

Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

DOI: 10.30906/0023-1134-2018-52-5-60-64
© Коллектив авторов, 2018

О. Н. Колесникова, О. Б. Рунова, О. Б. Устинникова

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕНОЛА МЕТОДОМ ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2; e-mail: KolesnikovaO@expmed.ru

Разработана методика количественного определения фенола в биологических лекарственных препаратах методом газожидкостной хроматографии. Оптимальные условия хроматографирования были подобраны для колонки DB-WAX (размер 30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм) фирмы Agilent Technologies; 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; температурный профиль печи: начальная температура 160 °С, выдержка 3 мин, градиент 40 °С/мин до температуры 200 °С выдержка 0,6 мин, градиент 40 °С до температуры 220 °С; время анализа 7,133 мин; температура детектора 250 °С. Методика валидирована, аналитическая область методики установлена в диапазоне концентраций от 1 до 5 мг/мл фенола; подтверждены правильность и специфичность методики, оценена прецизионность. Полученные результаты позволяют рассматривать данную методику в качестве альтернативной для количественного определения фенола в биологических лекарственных препаратах.

Ключевые слова: фенол; газожидкостная хроматография; биологические лекарственные препараты; количественное определение.

Международная практика производства биопрепаратов допускает возможность использования антимикробных соединений для защиты продукции от контаминации, поскольку биопрепараты, в силу своей лабильности, не могут быть подвергнуты стерилизации в первичной упаковке. Кроме того, для некоторых компонентов комбинированных вакцин или биопрепаратов в виде суспензии неприменима стерилизующая фильтрация непосредственно перед смешиванием или розливом. Использование антимикробного консерванта дает дополнительные гарантии отсутствия бактериального загрязнения и препятствует его распространению [1].

Фенол в качестве более щадящего консерванта по сравнению с ртутьорганическими соединениями является востребованной заменой тиомерсалу и применяется при производстве отечественных и зарубежных биологических лекарственных препаратов (БЛП) в концентрации от 0,15 до 0,4 % (от 1,5 до 4 мг/мл), в зависимости от технологии, состава и формы выпуска препарата.

Методы ВЭЖХ и газовой хроматографии (ГХ), обладающие специфичностью, чувствительностью и воспроизводимостью, минимизируют вклад оператора в результаты анализа и имеют программное обеспечение, позволяющее обеспечить документирование процесса, что отвечает современным тенденциям системы

менеджмента качества и требованиям к испытательным лабораториям [2].

Возможность использования метода ГХ для определения фенола в биологических лекарственных препаратах исследовали в Федеральном государственном учреждении науки «Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича» на аппарате Fisons 8000 (Великобритания) [3]. В настоящее время с появлением новых моделей оборудования и хроматографических колонок возникла необходимость отработки условий проведения анализа, ориентированных на использование актуальных разработок в области газожидкостной хроматографии (ГЖХ).

Экспериментальная часть

В работе использовали следующие материалы и оборудование:

1. Образцы 1 и 2 — вакцина пневмококковая полисахаридная, Польша;
2. Образец 3 — вакцина пневмококковая поливалентная полисахаридная, Франция;
3. Образец 4 — вакцина брюшнотифозная полисахаридная, Россия;

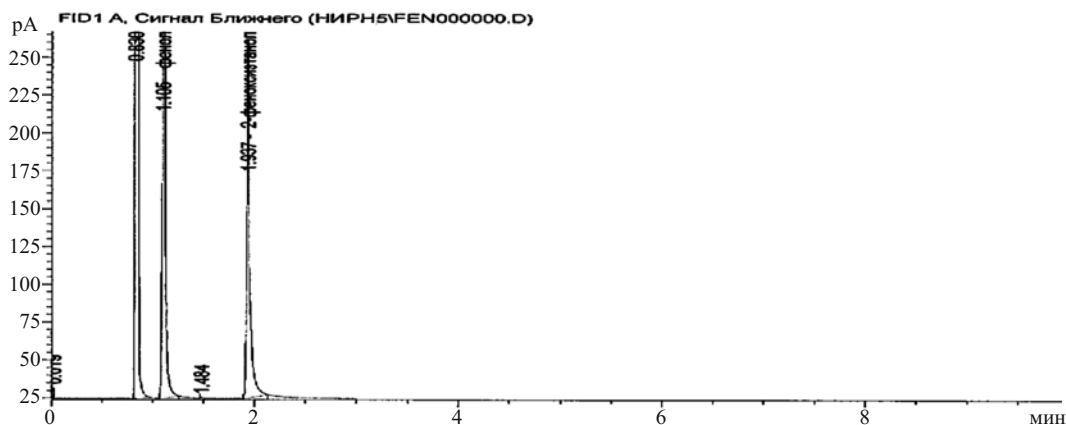


Рис. 1. Хроматограмма разделения с использованием колонки HP-5.

