

## Разработка и аттестация стандартных образцов содержания фенола в иммунобиологических лекарственных препаратах с учетом сопоставимости результатов, полученных методами ГЖХ, ВЭЖХ, спектрофотометрии и колориметрии

О. Н. Колесникова\*, О. В. Фадейкина, О. Б. Устинникова, Р. А. Волкова, А. А. Мовсесянц

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

Фенол — консервант, входящий в состав ряда иммунобиологических лекарственных препаратов, при этом методы, используемые для его количественной оценки, имеют принципиальные отличия. Актуальные требования к аккредитованным лабораториям предполагают постоянный внутрилабораторный контроль качества, эффективным метрологическим инструментом обеспечения которого служат стандартные образцы с аттестованным содержанием аналита. **Цель работы:** разработка и аттестация стандартных образцов содержания фенола в иммунобиологических лекарственных препаратах с учетом сопоставимости результатов, полученных методами ГЖХ, ВЭЖХ, колориметрическим и спектрофотометрическим. **Материалы и методы:** разводящая жидкость для аллергенов (кандидат в стандартный образец); раствор фенола 2,5 и 5 мг/мл; раствор 2-феноксиэтанола 2,5 мг/мл. Исследования проводили с применением спектрофотометрической и колориметрической методик, а также методик, основанных на методах ГЖХ и ВЭЖХ. Результаты оценивали с применением статистических методов расчета среднего арифметического, стандартного отклонения, коэффициента вариации, дисперсионного анализа с применением критериев Стьюдента и Фишера. **Результаты:** результаты определения фенола спектрофотометрическим и колориметрическим методами, а также методом ВЭЖХ статистически достоверно сопоставимы. Значение критерия Фишера ( $F$ -критерия) при сравнительной оценке равнозначных выборок ( $n = 40$ ) —  $F = 0,9343$ , при критическом значении  $F_{\text{крит}} = 3,96$ . Для контроля стабильности определения фенола данными методами возможно применение стандартного образца, аттестованного одним из вышеуказанных методов. Результаты определения фенола методом ГЖХ статистически достоверно отличаются,  $F = 17,47$  при  $F_{\text{крит}} = 3,96$ , что подтверждает необходимость аттестации отдельного стандартного образца. **Выводы:** аттестованы стандартный образец содержания фенола 42-28-449 для спектрофотометрического, колориметрического метода и метода ВЭЖХ с аттестованной характеристикой содержания фенола от 2,56 до 3,32 мг/мл и стандартный образец содержания фенола 42-28-451 для метода ГЖХ с аттестованной характеристикой содержания фенола от 2,92 до 3,28 мг/мл.

**Ключевые слова:** стандартный образец; фенол; иммунобиологические лекарственные препараты; оценка качества; высокоэффективная жидкостная хроматография; газожидкостная хроматография; внутрилабораторный контроль качества

**Для цитирования:** Колесникова ОН, Фадейкина ОВ, Устинникова ОБ, Волкова РА, Мовсесянц АА. Разработка и аттестация стандартных образцов содержания фенола в иммунобиологических лекарственных препаратах с учетом сопоставимости результатов, полученных методами ГЖХ, ВЭЖХ, спектрофотометрии и колориметрии. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2021;21(3):193–199. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-3-193-199>

\***Контактное лицо:** Колесникова Оксана Николаевна; [kollesnikovaO@expmed.ru](mailto:kollesnikovaO@expmed.ru)

## Development and certification of reference standards for phenolic content in biologicals, based on comparison of results obtained by GLC, HPLC, spectrophotometric, and colorimetric methods

O. N. Kolesnikova\*, O. V. Fadeikina, O. B. Ustinnikova, R. A. Volkova, A. A. Movsesyants

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,  
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

Phenol is used as a preservative in a number of biological products. Methods that are used for quantitative determination of phenol differ a lot. Current requirements for accredited laboratories include continuous internal quality control. Reference standards with a certified content of the analyte are an effective metrological tool for ensuring such control. **The aim of the study** was to develop and certify reference standards for phenolic content in biological products, based on comparison of results obtained by GLC, HPLC, spectrophotometric, and colorimetric methods. **Materials and methods:** diluent for allergens by (candidate reference standard), 2.5 and 5 mg/mL phenol solutions, and 2.5 mg/mL 2-phenoxyethanol solution were used in the study. The experiments were performed using spectrophotometric, colorimetric, HPLC, and GLC procedures. The statistical analysis of results included calculation of the arithmetic mean, standard deviation, coefficient of variation, and analysis of variance with Student's  $t$ -test and Fisher's  $F$ -test. **Results:** the results of phenolic content determination by the spectrophotometric, colorimetric, and HPLC methods were statistically comparable. The  $F$  value obtained for equal sample sizes ( $n = 40$ ) was  $F = 0.9343$ , given the critical value  $F_{\text{crit}} = 3.96$ . A reference standard certified by one of these methods can be used to control the consistency of phenol determination by a relevant method.

