных препаратах [26,139].

Все валидационные характеристики методики, установленные в ходе испытаний, соответствуют фармакопейным требованиям [26].

Показана сопоставимость результатов определения тиомерсала колориметрической и ААС ХП методиками, критерий Фишера составил 1,29 и не превысил критического $F_{\text{крит}} = 3,96$ (95%, $V_{\text{меж}} = 1$, $V_{\text{вну}} = 78$). На основании этих данных был сделан вывод о возможности расширения области действия ФСО 3.1.00427 содержания тиомерсала в сорбированных препаратах, с указанием методики ААС ХП [9].

Таким образом, осуществлена оптимизация методической базы количественной оценки фенола и тиомерсала в ИЛП, разработаны методики количественного определения фенола методами ГЖХ и ОФ ВЭЖХ и тиомерсала методом ААС ХП, методики валидированы и соответствуют требованиям руководящих документов к аналитическим методикам. Разработаны стандартные образцы содержания фенола ФСО 3.1.00449

содержания фенола (спектрофотометрический, ВЭЖХ), ФСО 3.1.00451 содержания фенола (газожидкостная хроматография), для внутрилабораторного контроля проведения испытаний по показателю «фенол» в ИЛП спектрофотометрическим, ОФ ВЭЖХ и ГЖХ методами. Расширена область применения ФСО 3.1.00427 с указанием метода 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 анализа фармакопейными и новыми высокотехнологичными методиками.
3. Разработка и аттестация стандартных образцов для контроля стабильности испытаний по показателям качества иммунобиологических лекарственных препаратов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ААС ХП – атомно-абсорбционная спектрофотометрия холодного пара

ВОЗ - Всемирная Организация Здравоохранения

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография

ГЖХ – газожидкостная хроматография

ГФ РФ – государственная фармакопея Российской Федерации

ЕАЭС – Евразийский экономический союз

значения переменных x и y

ИЛП – иммунобиологические лекарственные препараты

Консерванты – вещества, обладающие бактериостатическим эффектом, используются в производстве ИЛП для исключения контаминации биотехнологического продукта

КФ – колориметрический метод

НД – нормативная документация

ОФ ВЭЖХ – Обращенно-фазовая ВЭЖХ

ОФС – общая фармакопейная статья

СМК – система менеджмента качества

СО – стандартный образец

СФ – спектрофотометрический метод

ФСО – фармакопейный стандартный образец

ФБР – фосфатно-буферный раствор

Чтт – число теоретических тарелок

Δx – полуширина доверительного интервала величины

a – коэффициент сдвига линейной зависимости

b – угловой коэффициент линейной зависимости

EDQM – European Directorate for the Quality of Medicines – Европейский директорат по качеству лекарственных средств и здравоохранения S – стандартное отклонение

F – критерий Фишера

f, V – число степеней свободы

FDA – Food and Drug Administration – Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов

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

GMP-Good Manufacturing Practice (Надлежащая производственная практика) – система норм, правил и указаний, которые устанавливают требования к организации производства и контролю качества лекарственных средств

ICH – International Council for Harmonisation

i, j – порядковый номер варианты

k – константа приемлемости для f степеней свободы

m – количество совокупностей

M – эталонное значение дозы

N – количество значений, равное количеству точек калибровки \times количество параллельных измерений)

n – количество точек

P – доверительная вероятность

r – коэффициент корреляции

R – степень извлечения

RSD – relative standard deviation - относительное стандартное отклонение (коэффициент вариаций)

S – стандартное отклонение

s^2 – дисперсия

t – критерий Стьюдента

USP–United States Pharmacopeia – Фармакопея США

\bar{x}, \bar{y} – средние выборки (координаты центра линейной зависимости)

x, y – текущие координаты в уравнении линейной зависимости

X_i, Y_i – вычисленные координаты, исходя из уравнения линейной зависимости

x_i, y_i – i -тая варианта (i -тая пара экспериментальных значений x и y)

δ – относительная величина систематической ошибки

ε –отклонение степени извлечения от 100%

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеева, И.А. Коклюшные вакцины и роль липоолигосахарида *Bordetella pertussis* в иммунном ответе на коклюшную инфекцию и вакцинацию / И.А. Алексеева, О.В. Перельгина, Е.Д. Кольшикина // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2021. - №21(1). – С.10-19.
2. Болдырев, А.А. Нейрохимия / А.А. Болдырев, В.А. Илюха, Е.И. Кяйвярйнен. - Москва, 2010.
3. Большая Российская Энциклопедия т.3 [Электронный ресурс]. - М., 1992. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).
4. Бондарев, В.П. Проблема аттестации отраслевых стандартных образцов для контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов / В.П. Бондарев, И.В. Борисевич, Р.А. Волкова, О.В. Фадейкина // Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения. - 2013. - №2. – С. 28-32.
5. Волкова, Р.А. Система контроля качества медицинских иммунобиологических препаратов химическими и иммунохимическими методами: дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.23. Волкова Рауза Асхатовна М., 2009 – 276 с.
6. Волкова, Р.А. Методики контроля или методики испытаний – к вопросу о метрологическом обеспечении аналитических методик / Р.А. Волкова // Справочник заведующего КДЛ. – 2013. - №4. – С. 4-9.
7. Всемирная организация здравоохранения (2012): Шестьдесят пятая сессия всемирной ассамблеи здравоохранения: Глобальный план действий в отношении вакцин [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA65/A65_R17-ru.pdf (дата обращения 20.04.2023).
8. Всемирная организация здравоохранения (2018): Стратегическая консультативная группа экспертов по иммунизации: Доклад об оценке осуществления Глобального плана действий в отношении вакцин, 2018 год.

(Женева, Швейцария) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/279947/WHO-IVB-18.11-rus.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (дата обращения 11.04.2023).

9. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / Гланц С. - М.;1999.
10. ГОСТ 33044-2014 Принципы надлежащей лабораторной практики. – М.: Стандартиформ, 2019. – 16 с.
11. ГОСТ 8.736-2011 Государственная система обеспечения единства измерений. Измерение прямые многократные. Методы обработки результатов измерений. Основные положения. – М.: Стандартиформ, 2013. – 23 с.
12. ГОСТ ISO/IEC 17025-2019 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий. – М.: Стандартиформ, 2021. – 32 с.
13. ГОСТ Р 52249-2009 Правила производства и контроля качества лекарственных средств. – М.: Стандартиформ, 2010. – 132 с.
14. ГОСТ Р 8.563-2009 Государственная система обеспечения единства измерений. Методики (методы) измерений. - М.: Стандартиформ, 2019. – 20 с.
15. ГОСТ Р ISO 9000-2011 Система менеджмента качества. Основные положения и словарь. – М.: Стандартиформ, 2018. – 28 с.
16. ГОСТ Р ISO 9001-2012 Система менеджмента качества. Требования. - М.: Стандартиформ, 2018. – 28 с.
17. ГОСТ Р ИСО 5725 – 2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов 6 частей М.: Стандартиформ, 2002. – 258 с.
18. Государственная Фармакопея Российской Федерации (XIV издание), ОФС.1.2.2.2.0005.15 «Ртуть».
19. Государственная Фармакопея Российской Федерации (XIV издание), ОФС.1.7.2.0025.18 «Количественное определение тиомерсала в биологических лекарственных препаратах».