4. Образец 5 — аллерген весенняя смесь ранняя, Чехия;

5. Фенол, Fisher Scientific, кат. № A931I;
6. Бензиловый спирт, Sigma Aldrich 13160;
7. 2-феноксизтанол, Sigma Aldrich 77699;

8. Хроматограф Agilent 7890B с пламенно-ионизационным детектором, автоматическим пробоотборником, программируемым термостатом колонки, вводом проб с делением потока, электронной системой управления газовыми потоками, компьютерной системой сбора и обработки данных;

9. Колонка DB-WAX 30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм, кат. 122 – 7032E, фаза — полиэтиленгликоль, производитель Agilent Technologies;

10. Колонка HP-5 30 м × 0,320 мм × 0,25 мкм, кат. 19091J-413, фаза 5%-фенил — 95% метилсилоксан, производитель Agilent Technologies.

Для определения фенола могут быть использованы колонки с различными размерными характеристиками и полярностью фаз при индивидуальном подборе оптимальных условий хроматографирования. При выборе колонок мы руководствовались методическими рекомендациями производителя оборудования Agilent [4].

Поскольку полярность неподвижной фазы является одним из факторов, оказывающих существенное влияние на эффективность разделения веществ [4, 5], мы сравнивали показатели эффективности хроматографических систем, используя колонки с нейтральной и полярной фазами с одинаковыми размерными характеристиками. Результаты оценивали, используя следующие

критерии, характеризующие пригодность хроматографической системы (ХС): эффективность, разрешение, относительное время удерживания и фактор симметрии. Указанные критерии рассчитывали, используя программное обеспечение прибора.

Для подбора колонок и условий хроматографирования проводили модельные опыты, используя стандартные растворы, содержащие фенол с концентрацией 3 мг/мл, а для контроля эффективности ХС применяли 2-феноксизтанол и бензиловый спирт. В качестве растворителя стандартных образцов использовали 96% этанол.

Поскольку 2-феноксизтанол и фенол имеют сходное строение и близкие физические свойства, целесообразно использование 2-феноксизтанола в качестве внутреннего стандарта [6].

Эффективность разделения смеси бензинового спирта, фенола, 2-феноксизтанола на колонках HP-5 и DB-WAX с нейтральной и полярной фазами (рис. 1 и 2) оценивали при одинаковых хроматографических условиях.

Сравнительный анализ критериев пригодности ХС проводили в соответствии с рекомендациями Европейской фармакопеи (табл. 1) [6, 7].

Как следует из рис. 1 и 2, а также табл. 1, эффективность разделения на колонке DB-WAX с высокополярной неподвижной фазой существенно выше. Далее для данной колонки были экспериментально подобраны условия хроматографирования, обеспечивающие

Таблица 1
Сравнительный анализ критериев пригодности ХС по пику фенола

Критерий	HP-5	DB-WAX
Эффективность (число теоретических тарелок)	20699	124778
Разрешение между пиками фенола и 2-феноксизтанола	13,4	28,3
Относительное время удерживания	0,275	0,660
Фактор симметрии	0,75	1,02

Таблица 2
Результаты определения фенола в образцах методом ГЖХ

Образец	Метод определения фенола в соответствии с НД	Требования НД, мг/мл	Результаты определения методом	
			НД	ГЖХ
1	ВЭЖХ	от 2,25 до 2,75	2,31	2,41
2	ВЭЖХ	от 2,25 до 2,75	2,61	2,55
3	Колориметрический	не более 2,5	2,06	2,06
4	Спектрофотометрический	не более 1,5	1,27	1,25
5	Колориметрический	1,0 – 4,0	1,77	1,88

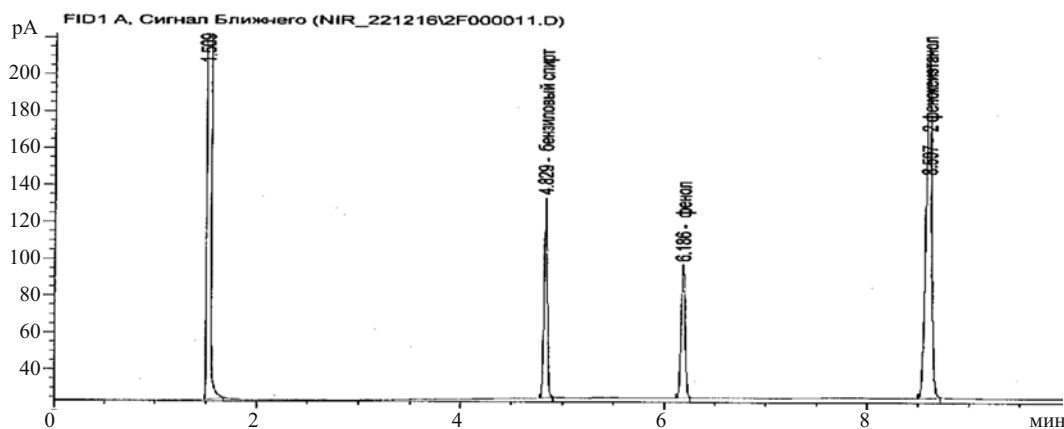


Рис. 2. Хроматограмма разделения с использованием колонки DB-WAX.