The results of phenolic content determination by the GLC method showed statistically significant differences:  $F = 17.47$ , given  $F_{crit} = 3.96$ , which demonstrated the need for certification of another reference standard. **Conclusions:** two reference standards were certified in the study: reference standard 42-28-449 with the certified phenolic content of 2.56–3.32 mg/mL, to be used with the spectrophotometric, colorimetric, and HPLC methods; and reference standard 42-28-451 with the certified phenolic content of 2.92–3.28 mg/mL, to be used with the GLC method.

**Key words:** reference standard; phenol; biological products; quality control; high-performance liquid chromatography; gas-liquid chromatography; laboratory quality control

**For citation:** Kolesnikova ON, Fadeikina OV, Ustinnikova OB, Volkova RA, Movsesyants AA. Development and certification of reference standards for phenolic content in biologicals, based on comparison of results obtained by GLC, HPLC, spectrophotometric, and colorimetric methods. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2021;21(3):193–199. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-3-193-199>

\* **Corresponding author:** Oksana N. Kolesnikova; kolesnikovaO@expmed.ru

Производство иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) в силу ряда специфических особенностей предполагает использование антимикробных агентов — консервантов<sup>1</sup>. Одним из наиболее часто используемых консервантов является фенол<sup>2</sup>. Фенол входит в состав инфекционных и неинфекционных аллергенов, моно- и поливалентных полисахаридных вакцин, при этом его содержание колеблется в диапазоне от 1,5 до 4,0 мг/мл в зависимости от препарата. В соответствии с отечественными и зарубежными фармакопейными требованиями необходимо включение показателя «Фенол» в спецификацию на готовую форму, что предусматривает подтверждение соответствия количества фенола установленным значениям (норме)<sup>3</sup>.

Для количественной оценки фенола в ИЛП применяют фармакопейные методики колориметрического<sup>4</sup> и спектрофотометрического<sup>5</sup> определения и их модификации, а также новые методики, основанные на методах высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)<sup>6</sup> и газожидкостной хроматографии (ГЖХ) [1, 2]. Предпочтение методик хроматографического анализа обусловлено их большей специфичностью, возможной благодаря предварительному разделению компонентов испытуемого образца, что особенно актуально в случае ИЛП, обладающих сложной многокомпонентной матрицей [3–10].

Актуальные требования к аккредитованным лабораториям, изложенные в ГОСТ Р ИСО 17025-2019, предполагают посто-

янный внутрилабораторный контроль качества как на уровне оперативного контроля, так и на уровне оценки стабильности аналитической работы<sup>7</sup>.

Эффективным метрологическим инструментом обеспечения внутрилабораторного контроля качества являются стандартные образцы (СО), предназначенные для контроля стабильности определения содержания анализируемого компонента. Аттестованной характеристикой таких СО является установленный диапазон значений содержания анализируемого компонента. Соответствие данному диапазону подтверждает правильность выполнения анализа (оперативный контроль), а колебания значений внутри диапазона, установленные в ходе ретроспективного анализа, иллюстрируют стабильность аналитической работы. Кроме того, применение СО позволяет осуществлять проведение межлабораторных сличительных испытаний, обеспечивая возможность оценки сопоставимости результатов. Это особенно важно при внедрении вновь разработанных или модифицированных методик для обеспечения соответствия современным требованиям системы менеджмента качества (СМК) к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий<sup>8</sup>.

Таким образом, аттестация СО контроля стабильности определения фенола (далее — СО содержания фенола) в ИЛП представляется актуальным направлением исследования. Однако разнообразие методик определения требует предвари-

<sup>1</sup> Points to consider on the reduction elimination or substitution of thiomersal in vaccines. EMA; 2001.

<sup>2</sup> Фармакопейная статья 3.3.1.0023.15 Туберкулин очищенный (ППД) (аллерген туберкулезный очищенный). Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Фармакопейная статья 3.3.1.0001.15 Аллерген туберкулезный рекомбинантный в стандартном разведении. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Фармакопейная статья 3.3.1.0012.15 Вакцина брюшнотифозная Ви-полисахаридная. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Аллерген из пыльцы тимотефевки луговой для диагностики и лечения. [https://grls.rosminzdrav.ru/Grls\\_View\\_v2.aspx?routingGuid=dfe1a94d-86f0-4aa7-9988-101ab499c7ce&t=](https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=dfe1a94d-86f0-4aa7-9988-101ab499c7ce&t=)

<sup>3</sup> Общая фармакопейная статья 1.7.2.0028.18 Количественное определение фенола в биологических лекарственных препаратах. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

2.5.15 Phenol in immunosera and vaccines. European Pharmacopoeia 9th ed.; 2016.

Фармакопейная статья 3.3.1.0001.15 Аллерген туберкулезный рекомбинантный в стандартном разведении. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Фармакопейная статья 3.3.1.0012.15 Вакцина брюшнотифозная Ви-полисахаридная. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Фармакопейная статья 3.3.1.0013.15 Вакцина дизентерийная против шигелл Зонне. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Общая фармакопейная статья 1.7.1.0001.15 Аллергены. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

<sup>4</sup> 2.5.15 Phenol in immunosera and vaccines. European Pharmacopoeia 9th ed.; 2016.