20. Государственная Фармакопея Российской Федерации (XIV издание), ОФС .1.1.0007.18 «Стандартные образцы».
21. Государственная Фармакопея Российской Федерации (XIV издание), ОФС.1.7.1.0001.15 «Аллергены».
22. Государственная Фармакопея Российской Федерации (XIV издание), ОФС .1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента».
23. Государственная Фармакопея Российской Федерации (XIV издание), ОФС.1.7.2.0028.18 «Количественное определение фенола в биологических лекарственных препаратах».
24. Государственная Фармакопея Российской Федерации (XIV издание), ОФС .1.4.2.0001.15 «Хроматография».
25. Государственная Фармакопея Российской Федерации (XIV издание), ОФС 1.4.2.0004.15 «Газовая хроматография».
26. Государственная Фармакопея Российской Федерации (XIV издание), ОФС .1.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик».
27. Государственная Фармакопея Российской Федерации (XIV издание), ОФС .1.4.2.0008.18 «Однородность дозирования».
28. Государственная Фармакопея Российской Федерации (XIV издание), ОФС .1.7.1.0004.15 «Вакцины и анатоксины».
29. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://grls.rosminzdrav.ru/> (дата обращения: 13.03.23).
30. Груздев, И.В. Определение монозамещенных нитрофенолов в воде методом газовой хроматографии / И.В. Груздев, Б.М. Кондратёнок, Е.И. Лю-Лян-Мин // Аналитика и контроль. - 2020. - Т. 24, № 2. - С. 142 - 151.
31. Карсакова, Ю.В. Определение фенолов методом жидкостной хроматомасспектрометрии с предварительным сорбционным концентрированием на магнитном гидрофобизированном кремнеземе / Ю. В. Карсакова, А. И. Фролова, Т. И. Тихомирова, Г. И. Цизина // Журнал

аналитической химии. – 2022. - №12. – С. 1080 – 1086.

32. Курсаков, С.В. Разработка и валидация методики определения глюкозаминилмурамилдипептида в водных растворах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / С.В. Курсаков, Е.Г. Кузнецова, О.М. Курылева, Л.А. Саломатина, С.В. Гурьянова, О.Ю. Борисова, Г.О. Гудима, В.И. Севастьянов // Иммунология. – 2020. - №1 – С. 74–82.

33. Методические указания по применению физико-химических и химических методов контроля медицинских биологических препаратов / В.Ф. Рунова, В.Ю. Гавриленкова, Г.А. Максимова, И.В. Черняховская, Р.А. Волкова, Э.И. Конду // Методические указания. Москва, 1982. - 41 с.

34. Нельсон, Д. Основы биохимии Ленинджера в 3х томах / Д.Нельсон, М. Кокс. – Москва, 2011.

35. Носикова, А.А. Определение фенольных соединений в дезинфекционных средствах / А.А. Носикова, И.О. Мельников, А.Н. Кочетов // Тонкие химические технологии. - 2017. - Т12 №3. С. 5 - 20.

36. Об обращении лекарственных средств №61 ФЗ: [Федер. Закон: принят Госдумой от 24.03.2010. п. 7 в ред. Федерального закона от 22.12.2014 №429 –ФЗ] – М.: Кремль, 2010. - 142 с.

37. Онищенко, Г.Г. Сравнительная характеристика вакцин против COVID-19, используемых при проведении массовой иммунизации / Г.Г.Онищенко, Т.Е. Сизикова, В.Н. Лебедев, С.В. Борисевич // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2021. – Vol. 21(3). – P.158-166.

38. Патент 989410 СССР, МПК G01N21/78 Способ определения фенола в аллергенах / Волкова Р.А., Каргина Т.М., Гавриленкова В.Ю., Рунова В.Ф.; заявитель и патентообладатель Государственный Научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича № 3289671/23-04 заявл. 20.03.1981; опубл. 15.01.1983 - 4с.

39. Патент РФ 2188416 Российская Федерация, МПК G01N30/00 Способ количественного определения фенола в крови / Зайцева Н.В., Уланова Т.С., Нурисламова Т. В., Гаранин В.П., Ренев С.В., Попова Н.А.; заявитель и патентообладатель Пермский научно-исследовательский институт детской экопатологии. № 2001127025/28 заявл. 04.10.2001; опубл. 27.08.2001 – 11 с.

40. Патент РФ 2200958 Российская Федерация, МПК G01N33/84 Способ количественного определения фенола в моче / Зайцева Н.В., Гаранин В.П., Уланова Т.С., Нурисламова Т. В., Попова Н.А., Ренев С.В.; заявитель и патентообладатель Пермский научно-исследовательский институт детской экопатологии. № 2001122829 заявл. 14.08.2001; опубл. 20.03.2003 – 12 с.

41. Патент РФ 2344417 Российская Федерация, МПК G01N33/18, G01N30/14 Способ количественного определения фенола в водных средах / Груздев И.В., Шапчиц Т.Н., Кондратенок Б.М.; заявитель и патентообладатель Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук № 2007145883/04 заявл. 10.12.2007; опубл. 20.01..2009 – 9 с.

42. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 06.12.2021 № 1122н "Об утверждении национального календаря профилактических прививок, календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям и порядка проведения профилактических прививок" (Зарегистрирован 20.12.2021 № 66435)

43. Р 50.2.090-2013 Государственная система обеспечения единства измерений. Методики количественного химического анализа. Общие требования к разработке, аттестации и применению. М.: Стандартинформ 2014. – 18 с.

44. РМГ 61-2010 Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки. – М.: Стандартинформ, 2013. – 62 с.

45. РМГ 76-2014 Государственная система обеспечения единства измерений. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа. – М.: Стандартиформ, 2016. – 114 с.
46. Рунова, О.Б. Количественное определение фенола в аллергенах и вакцинах методикой газожидкостной хроматографии / О.Б. Рунова, Р.А. Волкова // Клиническая лабораторная диагностика. - 2000. - №7. - С.12.
47. Стандартные образцы в измерениях и технологиях, I Международная конференция: сборник трудов. – Екатеринбург, 2013. – 254 с.
48. ФС 42-3874-99 Физико-химические, химические, физические и иммунохимические методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов – М.,1999.
49. Шмидт, Р. Физиология человека в 3х томах / Р.Шмидт, Г. Тевс. - Москва, 2010.
50. Эпштейн, Н.А. Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ методик в фармацевтическом анализе (обзор) / Н.А. Эпштейн // Химико-фармацевтический журнал. – 2004. - №4. - Р.40–56.
51. Abdullahi, L.H. Improving vaccination uptake among adolescents. / L.H. Abdullahi, B.M. Kagina, V.N. Ndze, G.D. Hussey, C.S. Wiysonge // Cochrane Database Syst Rev. – 2020. – Vol. 1(1). - CD011895.
52. Agilent Technology GC Catalog (USA): [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.agilent.com/search/?Ntt=5991-5213EN_GC_Catalog_LR (дата обращения 10.0. 2023).
53. Aguilar Anyaурома, Y.M. Aclaración sobre el tiomersal en las vacunas [Clarification on thiomersal in vaccines] / Aguilar Anyaурома YМ. // Aten Primaria. - 2020. - 52(7). – P. 505.
54. Alcudia-León, M.C. Determination of phenols in waters by stir membrane liquid–liquid–liquid microextraction coupled to liquid chromatography with ultraviolet detection / M.C. Alcudia-León, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, // Journal of Chromatography A. – 2011. – Vol. 1218 (16). – P. 2176-2181.

55. Al-Halifa, S. Nanoparticle-Based Vaccines Against Respiratory Viruses. / S.Al-Halifa, , L. Gauthier, D. Arpin, S. Bourgault, D. Archambault // *Front Immunol.* – 2019. – Vol.10. – P. 22.
56. Al-Saleh, I. The extent of mercury (Hg) exposure among Saudi mothers and their respective infants / I. Al-Saleh, M. Abduljabbar, R. Al-Rouqi, C. Eltabache, T. Al-Rajudi, R. Elkhatib, M. Nester // *Environ Monit Assess.* – 2015. – Vol. 187(11). – P. 678.
57. Arce, M.M. Easy-to-use procedure to optimise a chromatographic method. Application in the determination of bisphenol-A and phenol in toys by means of liquid chromatography with fluorescence detection / M.M. Arce, S. Sanlloriente, M.C. Ortiz, L.A. Sarabia // *Journal of Chromatography A.* – 2018. – Vol. 1534. - P. 93-100.
58. Aung, M.T. Cross-Sectional Estimation of Endogenous Biomarker Associations with Prenatal Phenols, Phthalates, Metals, and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Single-Pollutant and Mixtures Analysis Approaches. / M.T. Aung, Y. Yu, K.K. Ferguson, D.E. Cantonwine, L. Zeng, T.F. McElrath, S. Pennathur, B. Mukherjee, J.D. Meeker // *Environ Health Perspect.* – 2021. – Vol. 129(3). - P. 37007.
59. Azemard, S. Vassileva E. Rapid determination of femtomolar methylmercury in seawater using automated GC-AFS method: Optimisation of the extraction step and method validation / S. Azemard, E. Vassileva // *Talanta.* - 2021. – Vol. 232. – P 122492.
60. Baker, J.P. Mercury, Vaccines and Autism: One Controversy, Three Histories / J.P. Baker // *American Journal of Public Health* – 2008. - Vol. 98 (2). – P. 244-253.
61. Ball, L.K. An assessment of thimerosal use in childhood vaccines / Ball, L.K., R. Ball, R.D. Pratt // *Pediatrics.* – 2001. – Vol.107 (5). - P. 1147 - 1154.

62. Basha M. Chromatography. In: Analytical Techniques in Biochemistry / M. Basha // Springer Protocols Handbooks. - New York, 2020. - P.39 - 59.
63. Bechini, A. Quality and Safety of Vaccines Manufacturing: An Online Survey on Attitudes and Perceptions of Italian Internet Users / A. Bechini, B. Zanella, B. Bonito, S. Paoli, G. Di Pisa, A. Moscadelli, L. Ancillotti, P. Bonanni, S. Boccalini // Vaccines (Basel). – 2021. – Vol. 9(9). – P. 1015.
64. Bechini, A. Vaccine Production Process: How Much Does the General Population Know about This Topic? A Web-Based Survey / A. Bechini, P. Bonanni, B. Zanella, G. Di Pisa, A. Moscadelli, S. Paoli, L. Ancillotti, B. Bonito, S. Boccalini // Vaccines (Basel). – 2021. – Vol. 9(6). – P. 564.
65. Bekemeier, H. Paper chromatography of simple phenols, aromatic hydroxycarboxylic acids & aromatic hydroxycarboxylic acid amides in acid & alkaline media; simultaneously, a review of the literature on chromatography of phenols. / H. Bekemeier // Pharmazie. – 1957. – Vol. 12(4). – P. 181 - 186.
66. Berger, K. Prenatal Exposure to Mixtures of Phthalates, Parabens, and Other Phenols and Obesity in Five-Year-Olds in the CHAMACOS Cohort / K. Berger, C. Hyland, J.L. Ames, A.M. Mora, K. Huen, B. Eskenazi, N. Holland, K.G. Harley // Int J Environ Res Public Health. – 2021. – Vol. 18(4). – P. 1796.
67. Bergstrom, S. The separation of adrenaline and noradrenaline by partition chromatography on a preparative scale / S. Bergstrom, J. Sjovall // Acta Physiol Scand. – 1951. – Vol. 23(1). – P. 91 - 94.
68. Berzofsky, J.A. Construction of peptides encompassing multideterminant clusters of human immunodeficiency virus envelope to induce in vitro T cell responses in mice and humans of multiple MHC types / J. A. Berzofsky, C. D. Pendleton, M. Clerici, J. Ahlers, D. R. Lucey, S. D. Putney, G. M. Shearer // J Clin Invest. – 1991. – Vol. 88(3). P. 876 - 884.
69. Blanco-Pérez, F. Adjuvant Allergen Fusion Proteins as Novel Tools for the Treatment of Type I Allergies. / F. Blanco-Pérez, G. Papp, A. Goretzki // Arch. Immunol. Ther. Exp. – 2019. – Vol. 67. – P. 273 – 293.

70. Bonhoeffer, J. "Adverse events following immunization: perception and evidence / J. Bonhoeffer, U. Heininger // *Current Opinion in Infectious Diseases*. – 2007. – Vol. 20 (3). – P. 237–46.
71. Bramer, C.A. Decline in child vaccination coverage during the COVID-19 pandemic - Michigan Care Improvement Registry, May 2016 - May 2020. / C.A.Bramer, L.M. Kimmins, R. Swanson, J. Kuo, P. Vranesich, L.A. Jacques-Carroll // *Am J Transplant*. – 2020. - Vol. 20(7). – 1930 - 1931.
72. Brehler, R. Allergen characteristics, quality, major allergen content and galenics for mite allergen-specific immunotherapy preparations. / R. Brehler, L. Klimek // *Allergo J Int*. - (2023). – Vol. 32. - P. 5–9.
73. British Pharmacopeia, «Timerosal».
74. Brown, A.L. Vaccine confidence and hesitancy in Brazil / A.L. Brown, M. Sperandio, C.P. Turssi, R.M.A. Leite, V.F.Berton, R.M. Succi, H. Larson, M.H. Napimoga. // *Cad Saude Publica*. – 2018. - Vol. 34(9). – P. 00011618.
75. Burns, J.S. Russian Children's Study. Associations of prepubertal urinary phthalate metabolite concentrations with pubertal onset among a longitudinal cohort of boys / J.S. Burns, O. Sergeyev, M.M. Lee, P.L. Williams, L. Mínguez-Alarcón, B. Plaku-Alakbarova, S. Sokolov, S. Kovalev, H.M. Koch, A.T. Lebedev, R. Hauser, S.A. Korrick // *Environ Res*. – 2022. – Vol. 212. – P. 113218.
76. Caballero-Casero, N. Analytical methods for the determination of mixtures of bisphenols and derivatives in human and environmental exposure sources and biological fluids. A review / N. Caballero-Casero, L. Lunar, S. Rubio // *Anal Chim Acta*. – 2016. – Vol. 908. – P. 22-53.
77. Campanella, B. Determination of thiomersal by flow injection coupled with microwave-assisted photochemical online oxidative decomposition of organic mercury and cold vapor atomic fluorescence spectroscopy / B. Campanella, M. Onor, M.C. Mascherpa, A. D'Ulivo, C. Ferrari, E. Bramanti // *Anal Chim Acta*. – 2013. – Vol. 804. - P. 66-9.

78. Center for drug evaluation and research (1994): Validation of Chromatographic Methods (Washington, USA) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/1-6-13.pdf> (дата обращения: 13.09.23).
79. Centers for Disease Control and Prevention (2020): Immunization Schedules: Vaccination Catch-Up Guidance [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.cdc.gov/vaccines/schedules/hcp/schedule-changes.html> (дата обращения 10.03. 2021).
80. Centers for Disease Control and Prevention (2024): Child and Adolescent Immunization Schedule by Age [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.cdc.gov/vaccines/schedules/hcp/imz/child-adolescent.html> (дата обращения 02.04.2024)
81. Chakravarty, M. Nanotechnology-based antiviral therapeutics / M. Chakravarty, A. Vora // Drug Deliv Transl Res. – 2021. – Vol. - 11(3). – P. 748-787.
82. Chen, W.J. Assessing urinary phenol and paraben mixtures in pregnant women with and without gestational diabetes mellitus: A case-control study. / W.J. Chen, C. Robledo, E.M. Davis, J.R. Goodman, C. Xu, J. Hwang, A.E. Janitz, T. Garwe, A.M. Calafat, J.D. Peck // Environ Res. – 2022. – Vol. – 214 (2). – P. 113897.
83. Clayden, J. Organic Chemistry / J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers. — New York: Oxford University Press, 2012.
84. Conklin, L. Vaccine safety issues at the turn of the 21st century. / L. Conklin, A. Hviid, W.A. Orenstein, A.J. Pollard, M. Wharton, P. Zuber //BMJ Glob Health. – 2021. – Vol. 6(Suppl 2). - e004898.
85. Cooperation on international traceability in analytical chemistry (2015): Guide: Setting and Using Target Uncertainty in Chemical Measurement (Berlin, Germany) [Электронный ресурс]. – Режим

доступа: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/STMU_2015_EN.pdf (дата обращения 26.05.2023).

86. Cordeiro, R.M.S. Measurements recovery evaluation from the analysis of independent reference materials: analysis of different samples with native quantity spiked at different levels. / R.M.S. Cordeiro, C.M.G. Rosa, R.J.N. Bettencourt da Silva // *Accreditation and Quality Assurance*. – 2018. – Vol. 23 (2), P. 57 – 711.

87. Costa-Pinto, J.C. Parental Immunisation Needs and Attitudes Survey in paediatric hospital clinics and community maternal and child health centres in Melbourne, Australia / J.C. Costa-Pinto, H.W. Willaby, J. Leask, M. Hoq, T.Schuster, A. Ghazarian, J. O'Keefe, M.H. Danchin // *J Paediatr Child Health*. – 2018. – Vol. 54(5). - P. 522 - 529.