<sup>5</sup> Общая фармакопейная статья 1.7.2.0028.18 Количественное определение фенола в биологических лекарственных препаратах. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

<sup>6</sup> Там же.

<sup>7</sup> ГОСТ ИСО/ИЕС 17025-2019 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий.

<sup>8</sup> ГОСТ ИСО/ИЕС 17025-2019 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий.

РМГ 76-2014 Государственная система обеспечения единства измерений. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа.

ГОСТ Р ИСО 5725-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений.

тельной оценки сопоставимости результатов, полученных с их применением, для возможности установления единой приемлемой аттестованной характеристики СО.

Цель работы — разработка и аттестация стандартных образцов содержания фенола в иммунобиологических лекарственных препаратах с учетом сопоставимости результатов, полученных методами ГЖХ, ВЭЖХ, колориметрическим и спектрофотометрическим.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- выбор кандидата в СО содержания фенола в ИЛП;
- оценка сопоставимости результатов определения фенола с применением методов колориметрического и спектрофотометрического анализа, а также методов ВЭЖХ и ГЖХ;
- аттестация СО содержания фенола.

## Материалы и методы

### Материалы:

- кандидат в СО — разводящая жидкость для неинфекционных аллергенов (АО «НПО «Микроген», Россия, серия 121); состав разводящей жидкости: фосфатно-солевой буферный раствор с добавлением полисорбата-80 (около 0,005 мг/мл) и фенола (от 2 до 4 мг/мл);

- раствор фенола с концентрацией около 2,5 мг/мл (с учетом поправки на чистоту реактива и массу навески), приготовленный по точной навеске фенола (Fisher Scientific, кат. № A9311);

- рабочий раствор для построения калибровочной характеристики (калибровочный стандартный раствор): раствор фенола с концентрацией около 5 мг/мл (с учетом поправки на чистоту реактива и массу навески), приготовленный по точной навеске фенола (Fisher Scientific, кат. № A9311);

- внутренний стандарт: раствор 2-феноксизанола с концентрацией около 2,5 мг/мл, приготовленный по точной навеске 2-феноксизанола (Sigma-Aldrich, кат. № 77699).

### Оборудование:

- хроматограф Agilent 7890B (Agilent Technologies, США) с пламенно-ионизационным детектором, автоматическим пробоотборником, программируемым термостатом колонки, узлом ввода проб с делением потока, электронной системой управления газовыми потоками, компьютерной системой сбора и обработки данных;

- хроматографическая капиллярная колонка DB-WAX 30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм, неподвижная фаза — полиэтиленгликоль (Agilent Technologies, США, кат. № 122–7032 E);

- спектрофотометр Shimadzu UV-1800 (Shimadzu, Япония) двухлучевой, спектральный диапазон 190–1100 нм;

- высокоэффективный жидкостной хроматограф Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, США) с УФ-детекцией.

### Методы

Метод ГЖХ с использованием колонки DB-WAX (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм) и следующих условий хроматографирования: температура инжектора 250 °С; деление потока 40:1; объем пробы 0,5 мкл; газ-носитель — гелий; режим — постоянное давление; скорость потока — 1,4 мл/мин; температурная программа печи: начальная температура 160 °С, выдержка 3 мин, повышение температуры до 200 °С со скоростью 40 °С/мин, выдержка 0,6 мин, повышение температуры до 220 °С со скоростью 40 °С/мин, время анализа 7,133 мин; температура детектора 250 °С [1, 2].

Спектрофотометрический метод определения фенола, основанный на способности фенола поглощать ультрафиолетовый (УФ) свет при длине волны 269 нм (в соответствии с ОФС Количественное определение фенола в биологических лекарственных препаратах)<sup>9</sup>.

Колориметрический метод определения фенола, основанный на способности фенола образовывать окрашенный комплекс с 4-аминоантипирином в присутствии калия феррицианида, детектируемый при длине волны 546 нм (в соответствии с монографией 2.5.15 Европейской фармакопеи)<sup>10</sup>.

Метод ВЭЖХ, основанный на выделении фенола при помощи обращенно-фазовой хроматографии и детектировании в УФ-свете при длине волны 270 нм (в соответствии с ОФС Количественное определение фенола в биологических лекарственных препаратах)<sup>11</sup>. Хроматографирование проводили в изократическом режиме с использованием колонки с носителем на основе октадецилсиликагеля (Symmetry C18 размер частиц 5 мкм, 3,9 мм × 150 мм, Waters N WAT046980) при комнатной температуре. В составе подвижной фазы применяли смесь ацетонитрила с уксусной кислотой (ацетонитрил:0,5% раствор уксусной кислоты, в соотношении 1:4). Время хроматографирования 12 мин.

Для обработки полученных результатов использовали статистические методы расчета среднего арифметического, стандартного отклонения, коэффициента вариации, дисперсионный анализ с помощью вычисления критерия Стьюдента и критерия Фишера [1].