88. da Cunha, G. K. Thimerosal-containing vaccines and deficit in child development: Population-based study in southern Brazil / G. K. da Cunha, M. B. de Matos, J. P. Trettim, B. B. Rubin, L. de A. Quevedo, K. A. T. Pinheiro, F. M. da C. Coelhoc, R. T. Pinheiro // *Vaccine*. – 2020. – Vol. 38. – P. 2216–2220.

89. Dao, T.L. A method for the separation of four phenolic estrogens in human urine by paper chromatography and an evaluation of biological assay of these compounds / T.L. Dao // *Endocrinology*. – 1957. – Vol. 61(3). – P. 242-55.

90. Davidson, M. Vaccination as a cause of autism-myths and controversies / M. Davidson // *Dialogues Clin Neurosci*. – 2017. - 19(4). – P. 403-407.

91. DeStefano, F. Principal Controversies in Vaccine Safety in the United States / F. DeStefano, H.M. Bodenstab, P.A. Offit // *Clin Infect Dis*. – 2019. – Vol. 69(4). P.726-731.

92. DeStefano, F. Principal Controversies in Vaccine Safety in the United States. / F. DeStefano, H.M. Bodenstab, P.A. Offit // *Clin Infect Dis*. – 2019. – Vol. 69(4). - P. 726-731

93. Doerffel, K. Statistik in der analytischen Chemie/ K. Doerffel. - Leipzig: Dt. Verl. für Grundstoffindustrie, 1990. - 201 c.

94. Doja, A. Genetics and the myth of vaccine encephalopathy / A. Doja // Paediatr Child Health. – 2008. Vol. 13(7). P. 597-9.
95. Doja, A. Immunizations and autism: a review of the literature / A. Doja, W. Roberts // Can J Neurol Sci. – 2006. – Vol. 33(4). – P. 341-6.
96. Dong, Q. Spatial Distribution, Contamination Assessment and Origin of Soil Heavy Metals in the Danjiangkou Reservoir, China / Q. Dong, C. Song, D. Yang, Y. Zhao, M. Yan // Int J Environ Res Public Health. – 2023. – Vol. 20(4). – P. 3443.
97. Dubé, E. Optimizing communication material to address vaccine hesitancy / E. Dubé, D. M. Gagnon, M. Vivion // Can Commun Dis Rep. – 2020. – Vol. 46(2-3). – P. 48-52.
98. El Youssfi, M. Trace elements in Foodstuffs from the Mediterranean Basin-Occurrence, Risk Assessment, Regulations, and Prevention strategies: A review / M. El Youssfi, A. Sifou, R. Ben Aakame, N. Mahnine, S. Arsalane, M. Halim, A. Laghzizil, A. Zinedine // Biol Trace Elem Res. – 2023. – Vol. 201(5). – P. 2597-2626.
99. Enkel, S.L. 'Hesitant compliers': Qualitative analysis of concerned fully-vaccinating parents / S.L. Enkel, K. Attwell, T.L. Snelling, H.E. Christian. // Vaccine. - 2018. – Vol. 36(44). P. 6459-6463.
100. Esch, R.E. Evaluation of allergen vaccine potency / R.E. Esch // Curr Allergy Asthma Rep. - 2006. – Vol. 6. – P. 402–406
101. Esmaeili, M. Sensitive and selective determination of trace amounts of mercury ions using a dimercaprol functionalized graphene quantum dot modified glassy carbon electrode / M. Esmaeili, F. Ahour, S. Keshipour // Nanoscale. – 2021. – Vol. 13(26). – P. 11403-11413.
102. European Medicines Agency (2009) Points to consider on the reduction, elimination or substitution of thiomersal in vaccines; [Электронный ресурс], http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003929.pdf (дата обращения 02.08.2022)

103. European Pharmacopoeia 01/2008:20228 «Gas chromatography».
104. European Pharmacopoeia 01/2009:20246 «Chromatographic separation techniques».
105. European Pharmacopoeia, 01/2008:1625 «Thiomesal».
106. European Pharmacopoeia, 01/2008:20515 «Phenol in immunosera and vaccines».
107. European Pharmacopoeia, 07/2014:20427 «Heavy metals in herbal drugs and herbal drug preparations».
108. Facciola, A. An Overview of Vaccine Adjuvants: Current Evidence and Future Perspectives / A. Facciola, G. Visalli, A. Laganà, A. Di Pietro // *Vaccines* (Basel). – 2022. – Vol. 10(5). - P. 819.
109. Filice, M. Contamination by Trace Elements and Oxidative Stress in the Skeletal Muscle of *Scyliorhinus canicula* from the Central Tyrrhenian Sea / M. Filice, F.R. Reinero, M.C. Cerra, C. Faggio, F.L. Leonetti, P. Micarelli, G. Giglio, E. Sperone, D. Barca, S. Imbrogno // *Antioxidants* (Basel). – 2023. –Vol. 12(2). – P. 524.
110. Fiyouzi, T. Vaccine Design: An Introduction. / T. Fiyouzi, P.A. Reche // *Methods Mol Biol.* – 2023. – Vol. 2673. – P. 1-14.
111. Food and Drug Administration (2018): Vaccine Safety & Availability - Thimerosal and Vaccines. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/safety-availability-biologics/thimerosal-and-vaccines> (дата обращения 03.06.2023)
112. Francisco, M. L. dL. Development of a reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) procedure for the simultaneous determination of phenolic compounds in peanut skin extracts / M. L. dL. Francisco, A.V.A. Resurreccion // *Food Chemistry.* - 2009. – Vol. 117 (2). - P. 356-363.
113. Frederiksen, H. Changes in urinary excretion of phthalates, phthalate substitutes, bisphenols and other polychlorinated and phenolic substances in young Danish men; 2009-2017 / H. Frederiksen, O. Nielsen, H.M. Koch, N.E.

Skakkebaek, A. Juul, N. Jørgensen, A.M. Andersson // *Int J Hyg Environ Health*. – 2020. – Vol. 223(1). – P. 93-105.

114. Frigerio, G. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method to quantify metabolites of phthalates, including di-2-ethylhexyl terephthalate (DEHTP) and bisphenol A, in human urine / G. Frigerio, L. Campo, R. Mercadante, P.M. Santos, P. Missineo, E. Polledri, S. Fustinoni // *Rapid Commun Mass Spectrom*. – 2020. – Vol. 34(13). - e8796.

115. Gabis, L.V. The myth of vaccination and autism spectrum. / L.V. Gabis, O.L. Attia, M. Goldman, N. Barak, P. Tefera, S. Shefer, M. Shaham, T. Lerman-Sagie // *Eur J Paediatr Neurol*. – 2022. - Vol. 36. – P. 151-158.

116. Geoghegan, S. Vaccine safety: myths and misinformation. S. Geoghegan, K.P. O’Callaghan, P.A. Offit // *Front Microbiol*. - 2020. – Vol. 11. - P.372.

117. Ghanei-Motlagh, M. A novel voltammetric sensor for sensitive detection of mercury(II) ions using glassy carbon electrode modified with graphene-based ion imprinted polymer / M. Ghanei-Motlagh, M.A. Taher, A. Heydari, R. Ghanei-Motlagh, V.K. Gupta. // *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016 Vol. 63. - P. 367-75.

118. Glenting, J. Production of Recombinant Peanut Allergen Ara h 2 using *Lactococcus lactis* / J. Glenting, L.K. Poulsen, K. Kato // *Microb Cell Fact*. - 2007. – Vol. 6. – P. 28.

119. Golding, J. Prenatal mercury exposure and features of autism: a prospective population study / J. Golding, D. Rai, S. Gregory, G. Ellis, A. Emond, Iles- Y. Caven, J. Hibbeln, C. Taylor // *Mol Autism*. – 2018. - Vol. 23(9). P. 30.

120. Golestanzadeh, M. Association of phthalate exposure with precocious and delayed pubertal timing in girls and boys: a systematic review and meta-analysis / M. Golestanzadeh, R. Riahi, R. Kelishadi // *Environ Sci Process Impacts*. – 2020. – Vol. 22(4). - P. 873-894.

121. Gołoś, A. Thiomersal-containing vaccines - a review of the current state of knowledge / A. Gołoś, A. Lutyńska // *Przeegl Epidemiol.* – 2015. - 69(1). – P. 59-64.
122. González, O. Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect / O. González, M. E. Blanco, G. Iriarte, L. Bartolomé, M. I. Maguregui, R. M. Alonso // *Journal of Chromatography A.* – 2014. - Vol.1353. – P. 10 - 27.
123. Greaves, W.L. Streptococcal abscesses following diphtheria-tetanus toxoid-pertussis vaccination. / W.L. Greaves, A.R. Hinman, R.R. Facklam, K.C. Allman, C.L. Barrett, H.C. Stetler // *Pediatr Infect Dis.* – 1982. – Vol. 1(6). – P. 388-90.
124. Green, J. Separation and identification of phenols by paper chromatography / J. Green, S. Marcinkiewicz // *Nature.* – 1955. – Vol. 176(4494). - P. 1172 - 1173.
125. Greydanus, D.E. Should rare immunologic, neurologic, and other adverse events be indications to withhold vaccination? / D.E. Greydanus, A. Leonov, A. Elisa, R. Azmeh // *Transl Pediatr.* – 2019. – Vol. 8(5). – P. 419 - 427.
126. Griffiths, L.A. Phenolic acids and flavonoids of *Theobroma cacao* L.; separation and identification by paper chromatography / L.A. Griffiths, // *Biochem J.* – 1958. – Vol. 70(1). - P. 120 - 125.
127. Hameed, S.A. Towards the future exploration of mucosal mRNA vaccines against emerging viral diseases; lessons from existing next-generation mucosal vaccine strategies / S.A. Hameed, S. Paul, G.K.Y. Dellosa, D. Jaraquemada, M.B. Bello // *NPJ Vaccines.* – 2022. - Vol 7(1). – P.71 - 91.
128. Haroune, V. Factors contributing to parental 'vaccine hesitancy' for childhood immunisations. / V. Haroune, L. King // *Nurs Child Young People.* - 2020. – Vol. 32(4). – P. 20 - 25.
129. Hilleman, M.R. The Development of Live Attenuated Mumps Virus Vaccine in Historic Perspective and Its Role in the Evolution of Combined

Measles–Mumps–Rubella. In: Plotkin S. (eds) *History of Vaccine Development*. /M.R. Hilleman. - New York: Springer, 2011 – P. 207 - 218.

130. Hinman, A.R. Vaccine-Preventable Diseases, Immunizations, and MMWR --- 1961—2011 /A.R. Hinman, W.A. Orenstein, A. Schuchat // - MMWR Supplement – 2011. - Vol. 60 (04). – P. 49-5.

131. Hirth, J.M. Variations in reason for intention not to vaccinate across time, region, and by race/ethnicity, NIS-Teen (2008-2016) / J.M. Hirth, E.L. Fuchs, M. Chang, M.E. Fernandez, A.B. Berenson // *Vaccine*. – 2019. – Vol. 37(4). P. 595-601.

132. Holzhauser, T. Rekombinante Allergene, Peptide und Virus-like Particles in der Immuntherapie von Allergien [Recombinant allergens, peptides, and virus-like particles for allergy immunotherapy] / T. Holzhauser, F. Schuler, S. Dudek, S. Kaul, S. Vieths, V. Mahler // *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. – 2020. – Vol 63(11). – P. 1412-1423.

133. Hossain, MM Appraisal and validation of a method used for detecting heavy metals in poultry feed in Bangladesh / M.M. Hossain, A.S.M.A. Hannan, M.M. Kamal, M.A. Hossain, S.B. Quraishi // *Vet World*. – 2022. – Vol. 15(9). – P. 2217-2223.

134. Hozbor, D. New pertussis vaccines: a need and a challenge. In: Fedele G, Ausiello C, eds. *Pertussis Infection and Vaccines. Advances in Experimental Medicine and Biology* / D. Hozbor // Springer, Cham. - 2019. – Vol. 1183. - P. 115–126.

135. Huff, A.L. Messenger RNA vaccines for cancer immunotherapy: progress promotes promise / A.L. Huff, E.M. Jaffee, N. Zaidi // *J Clin Invest*. – 2022. - Vol. 132(6). - e156211.

136. Institute of Medicine (US) Immunization Safety Review Committee (2004): *Immunization Safety Review: Vaccines and Autism* // National Academies Press (US). - Washington, DC, 2004.

137. International Conference on Harmonisation (1995): Q2 (R1) Step 45 Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (Geneva,

Switzerland) [Электронный ресурс]. – Режим доступа : https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-q2r1-validation-analytical-procedures-text-and-methodology-step-5-first-version_en.pdf(дата обращения 30.05.2023).

138. International Conference on Harmonization (2022): Analytical procedure development Q14 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q14_Document_Step2_Guideline_2022_0324.pdf (дата обращения 07.04.2024).

139. International Conference on Harmonization (2022): ICH harmonized guideline validation of analytical procedures Q2 (R2) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline> (дата обращения 07.04.2024).

140. Jacobson, M.H. Serially assessed bisphenol A and phthalate exposure and association with kidney function in children with chronic kidney disease in the US and Canada: A longitudinal cohort study / M.H. Jacobson, Y. Wu, M. Liu, T.M. Attina, M. Naidu, R. Karthikraj, K. Kannan, B.A. Warady, S. Furth, S. Vento, H. Trachtman, L. Trasande // *PLoS Med.* – 2020. – Vol. 17(10). – P.1003384.

141. Jain, A. Autism occurrence by MMR vaccine status among US children with older siblings with and without autism / A. Jain, J. Marshall, A. Buikema, T. Bancroft, J.P. Kelly, C.J. Newschaffer // *JAMA.* – 2015 – Vol. 313 (15). – P. 1534–1540.

142. Japanese Pharmacopeia, «Mercury».

143. Kalok, A. Vaccine hesitancy towards childhood immunisation amongst urban pregnant mothers in Malaysia / A. Kalok, S.Y.E. Loh, K.T. Chew, N.H. Abdul Aziz, S.A. Shah, S. Ahmad, N.A. Mohamed Ismail, Z. Abdullah Mahdy // *Vaccine.* – 2020. – Vol. 38(9). – P. 2183-2189.

144. Kaufman, J. Face-to-face interventions for informing or educating parents about early childhood vaccination / J. Kaufman, R. Ryan, L. Walsh, D.

Horey, J. Leask, P. Robinson, S. Hill // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2018. – Vol. 5(5). – P. 010038.

145. Kennedy, J. Vaccine Hesitancy: A Growing Concern. / J. Kennedy // *Paediatr Drugs* – 2020. – Vol. 22(2). – P. 105-111.

146. Kerstetter, L.J. Adenoviral Vectors as Vaccines for Emerging Avian Influenza Viruses. / L.J. Kerstetter, S. Buckley, C.M. Bliss, L. Coughlan // *Front Immunol.* – 2021. – Vol. 11. – P. 607333.

147. Kheirvari, M. Virus-like Particle Vaccines and Platforms for Vaccine Development / M. Kheirvari, H. Liu, E. Tumban // *Viruses.* – 2023. – Vol. 15(5). P. 1109.

148. Kim, D. Advances in vaccine delivery systems against viral infectious diseases. / D. Kim, Y. Wu, Y.B. Kim, Y.K. Oh // *Drug Deliv Transl Res.* – 2021. - Vol. 11(4). – P. 1401-1419.

149. Kirshner, N. Separation of adrenaline, noradrenaline, and hydroxytyramine by ion exchange chromatography / N. Kirshner, M. Goodall // *J Biol Chem.* - 1957. – Vol. 226(1). – P. 207-212.

150. Kun, E. [Vaccine hesitancy among primary healthcare professionals in Hungary] / E. Kun, A. Benedek, Z. Mészner // *Orv Hetil.*– 2019. – Vol. 160 (48). P. 1904-1914.

151. Laval, J.M. Nanobiotechnology and its role in the development of new analytical devices / J.M. Laval, P.E. Mazeran, D.Thomas // *Analyst.* – 2000. – Vol. 125(1) – P. 29 - 33.

152. Lea, A.P. Virosomal Hepatitis A Vaccine (Strain RG-SB) / A.P. Lea, J.A. Balfour // *BioDrugs.* – 1997. Vol. 7. – P. 232–248.