### Результаты и обсуждение

Выбор материала для СО содержания фенола, порядок аттестации и установления значений аттестованных характеристик СО проводили, руководствуясь рекомендациями ВОЗ по изготовлению биологических стандартных образцов с учетом специфики биологических препаратов<sup>12</sup> [12–16].

При выборе кандидата в СО руководствовались стабильностью аналита при хранении в соответствующих условиях и его исходной концентрацией. Поскольку фенол обладает выраженной кислотностью и подвергается гидрированию и окис-

<sup>9</sup> Общая фармакопейная статья 1.7.2.0028.18 Количественное определение фенола в биологических лекарственных препаратах. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

<sup>10</sup> 2.5.15 Phenol in immunosera and vaccines. European Pharmacopoeia 9th ed.; 2016.

<sup>11</sup> Общая фармакопейная статья 1.7.2.0028.18 Количественное определение фенола в биологических лекарственных препаратах. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

<sup>12</sup> WHO manual for the establishment of national and other secondary standards for vaccines. WHO/IVB/11/03; 2011.

Recommendations for the preparation and establishment of international and other biological reference standards. Annex 2. WHO Technical Report Series No. 932; 2004.

Волкова РА. Система контроля качества медицинских иммунобиологических препаратов химическими и иммунохимическими методами: дис. ... д-ра биол. наук. М.; 2009.

<sup>13</sup> Приказ Минздрава России от 13.11.1996 № 377 «Об утверждении Инструкции по организации хранения в аптечных учреждениях различных групп лекарственных средств и изделий медицинского назначения».

Химическая энциклопедия. Т. 3. М.; 1992.

лению, его стабильность в растворе может обеспечиваться герметичностью упаковки и соблюдением требований к условиям хранения<sup>13</sup>. Выбранная в качестве кандидата в СО фенолсодержащая жидкость, используемая в качестве разводящей жидкости для препаратов аллергенов, удовлетворяет данным требованиям. Разводящая жидкость выпускается в виде ампулированного раствора с установленным сроком годности, концентрация фенола в разводящей жидкости (от 2 до 4 мг/мл) сопоставима с содержанием фенола в иммунобиологических препаратах (от 1,5 до 4 мг/мл).

Одним из основных требований к кандидату в СО содержания фенола является стабильность содержания определяемого вещества. Стабильность содержания фенола в образцах кандидата в СО оценивали методом естественного старения, сравнивая репрезентативные выборки результатов количественного определения фенола методом ГЖХ, полученные с разницей в два года, объемы выборок  $n = 40$ . Статистическую значимость различий результатов, полученных за два периода, определяли с использованием критерия Стьюдента. В результате расчетов получены следующие величины средних значений ( $X_1$  и  $X_2$ ) и стандартных отклонений первой и второй выборки соответственно:  $X_1 = 3,11$  мг/мл ( $n = 40$ ),  $S_1 = 0,06$  мг/мл и  $X_2 = 3,10$  мг/мл ( $n = 40$ ),  $S_2 = 0,09$  мг/мл. Расчетное значение критерия Стьюдента при оценке достоверности различия полученных величин — 0,571, что меньше критического табличного значения — 2,021 ( $n = 40$ ;  $\alpha = 0,05$ ). Это означает, что между двумя группами данных нет статистически значимых различий с вероятностью 95%. Полученный результат свидетельствует о стабильности значения концентрации фенола в образцах кандидата в СО содержания фенола в течение двух лет.

Необходимым условием для выбора кандидата в СО содержания фенола является оценка однородности дозирования аналита в первичной упаковке. Однородность дозирования в образцах кандидата в СО содержания фенола оценивали в соответствии с Государственной фармакопеей Российской Федерации путем расчета показателя приемлемости результатов испытаний (AV)<sup>14</sup>. Полученное значение первого показателя приемлемости 8,4% не превышает максимально допустимого значения L1, равного 15,0%, относительное стандартное отклонение значений полученной выборки  $RSD = 2,5\%$ , что свидетельствует о равномерности дозирования фенола в образцах кандидата в СО.

Результаты предварительных испытаний позволили сделать вывод о возможности применения выбранного материала для аттестации в качестве стандартного образца содержания фенола при определении фенола в ИЛП.

**Анализ возможности применения СО, аттестованного спектрофотометрическим методом, для колориметрического метода и метода ВЭЖХ**

Традиционные методики количественного определения фенола (на основе спектрофотометрического, колориметрического методов и метода ВЭЖХ) имеют сопоставимые точностные валидационные характеристики [1]. Возможность использования для разных методик СО содержания фенола с аттестованной характеристикой, полученной спектрофотометрическим методом, может быть подтверждена сопоставимостью результатов, полученных спектрофотометрическим, колориметрическим методом и методом ВЭЖХ.

Сопоставимость результатов, полученных спектрофотометрическим и колориметрическим методами, была подтверждена ранее [1] на основании результатов однофакторного дисперсионного анализа с расчетом  $F$ -критерия. В ходе анализа массивов данных, полученных при исследовании 13 образцов препаратов ИЛП в условиях внутривитриальной воспроизводимости, значения  $F$ -критерия для колориметрического и спектрофотометрического методов составили 1,05073 и 0,8313 соответственно, что существенно ниже критического значения — 3,26 (при доверительной вероятности 0,95). Полученные значения  $F$ -критерия свидетельствуют об отсутствии статистически значимых отличий между массивами данных [1].

Таким образом, оценку сопоставимости проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа с вычислением  $F$ -критерия (табл. 1).

Как следует из данных, представленных в таблице 1, расчетное значение  $F$ -критерия  $F = 0,9343$  существенно ниже табличного значения  $F_{\text{крит}} = 3,96$ , что свидетельствует об удовлетворительной сопоставимости результатов и отсутствии статистически значимых различий в результатах определения фенола.

Установление аттестованной характеристики СО содержания фенола спектрофотометрическим методом проводили на 40 образцах в условиях промежуточной прецизионности. Среднее значение составило 2,94 мг/мл, стандартное отклонение полученных результатов — 0,19 мг/мл. Значение аттестованной характеристики СО, выраженное в виде предела допустимых значений неопределенности  $\pm 2S$ , — от 2,56 до 3,32 мг/мл. Образцу присвоен номер 42-28-449.

Средние значения содержания фенола в СО 42-28-449, полученные методом ВЭЖХ и колориметрическим методом, составили 2,9 мг/мл ( $n = 40$ ) и 2,8 мг/мл ( $n = 10$ ) соответственно.

На основании данных результатов, а также результатов о сопоставимости методик, сделан вывод о возможности применения СО 42-28-449 для колориметрического метода и метода ВЭЖХ.

**Аттестация СО содержания фенола методом ГЖХ**

Методика ГЖХ предполагает применение СО содержания фенола, аттестованная характеристика которого соответствует ее точностным характеристикам [1, 2]. Для оценки возможности применения СО 42-28-449 для подтверждения стабильности измерений методикой ГЖХ оценивали сопоставимость результатов определения фенола спектрофотометрическим методом, методами ВЭЖХ и ГЖХ (табл. 2).

Как следует из таблицы 2, правильность, выраженная в виде среднего арифметического значения определяемой величины, удовлетворительна и не имеет значимых различий для всех методик. В то время как прецизионность методики ГЖХ, выраженная в виде стандартного отклонения и коэффициента вариации, отличается от прецизионности остальных методик приблизительно в 2 раза.

Статистическую значимость данных отличий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (табл. 2), расчетное значение коэффициента Фишера  $F = 17,47$  существенно выше табличного значения  $F_{\text{крит}} = 3,07$ , что свидетельствует о несопоставимости результатов.

Таким образом, применение СО 42-28-449 для стандартизации методики на основе метода ГЖХ неприемлемо.

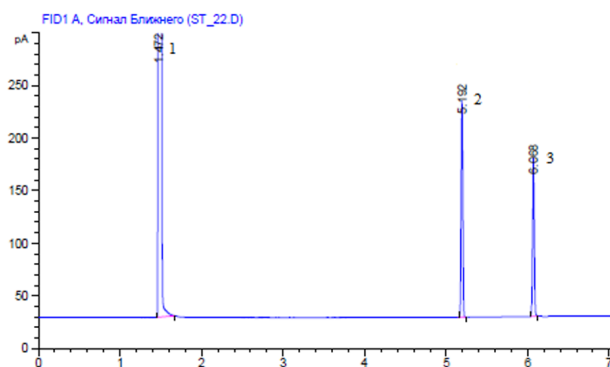
<sup>14</sup> Общая фармакопейная статья 1.4.2.0008.18 Однородность дозирования. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

**Таблица 1.** Оценка сопоставимости результатов определения фенола спектрофотометрическим (СФ) методом и методом ВЭЖХ  
**Table 1.** Comparability evaluation of phenol determination by the spectrophotometric (SPH) and HPLC methods

| Статистические характеристики<br>Statistics                                                                                                                                                              | Методы определения фенола<br>Phenol determination methods |                |        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------|--------|
|                                                                                                                                                                                                          | СФ<br>SPh                                                 | ВЭЖХ<br>HPLC   |        |
| Среднее значение результатов определения концентрации фенола в СО, мг/мл<br>( $n = 40$ )<br>Mean of phenol concentration in the reference standard, mg/mL ( $n = 40$ )                                   | $X_{\text{ср}}$                                           | 2,94           | 2,90   |
| Стандартное отклонение, мг/мл<br>Standard deviation, mg/mL                                                                                                                                               | $S$                                                       | 0,19           | 0,18   |
| Дисперсия<br>Variance                                                                                                                                                                                    | $S^2$                                                     | 0,0361         | 0,0324 |
| Среднее значение результатов определения концентрации фенола в СО, мг/мл<br>по двум выборкам ( $n = 40$ )<br>Mean of phenol concentration in the reference standard, mg/mL, for two samples ( $n = 40$ ) | $\bar{X}_{\text{ср}}$                                     | 2,92           |        |
| Стандартное отклонение средних значений, мг/мл<br>Standard deviation of the mean, mg/mL                                                                                                                  | $S_{\text{ср}}$                                           | 0,028284       |        |
| Дисперсия средних<br>Variance of the mean                                                                                                                                                                | $S^2$                                                     | 0,000799984656 |        |
| Внутригрупповая дисперсия<br>Within-group variance                                                                                                                                                       | $S_{\text{внут}}$                                         | 0,03425        |        |
| Межгрупповая дисперсия<br>Between-group variance                                                                                                                                                         | $S_{\text{меж}}$                                          | 0,03199938624  |        |
| Значение критерия Фишера<br>F value                                                                                                                                                                      | $F$                                                       | 0,9343         |        |
| Межгрупповое число степеней свободы<br>Number of degrees of freedom for between-group variance                                                                                                           | $V_{\text{меж}}$                                          | 1              |        |
| Внутригрупповое число степеней свободы<br>Number of degrees of freedom for within-group variance                                                                                                         | $V_{\text{внут}}$                                         | 78             |        |