153. Lederhofer, J. Development of a Virosomal RSV Vaccine Containing 3D-PHAD® Adjuvant: Formulation, Composition, and Long-Term Stability / J.Lederhofer, J. van Lent, F. Bhoelan // *Pharm Res.* - 2018. – Vol. 35. – P. 172.

154. Lee, I. Associations of urinary concentrations of phthalate metabolites, bisphenol A, and parabens with obesity and diabetes mellitus in a Korean adult population: Korean National Environmental Health Survey (KoNEHS) 2015-2017

/ I. Lee, Y.J. Park, M.J. Kim, S. Kim, S. Choi, J. Park, Y.H. Cho, S. Hong, J. Yoo, H. Park, G.J. Cheon, K. Choi, M.K. Moon // *Environ Int.* – 2021. – Vol. 146 – P. 106227.

155. Leone, U. Analisi dei fenolsteroidi ematici nel ciclo mestruale ed in gravidanza con tecnica cromatografica su colonna [Analysis of hematic phenol steroids in the menstrual cycle & pregnancy by column chromatography] / U. Leone // *Quad Clin Ostet Ginecol.* – 1958. – Vol. 13 (10). – P. 491-515.

156. Li, X. Synthesis of carboxyl functionalized microporous organic network for solid phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of phenols in water samples / X. Li, Y. Cui, Ch. Yang, X. Yan, // *Talanta.* – 2020. – Vol. 208. – P.120434.

157. Li, Y. Nano-based approaches in the development of antiviral agents and vaccines / Y. Li, Y. Xiao, Y. Chen, K. Huang // *Life Sci.* – 2021. – Vol. 265. – P. 118761.

158. Lin, A. Live attenuated pertussis vaccine BPZE1 induces a broad antibody response in humans / A. Lin, M. Thalen, K. Loré // *J Clin Invest.* – 2020. – Vol. 130(5). - P.2332-2346.

159. Liu, W. Rapid synergistic cloud point extraction for simultaneous determination of five polar phenols in environmental water samples via high performance liquid chromatography with fluorescence detection / W. Liu, M. Xie, X. Hao, Q. Xu, X. Jiang, T. Liu, M. Wang, // *Microchemical Journal.* – 2021. - Vol. 164. – P. 105963.

160. Löffler, P. Review: Vaccine Myth-Buster - Cleaning Up With Prejudices and Dangerous Misinformation / P. Löffler // *Front Immunol.* – 2021. – Vol.12. –P. 663280.

161. Lowy, D. R. HPV vaccination to prevent cervical cancer and other HPV-associated disease: from basic science to effective interventions. / D. R. Lowy // *J Clin Invest.* – 2016. – Vol. 126(1) – P. 5-11.

162. MacDonald, N.E. Promoting immunization resiliency in the digital information age / N.E. MacDonald, E. Dubé // *Can Commun Dis Rep.* – 2020. – Vol. 46(1). – P. 20-24.
163. MacDonald, N.E. Vaccine safety concerns: Should we be changing the way we support immunization? / N.E. MacDonald, E. Dube // *EClinicalMedicine.* – 2020. – Vol. 23. – P. 100402.
164. Martínez, S.E. Association between dietary contribution of ultra-processed foods and urinary concentrations of phthalates and bisphenol in a nationally representative sample of the US population aged 6 years and older / S. E. Martínez, N. Khandpur, M.L. da Costa Louzada, C.A. Monteiro // *PLoS One.* - 2020. – Vol. 15(7). – P. 0236738.
165. Massano, M. Development and validation of a UHPLC-HRMS-QTOF method for the detection of 132 New Psychoactive Substances and synthetic opioids, including fentanyl, in Dried Blood Spots/ M. Massano, C. Incardona, E. Gerace, P. Negri, E. Alladio, A. Salomone, M. Vincenti // *Talanta.* - 2022. - Vol. 241. – P. 123265.
166. McClure, C.C. Vaccine Hesitancy: Where We Are and Where We Are Going / C.C. McClure, J.R. O'Leary, S.T. Cataldi, // *Clin Ther.* - 2017. - Vol. 39(8). P. 1550-1562.
167. Melief, C. J. Therapeutic cancer vaccines / C. J.Melief, , T.van Hall, R.Arens, F.Ossendorp, S. H. van der Burg // *J. Clin. Invest.* — 2015. — Vol. 125(9). — P. 3401—3412.
168. Meyer, C.U. Principles in Immunology for the Design and Development of Vaccines. / C.U. Meyer, F. Zepp // *Methods Mol Biol.* – 2022. - Vol. 2410. - P. 27-56.
169. Milde, D. Measurement uncertainty evaluation from correlated validation data: Determination of elemental impurities in pharmaceutical products by ICP-MS / D. Milde, T. Pluháček, M. Kuba, J. Součková, R. J.N. Bettencourt da Silva. // *Talanta.* – 2020. - Vol. 220. – P.121386.

170. Moyer, T. J. Beyond antigens and adjuvants: formulating future vaccines / T. J. Moyer, A. C. Zmolek, D. J. Irvine // *J Clin Invest.* – 2016. – Vol. 126(3). - P.799-808.
171. Muhuri, M. Overcoming innate immune barriers that impede AAV gene therapy vectors / M. Muhuri, Y. Maeda, H. Ma, S. Ram, K. A. Fitzgerald, P. W. Tai, G. Gao // *J Clin Invest.* – 2021. – Vol. 131(1). - P. 143780.
172. Nalewajko-Sieliwoniuk, E. Dispersive liquid–liquid microextraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of phenolic compounds in human milk / E. Nalewajko-Sieliwoniuk, M. Hryniewicka, D. Jankowska, A. Kojło, M. Kamianowska, M. Szczepański // *Food Chemistry.* – 2020. – Vol. 327. – P. 126996.
173. Nelson, L. M. Rare serotype adenoviral vectors for HIV vaccine development 2011 / L.M. Nelson. // *J Clin Invest.* - 2012. – Vol. 122(1). - P.25-27.
174. Niculescu, A.G. New Applications of Lipid and Polymer-Based Nanoparticles for Nucleic Acids Delivery. / A.G. Niculescu, A.C. Bîrcă, A.M. Grumezescu. // *Pharmaceutics.* – 2021. – Vol. 13(12). – P. 2053.
175. Nie, J. Self-assembled multiepitope nanovaccine based on NoV P particles induces effective and lasting protection against H3N2 influenza virus / J. Nie, Q. Wang, S. Jin // *Nano Res.* – 2023. – Vol. 16 (5). – P. 7337–7346.
176. Oberemok, V.V. Anti-coronavirus vaccines will not accelerate the transition of humanity to a non-pandemic period, but the pandemic will take fewer victims / V.V. Oberemok, O.A. Andreeva, K.V. Laikova, I.A. Novikov, Y.V. Puzanova, A.V. Kubyshkin // *Inflamm Res.* – 2022. – Vol. 71(5-6). – P. 521-536.
177. Ocaña-Rios, I. Recent advances in analysis of bisphenols and their derivatives in biological matrices / I. Ocaña-Rios, J. de Jesús Olmos-Espejel, K.K. Donkor // *Anal Bioanal Chem.* – 2022. – Vol. 414(2). – P. 807-846.
178. Oliva, E. Targeted and semi-untargeted determination of phenolic compounds in plant matrices by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry / E. Oliva, E. Viteritti, F. Fanti, F. Eugelio, A. Pepe, S. Palmieri, M. Sergi, D. Compagnone // *Journal of Chromatography A.* – 2021. –

Vol. 1651. – P. 462315.

179. Olusanya, O. A. Addressing Parental Vaccine Hesitancy and Other Barriers to Childhood/Adolescent Vaccination Uptake During the Coronavirus (COVID-19) Pandemic / O. A. Olusanya, R. A. Bednarczyk, R. L. Davis, A. S-Nejad // Front. Immunol. – 2021. Vol.12. – P. 663074.

180. Pedrozo-Penafiel, M.J. Indirect voltammetric determination of thiomersal in influenza vaccine using photo-degradation and graphene quantum dots modified glassy carbon electrode / M.J. Pedrozo-Penafiel, J.R. Miranda-Andrades, L.M. Gutierrez-Beleño, D.G. Larrudé, R.Q. Aucelio // Talanta. – 2020. – Vol. 215. – P. 120938.