**Таблица 2.** Оценка сопоставимости результатов определения фенола спектрофотометрическим методом, методами ВЭЖХ и ГЖХ и их точностные характеристики  
**Table 2.** Comparability evaluation of phenol determination by the spectrophotometric (SPH), HPLC, and GLC methods, and accuracy of the results

| Статистические характеристики<br>Statistics                                                                                                                                                                | Методы определения фенола<br>Phenol determination methods |            |              |        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|------------|--------------|--------|
|                                                                                                                                                                                                            | ГЖХ<br>GLC                                                | СФ<br>SPh  | ВЭЖХ<br>HPLC |        |
| Среднее значение результатов определения концентрации фенола в СО, мг/мл ( $n = 40$ )<br>Mean of phenol concentration in the reference standard, mg/mL ( $n = 40$ )                                        | $X_{\text{ср}}$                                           | 3,10       | 2,94         | 2,90   |
| Стандартное отклонение, мг/мл<br>Standard deviation, mg/mL                                                                                                                                                 | $S$                                                       | 0,09       | 0,19         | 0,18   |
| Относительное стандартное отклонение, %<br>Relative standard deviation                                                                                                                                     | $RSD$                                                     | 2,9        | 6,46         | 6,21   |
| Дисперсия<br>Variance                                                                                                                                                                                      | $S^2$                                                     | 0,00839    | 0,0361       | 0,0324 |
| Среднее значение результатов определения концентрации фенола в СО, мг/мл<br>по трем выборкам ( $n = 40$ )<br>Mean of phenol concentration in the reference standard, mg/mL, for three samples ( $n = 40$ ) | $\bar{X}_{\text{ср}}$                                     | 2,98       |              |        |
| Стандартное отклонение средних значений, мг/мл<br>Standard deviation of the mean, mg/mL                                                                                                                    | $S_{\text{ср}}$                                           | 0,1058     |              |        |
| Дисперсия средних<br>Variance of the mean                                                                                                                                                                  | $S^2$                                                     | 0,01119364 |              |        |
| Внутригрупповая дисперсия<br>Within-group variance                                                                                                                                                         | $S_{\text{внут}}$                                         | 0,02563    |              |        |
| Межгрупповая дисперсия<br>Between-group variance                                                                                                                                                           | $S_{\text{меж}}$                                          | 0,4477456  |              |        |
| Значение критерия Фишера<br>F value                                                                                                                                                                        | $F$                                                       | 17,47      |              |        |
| Межгрупповое число степеней свободы<br>Number of degrees of freedom for between-group variance                                                                                                             | $V_{\text{меж}}$                                          | 2          |              |        |
| Внутригрупповое число степеней свободы<br>Number of degrees of freedom for within-group variance                                                                                                           | $V_{\text{внут}}$                                         | 117        |              |        |
| Табличное значение критерия Фишера (уровень значимости $\alpha = 0,05$ )<br>Tabular F value (significance level $\alpha = 0,05$ )                                                                          | $F_{\text{крит}}$                                         | 3,07       |              |        |



**Рис. 1.** Хроматограмма раствора фенола (по оси абсцисс — время удерживания, мин; по оси ординат — величина аналитического сигнала, pA). 1 — пик растворителя; 2 — хроматографический пик, соответствующий фенолу; 3 — хроматографический пик, соответствующий 2-феноксизэтанолу.

**Fig. 1.** Chromatogram of the phenol solution (X-axis—retention time, min; Y-axis—response, pA). 1—solvent peak; 2—chromatographic peak due to phenol; 3—chromatographic peak due to 2-phenoxyethanol.

Далее провели аттестацию СО содержания фенола методикой ГЖХ, предварительно оценив возможное влияние состава кандидата в СО на результаты анализа, путем сравнения типичных хроматограмм раствора фенола 2,5 мг/мл (рис. 1) и кандидата в СО (рис. 2).

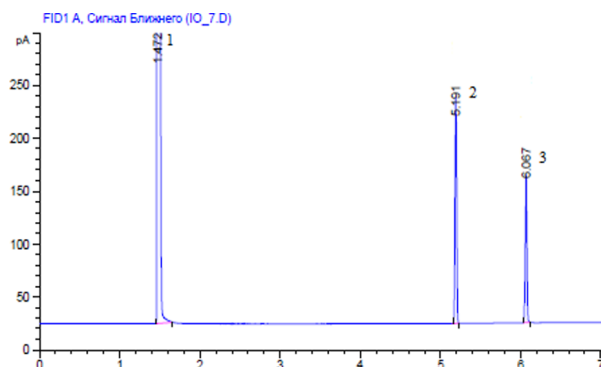
Отсутствие посторонних пиков, разрешение и совпадение времен удерживания пиков фенола (5,192 и 5,191 мин) и пиков внутреннего стандартного образца 2-феноксизэтанол (6,068 и 6,067 мин) позволяют сделать вывод об отсутствии неспецифического влияния вспомогательных веществ, входящих в состав кандидата в СО, на результаты определения фенола.

Установление аттестованной характеристики СО методом ГЖХ проводили на 40 образцах в условиях промежуточной прецизионности. Среднее значение составило 3,10 мг/мл, стандартное отклонение полученных результатов — 0,09 мг/мл. Значение аттестованной характеристики СО содержания фенола, выраженное в виде предела допустимых значений неопределенности  $\pm 2S$ , — от 2,92 до 3,28 мг/мл. Образцу присвоен номер 42-28-451.

### Заключение

Результаты определения фенола спектрофотометрическим и колориметрическим методами, а также методом ВЭЖХ статистически достоверно сопоставимы. Таким образом, для контроля стабильности определения фенола возможно применение стандартного образца, аттестованного одним из вышеуказанных методов. Результаты определения фенола методом ГЖХ статистически достоверно отличаются от результатов, полученных вышеуказанными методами, что подтверждает необходимость аттестации отдельного стандартного образца. Таким образом, аттестованы фармакопейный<sup>15</sup> стандартный образец содержания фенола 42-28-449 (для спектрофотометрического, колориметрического метода и метода ВЭЖХ) и фармакопейный стандартный образец содержания фенола 42-28-451 (для метода ГЖХ).

**Вклад авторов.** О. Н. Колесникова — формирование задач исследования, выполнение экспериментальных работ и статистическая обработка данных, обсуждение результа-



**Рис. 2.** Хроматограмма кандидата в СО (по оси абсцисс — время удерживания, мин; по оси ординат — величина аналитического сигнала, pA). 1 — пик растворителя; 2 — хроматографический пик, соответствующий фенолу; 3 — хроматографический пик, соответствующий 2-феноксизэтанолу.

**Fig. 2.** Chromatogram of the candidate reference standard (X-axis—retention time, min; Y-axis—response, pA). 1—solvent peak; 2—chromatographic peak due to phenol; 3—chromatographic peak due to 2-phenoxyethanol.

тов исследования, формирование документации на стандартные образцы, написание текста рукописи; **О. В. Фадейкина** — проверка документации на стандартные образцы; **О. Б. Устинникова** — идея и дизайн исследования, обсуждение результатов исследования, проверка документации на стандартные образцы, редактирование и дополнение текста рукописи; **Р. А. Волкова** — обсуждение результатов исследования, проверка и согласование документации на стандартные образцы, редактирование текста рукописи; **А. А. Мовсесянц** — окончательное утверждение версии рукописи для публикации.

**Authors' contributions.** *Oksana N. Kolesnikova*—formulation of the objectives, carrying out experiments, statistical analysis of the results, discussion of the study results, preparation of documentation for the reference standards, writing of the text; *Olga V. Fadeikina*—revision of the documentation for the reference standards; *Olga B. Ustinnikova*—elaboration of the study idea, and design, discussion of the study results, revision of the documentation for the reference standards, revision of the text of the paper, writing of some parts of the paper; *Rauza A. Volkova*—discussion of the study results, revision and approval of the documentation for the reference standards, editing of the text; *Artashes A. Movsesyants*—approval of the final version of the paper for publication.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00005-21-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР № 121022000147-4).

**Acknowledgements.** The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00005-21-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4).

**Конфликт интересов.** А. А. Мовсесянц является членом редколлегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

**Conflict of interest.** Artashes A. Movsesyants is a member of the Editorial Board of the *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

<sup>15</sup> Приказ Минздрава России № 202 от 20.03.2020 «О метрологической службе Министерства здравоохранения Российской Федерации в сфере обращения лекарственных средств для медицинского применения».