181. Perkin Elmer Corporation Application Note: Determination of Mercury at Ultratrace Levels Using FIMS and Amalgamation Technique - Perkin Elmer Inc., 2011 – 107 c.

182. Phadke, V.K. Association between vaccine refusal and vaccine-preventable diseases in the United States: a review of measles and pertussis / V.K. Phadke, R.A. Bednarczyk, D.A. Salmon, S.B. Omer. // Jama. – 2016. – Vol. 315(11). - P. 1149 – 58.

183. Picchio, CA. Knowledge, attitudes and beliefs about vaccination in primary healthcare workers involved in the administration of systematic childhood vaccines, Barcelona, 2016/17 /C.A. Picchio, M.G. Carrasco, M. Sagué-Vilavella, C. Rius// Euro Surveill. – 2019. – Vol. 24(6). - e1800117.

184. Pichichero, M.E. Mercury Concentrations and Metabolism in Infants Receiving Vaccines Containing Thiomersal: Descriptive Study / M.E. Pichichero, E. Cernichari, J. Lopreiato, J. Treanor // The Lancet. - 2002. – Vol. 360 – P. 1737-41.

185. Platts-Mills, T.A. Problems in allergen standardization / T.A. Platts-Mills, F. Rawle, M.D. Chapman // Clin Rev Allergy. – 1985. – Vol. 3(3). – P. 271-290.

186. Plotkin, S. A. Composition of pertussis vaccine given to infants determines long-term T cell polarization / Stanley A. Plotkin // *J Clin Invest.* - 2018. Vol. 128(9). – P. 3742-3744.
187. Raicopol, M.D. Improving the Voltammetric Determination of Hg(II): A Comparison Between Ligand-Modified Glassy Carbon and Electrochemically Reduced Graphene Oxide Electrodes / M.D. Raicopol, A.M. Pandele, C. Dascălu, E. Vasile, A. Hanganu, G.G. Vasile, I.G. Bugean, C. Pirvu, G. Stanciu, G.O. Buica // *Sensors (Basel).* – 2020. – Vol. 20(23). – P. 6799.
188. Ren, J. The demographics of vaccine hesitancy in Shanghai, China / J. Ren, A.L. Wagner, A. Zheng, X. Sun, M.L. Boulton, Z. Huang, B.J. Zikmund-Fisher // *PLoS One.* – 2018. – Vol. 13(12). - e0209117.
189. Rinaudo, C. D. Vaccinology in the genome era / C. D. Rinaudo, D. L. Telford, R. Rappuoli, K. L. Seib // *J Clin Invest.* – 2009. – Vol. 119(9). – P. 2515-2525.
190. Roberts, E.A. A study of the polyphenols in tea leaf by paper chromatography / E.A. Roberts, D.J. // *Wood Biochem J.* – 1951. Vol. 49(4). – P. 414-22.
191. Rocha, B. A. An eco-friendly sample preparation procedure base on low-density solvent-based air-assisted liquid-liquid microextraction for the simultaneous determination of 21 potential endocrine disruptors in urine samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry / B. A. Rocha, S. R. de Oliveira, R. M. da Silva, G. R. M. Barcelos, A. R. M. de Oliveira, F. Barbosa // *Microchemical Journal.* – 2019. – Vol. 147. P. 207-214.
192. Rodriguez-Nava, G. MMR Vaccine Adverse Drug Reactions Reports in the CDC WONDER System, 1989-2019/ G. Rodriguez-Nava, D.P. Trelles-Garcia, M.A. Yanez-Bello, T. Imani-Ramos, V.P. Trelles-Garcia, D.S. Bustamante-Soliz, E. Patiño-Salamea // *Open Forum Infect Dis.* – 2020. – Vol. 7(8). - P.211.

193. Roush, S.W. Historical comparisons of morbidity and mortality for vaccine-preventable diseases in the United States / S.W.Roush, T.V. Murphy// - JAMA. - 2007. – Vol. 298 (18). – P. 2155–63.
194. Şahin, S. Determination of phenolic compounds in *Prunella L.* by liquid chromatography-diode array detection / S. Şahin, C. Demir, H. Malyer // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. - 2011. - Vol. 55 (5). – P. 1227-1230.
195. Santoli, J.M. Effects of the COVID-19 pandemic on routine pediatric vaccine ordering and administration—United States, 2020 / J.M. Santoli. // MMWR. Morbid Mortal Wkly Rep. – 2020. – Vol. 69. P.591–593.
196. Saxena, S. Routine vaccination during covid-19 pandemic response / S. Saxena, H. Skirrow, H. Bedford. // BMJ. – 2020. - Vol. 369. – P. 2392.
197. Sazegari, S. Chimeric Hepatitis B core virus-like particles harboring SARS-CoV2 epitope elicit a humoral immune response in mice / S. Sazegari, M. Akbarzadeh Niaki, A. Afsharifar, A. Niazi, A. Derakhshandeh, M. Moradi Vahdat, F. Hemmati, M.H. Eskandari // Microb Cell Fact. – 2023. - Vol. 22(1). – P. 39.
198. Schultz, S.T. Does thimerosal or other mercury exposure increase the risk for autism? A review of current literature / S.T. Schultz //Acta Neurobiol Exp (Wars). – 2010. – Vol. 70(2). – P.187-195.
199. Schwarzinger, M. COVID-19 vaccine hesitancy in a representative working-age population in France: a survey experiment based on vaccine characteristics / M. Schwarzinger, V. Watson, P. Arwidson, F. Alla, S. Luchini // Lancet Public Health. – 2021. – Vol. 6(4). – P. 210 - 221.
200. Sen, S. Exosomes as natural nanocarrier-based drug delivery system: recent insights and future perspectives / S. Sen, J. Xavier, N. Kumar, M.Z/ Ahmad, O.P. Ranjan // 3 Biotech. 2023 Mar;13 (3):101.
201. Shalash, M. Vortex-assisted liquid-liquid–liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography for the simultaneous determination of fourteen phenolic acids in honey, iced tea and canned coffee drinks / M. Shalash, A. Makahleh, S. M. Salhimi, B. Saad // Talanta. – 2017. -

Vol. 174. – P. 428-435.

202. Shirkhanloo, H. Simultaneously speciation of mercury in water, human blood and food samples based on pyrrolic and pyridinic nitrogen doped porous graphene nanostructure / H. Shirkhanloo, M. Habibnia, A. Rashidi, A. Faghihi Zarandi, M. Dehghani Mobarake // *Food Chem.* – 2023. – Vol. 403. - P. 134394.

203. Silva, A.J.D. RNA Vaccines: Yeast as a Novel Antigen Vehicle / A.J.D. Silva, M.M.G. de Sousa, L.S. de Macêdo, P.L. de França Neto, I.A. de Moura, B.C.F. Espinoza, M.D.C.V. Invenção, S.S. de Pinho, M.A.T.M. da Gama, A.C. de Freitas // *Vaccines (Basel)*. – 2023. – Vol. 11(8). – P. 1334.

204. Simon, S. The community acceptance of COVID-19 vaccines in Rakhine State: A cross-sectional study in Myanmar / S. Simon, K.M. Min, T.Z. Latt, P.P. Moe, K.M. Tun // *PLOS Glob Public Health*. – 2023. – Vol. 3(8). – P. 2162.

205. Sondagar, C. Vaccine acceptance: How to build and maintain trust in immunization / C. Sondagar, R. Xu, N.E. MacDonald, E. Dubé // *Can Commun Dis Rep.* – 2020. - Vol. 46(5). – P. 155 - 159.

206. Stetler, H.C. Outbreaks of group A streptococcal abscesses following diphtheria-tetanus toxoid-pertussis vaccination. / H.C. Stetler, P.L. Garbe, D.M. Dwyer, R.R. Facklam, W.A. Orenstein, G.R. West, K.J. Dudley, A.B. Bloch // *Pediatrics*. – 1985. – Vol. 75(2). – P. 299 - 303.

207. Sugarman, S.D. Cases in vaccine courtlegal battles over vaccines and autism / S.D. Sugarman // *The New England Journal of Medicine*. - 2007. – Vol. 357(13). – P. 1275 – 1277.