## Литература/References

1. Колесникова ОН, Рунова ОБ, Устинникова ОБ. Разработка и валидация методики количественного определения фенола методом газожидкостной хроматографии в биологических лекарственных препаратах. *Химико-фармацевтический журнал*. 2018;52(5):60–4. [Kolesnikova ON, Runova OB, Ustinnikova OB. Development and validation of gas-liquid chromatography method for quantitative determination of phenol in biological medicinal products. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018;52(5):60–4 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2018-52-5-60-64>
2. Колесникова ОН, Устинникова ОБ, Рунова ОБ. Способ количественного определения фенола методом газожидкостной хроматографии в биологических лекарственных препаратах. Патент Российской Федерации № 2693518; 2019. [Kolesnikova ON, Ustinnikova OB, Runova OB. Method for quantitative determination of phenol in biological medicinal preparations by gas-liquid chromatography. Patent of the Russian Federation No. 2693518; 2019 (In Russ.)]
3. Dettmer-Wilde K, Engewald W. *Practical Gas Chromatography: a Comprehensive Reference*. Berlin: Springer, 2014.
4. Berezkin VG, *Chemical Methods in Gas Chromatography. Journal of Chromatography Library*. V. 24. Amsterdam; New York: Elsevier Scientific Publishers; 1983.
5. Parris NA. *Instrumental Liquid Chromatography. Journal of Chromatography Library*. V. 27. Amsterdam; New York: Elsevier Science Publishers; 1984.
6. Хайвер К, ред. *Высокоэффективная газовая хроматография*. М.: Мир; 1993. [Hyver K, ed. *High resolution liquid chromatography*. Hewlett-Packard Co.; 1989 (In Russ.)]
7. Bruner F. *The Science of Chromatography. Journal of Chromatography Library*. V. 32. Amsterdam; New York: Elsevier, 1985.
8. Guiochon G, Guillemin CL. *Quantitative Gas Chromatography for Laboratory Analyses and On-line Process Control. Journal of Chromatography Library*. V. 42. Amsterdam; New York: Elsevier; 1988.
9. Rotzsch H. *Stationary Phases in Gas Chromatography. Journal of Chromatography Library*. V. 48. Amsterdam; New York: Elsevier; 1991.
10. Hanai T. *Liquid Chromatography in Biomedical Analysis. Journal of Chromatography Library*. V. 50. Amsterdam; New York: Elsevier; 1991.
11. Гланц С. *Медико-биологическая статистика*. М.: Практика; 1998. [Glantz SA. *Primer of biostatistics*. 4th ed. New York: McGraw-Hill, Inc; 1994]
12. Бондарев ВП, Борисевич ИВ, Волкова РА, Фадейкина ОВ. Проблема аттестации отраслевых стандартных образцов для контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2013;(2):28–32. [Bondarev VP, Borisevich IV, Volkova RA, Fadeikina OV. Industry reference standards certification for the control of medical immunobiological preparations. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv medicinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2013;(2):28–32 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2013-0-2>
13. Фадейкина ОВ, Волкова РА. Разработка порядка аттестации стандартных образцов биологических лекарственных средств. *Химико-фармацевтический журнал*. 2017;51(8):44–50. [Fadeikina OV, Volkova RA. Elaboration of the certification procedure for biological reference standards. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2017;51(8):44–50 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2017-51-8-44-50>
14. Волкова РА. Проблемы метрологического обеспечения методик оценки качества иммунобиологических препаратов, в кн.: *I Международная конференция «Стандартные образцы в измерениях и технологиях»*. Сборник трудов. Ч. 1. Екатеринбург; 2013. С. 88–90. [Volkova RA. Problems metrological support of quality assessment methods of immunobiological drugs. *In international conference "Reference materials and measurement technology"*. Proceedings. Part 1. Ekaterinburg; 2013. P. 88–90 (In Russ.)]
15. Волкова РА. Методики контроля или методики испытаний — к вопросу о метрологическом обеспечении аналитических методик. *Справочник заведующего КДЛ*. 2013;(4):4–9. [Volkova RA. Methods of control or testing procedures — the issue of metrological support of analytical methods. *Spravochnik zaveduyuschego KDL*. 2013;(4):4–9 (In Russ.)]
16. Меркулов ВА, Саканян ЕИ, Климов ВИ, Шеремякина ТБ, Яшкир ВА, Бармин АВ. Современные подходы к разработке стандартных образцов для оценки качества фармацевтических субстанций. *Химико-фармацевтический журнал*. 2015;49(11):54–6. [Merkulov VA, Sakanyan EI, Klimov VI, Shemeryankina TB, Yashkir VA, Barmin AV. Modern approaches to development of reference substances for evaluation of the quality of pharmaceuticals. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015;49(11):54–6 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2015-49-11-54-56>

## Об авторах / Authors

**Колесникова Оксана Николаевна**. Oksana N. Kolesnikova. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8664-5800>

**Фадейкина Ольга Васильевна**, канд. биол. наук. Olga V. Fadeikina, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>

**Устинникова Ольга Борисовна**, канд. биол. наук. Olga B. Ustinnikova, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5432-1887>

**Волкова Рауза Асхатовна**, д-р биол. наук. Rauza A. Volkova, Dr. Sci. (Biol.). <https://orcid.org/0000-0001-8698-2890>

**Мовсесянц Арташес Авакович**, д-р мед. наук, проф. Artashes A. Movsesyants, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2132-0962>

Поступила 15.03.2021

После доработки 24.06.2021

Принята к публикации 03.09.2021

Received 15 March 2021

Revised 24 June 2021

Accepted 3 September 2021