208. Tang, S. In-syringe dispersive solid-phase extraction using dissolvable layered double oxide hollow spheres as sorbent followed by high-performance liquid chromatography for determination of 11 phenols in river water / S. Tang, X. H. Lin, S. F. Y. Li, H. K. Lee // *Journal of Chromatography A*. – 2014. – Vol. 1373. – P. 31 - 39.

209. Tanker, M. [Determination of the total phenols in thyme oils by a colorimetric method based on thin layer chromatography] / M. Tanker // *Tip Fak Mecm.* – 1963. – Vol. 26. – P. 26 - 31.

210. Tartaglia, A. Determination of phenolic compounds in human saliva after oral administration of red wine by high performance liquid chromatography / A. Tartaglia, T. Romasco, C. D'Ovidio, E. Rosato, H.I. Ulusoy, K.G. Furton, A. Kabir, M. Locatelli // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* – 2022. - Vol. 209. – P. 114486.

211. Tashakkori, P. Fabrication of montmorillonite/ionic liquid composite coated solid-phase microextraction fibers for determination of phenolic compounds in fruit juices by gas chromatography and liquid chromatography / P. Tashakkori, A. A. Tağaç, M. Merdivan // *Journal of Chromatography A.* – 2021. – Vol. 1635. – P. 461741.

212. Thomas, S. *Methods and Protocols, Volume 3. Resources for Vaccine Development. Vaccine Design* / S. Thomas. - New York. - 2022.

213. Tsai, M.H. Allergic Reactions to Vaccines in Children: From Constituents to Specific Vaccines / M.H. Tsai, C.Y. Chiu // *Biomedicines.* – 2023. – Vol. 11(2). – P. 620.

214. Ullah, I. Myths and conspiracy theories on vaccines and COVID-19: Potential effect on global vaccine refusals / I. Ullah, K.S. Khan, M.J. Tahir, A. Ahmed, H. Harapan // *Vacunas.* – 2021. – Vol. 22(2). – P. 93-97.

215. United States Pharmacopeia, <261> «Mercury».

216. United States Pharmacopeia, «Timerosal».

217. United States Pharmacopeia, *The Analytical Procedure Lifecycle.*

218. Valenta, R. Recombinant allergens for immunotherapy / R. Valenta, V. Niederberger // *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* – 2007. - Vol. 119 (4). - P. 826 - 830.

219. Valente, I. M. New application of the QuEChERS methodology for the determination of volatile phenols in beverages by liquid chromatography / I. M.

Valente, C M. Santos, M. M. Moreira, J. A. Rodrigues // Journal of Chromatography A. – 2013. – Vol. 1271 (1). – P. 27-32.

220. Van Riel, D. Next-generation vaccine platforms for COVID-19. / D. van Riel, E. de Wit // Nat Mater. – 2020. - Vol. 19(8). – P. 810 - 812.

221. Verger, P. Understanding the determinants of acceptance of COVID-19 vaccines: a challenge in a fast-moving situation. / P. Verger, P. Peretti-Watel // Lancet Public Health. – 2021. – Vol. 6(4). - P. 195 - 196.

222. Wehmiller J.F. (2015) Chromatography. In: Encyclopedia of Scientific Dating Methods. Encyclopedia of Earth Sciences Series / J.F. Wehmiller // Springer, Dordrecht. – 2015. – P. 170 – 171.

223. Wei, Z. Application of natural deep eutectic solvents for extraction and determination of phenolics in *Cajanus cajan* leaves by ultra performance liquid chromatography, / Z. Wei, X. Qi, T. Li, M. Luo, W. Wang, Y. Zu, Y. Fu // Separation and Purification Technology. - 2015. - Vol. 149. - P. 237-244.

224. Wiedermann, U. Primary vaccine failure to routine vaccines: Why and what to do? / U.Wiedermann, E. Garner-Spitzer, A. Wagner // Human Vaccines & Immunotherapeutics. – 2016. – Vol. 12 (1). – P. 239–243.

225. Wolfe, R.M. Anti-vaccinationists past and present / R.M. Wolfe, L.K. Sharp // BMJ. – 2002. – Vol. 325 (7361). – P. 430–432.

226. World Health Organization (2012): Global Advisory Committee on Vaccine Safety, report of meeting held [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.who.int/publications/i/item/WER8730> (дата обращения 02.04.2024).

227. World Health Organization, Global Advisory Committee on Vaccine Safety (2006): Statement on Thiomersal [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.who.int/vaccine_safety/committee/topics/thiomersal/statement_jul2006/en/ (дата обращения: 20.02.2022).

228. World Health Organization. (2002): Adopting global vaccine management policies for national use. (Geneva, Switzerland) [Электронный

ресурс]. – Режим доступа: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/67809> (дата обращения 30.03.2023)/

229. World Health Organization. (2004): Expert Committee on biological standardization. Recommendations for the preparation and establishment of international and other biological reference standards. Technical Reports Series № 932. (Geneva, Switzerland) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/documents/trs932annex-2-inter-biol-standards-rev2004.pdf?sfvrsn=1eaca2f8_2 (дата обращения 07.04.2023).

230. World Health Organization. (2011): WHO manual for the establishment of national and other secondary standards for vaccines. (Geneva, Switzerland) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-IVB-11.03> (дата обращения 01.02.2023).

231. Wu, J. Dynamic Trends and Underlying Factors of COVID-19 Vaccine Booster Hesitancy in Adults: Cross-Sectional Observational Study / J. Wu, M. Ma, Q. Li, X. Guo, C.S. Tarimo, S. Jia, X. Zhou, M. Wang, J. Gu, Y. Miao, B. Ye. // JMIR Public Health Surveill. – 2023. – Vol 9. – P. 44822.

232. Yoon, D. Updates on Vaccine Safety and Post-Licensure Surveillance for Adverse Events Following Immunization in South Korea Shin 2005-2017/ D. Yoon, J.H. Kim, H. Lee, J.Y. Shin // Yonsei Med J. – 2020. – Vol. 61(7). – P. 623-630.

233. Yorke, E. A survey of public perception, knowledge and factors influencing COVID-19 vaccine acceptability in five communities in Ghana / E. Yorke, M.B. Amissah-Arthur, V. Boima, I.D. Dey, V. Ganu, D. Fiagbe, J. Tetteh, A. Gyaban-Mensah, G. Ekem-Furgurson, A.E. Yawson, C.C. Mate-Kole // Ghana Med J. – 2023. – Vol. 57(1). - P. 3 - 12.

234. Zhan, L. Higher Immunological Protection of Pandemic 2009 H1N1 Influenza Live Virus Infection than Split Vaccine Against the Homologous Virus

for Long Term Immunization in Ferret / L. Zhan, W.Deng, , L. Bao // Indian J. Virol. - 2012. – Vol. 23. – P. 270–277.

235. Zhao, Y. Flagellin/Virus-like Particle Hybrid Platform with High Immunogenicity, Safety, and Versatility for Vaccine Development / Y. Zhao, Z. Li, J. Voyer, Y. Li, X. Chen // ACS Appl Mater Interfaces. – 2022. – Vol. 14(19). - P. 21872 - 21885.

236. Zhu, Z. Sugaring-out assisted liquid-liquid extraction coupled with high performance liquid chromatography-electrochemical detection for the determination of 17 phenolic compounds in honey / Z. Zhu, Y. Zhang, J. Wang, X. Li, W. Wang, Z. Huang // Journal of Chromatography A. – 2019. – Vol. 1601. – P. 104 - 114.

БАГОДАРНОСТИ

Выражаю признательность всему коллективу лаборатории биохимии медицинских иммунобиологических препаратов ФГБУ "НЦЭСМП" Минздрава России за помощь, оказанную при выполнении данной работы. Выражаю благодарность профессору, д.м.н. Владимиру Петровичу Бондареву за поддержку на всех этапах выполнения работы. Особую признательность выражаю уважаемым рецензентам - заместителю начальника управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов, д.м.н., профессору Вячеславу Борисовичу Иванову и начальнику лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний, д.б.н. Раузе Асхатовне Волковой, а также начальнику испытательного центра экспертизы качества, Арташесу Аваковичу Мовсесянцу за оказанное содействие при проведении данного исследования.