Таблица 3

Оценка линейности разработанной методики

Критерий	Данные для калибровочной характеристики	
	по абсолютным площадям пиков фенола	по относительным площадям пиков фенола
Стандартное отклонение площади пика фенола ($n = 9$)	Не более 3,73	Не более 0,011
RSD, %	Не более 4,1	Не более 2,6
Свободный член уравнения	$8,7742 \pm 0,2287$	$0,0246 \pm 0,003$
Угловой коэффициент	$77,7743 \pm 0,2088$	$0,3905 \pm 0,025$
Коэффициент корреляции	Не менее 0,99	Не менее 0,999

выполнение критериев пригодности ХС при минимальном времени анализа:

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

Температурный профиль печи имел следующие показатели: начальная температура 160 °С, выдержка 3 мин, градиент 40 °С/мин, до температуры 200 °С, выдержка 0,6 мин, градиент 40 °С/мин, до температуры 220 °С. Время анализа — 7,133 мин. Температура детектора — 250 °С.

Данные условия были использованы для количественного определения фенола в образцах 1 – 5. Типичная хроматограмма и результаты определения фенола в БЛП представлены на рис. 3 и в табл. 2. Как следует

из табл. 2, результаты определения фенола в представленных препаратах методом ГХ соответствуют требованиям нормативной документации (НД) и коррелируют с результатами, полученными с применением методов НД [8].

Далее для разработанной методики установлены валидационные характеристики — линейность, аналитическая область, специфичность, правильность, прецизионность [9].

Линейность изучали в диапазоне концентраций фенола от 0,2 до 5 мг/мл, поскольку данный интервал включает диапазон концентраций возможного содержания фенола в БЛП (от 1,5 до 4 мг/мл) и позволяет выбрать наиболее подходящую аналитическую область методики для каждого конкретного препарата. В качестве исходного стандартного раствора использовали раствор фенола в этаноле, приготовленный по точной навеске, с добавлением 2-феноксиэтанола в конечной концентрации 1,7 мкл/мл. В качестве растворителя использовали воду очищенную. Анализ проводили в 3 повторностях, делая по 3 закола для стандартного раствора каждой концентрации. Характер зависимости сигнала от концентрации фенола оценивали по абсолютной и относительной площадям пика фенола (методом внутреннего стандарта, используя 2-феноксиэтанол). Результаты представлены в табл. 3.

Полученные данные свидетельствуют о целесообразности использования внутреннего стандарта для повышения точности определения.

Таблица 4

Оценка правильности разработанной методики

Образец 1	Теоретическая концентрация фенола, мг	Среднее значение экспериментально найденной концентрации фенола, мг ($n = 18$)
+ 0,2 мг фенола	2,79	2,78
+ 0,4 мг фенола	2,99	3,00
+ 0,6 мг фенола	3,19	3,22
+ 1 мг фенола	3,59	3,65

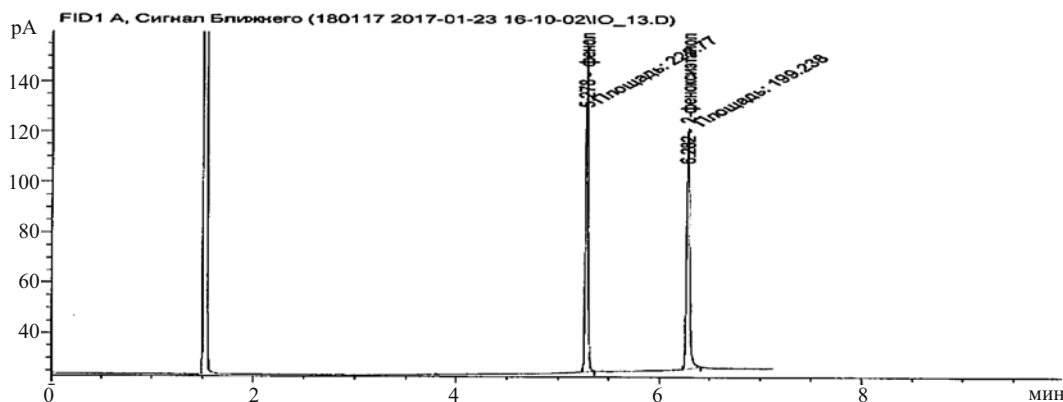


Рис. 3. Пример хроматограммы образца 1.

Таблица 5

Расчет процента выявления содержания фенола и отклонения от ожидаемого количества фенола в вакцине с добавленным содержанием фенола

Образец 1	Теоретическая концентрация	$\bar{x}_{\text{ср}}$ ($n = 18$)	Выявление от ожидаемого количества, %	Отклонение от ожидаемого количества, %
+ 0,2 мг фенола	2,79	2,78	99,7	-0,3
+ 0,4 мг фенола	2,99	3,00	100,2	0,2
+ 0,6 мг фенола	3,19	3,22	100,8	0,8
+ 1 мг фенола	3,59	3,65	101,6	1,6
Среднее значение % от ожидаемого			100,6	
Стандартное отклонение % от ожидаемого			0,81	

Поскольку полученные данные подтверждают линейность исследуемой области концентраций, в качестве аналитической области может быть выбран наиболее удобный диапазон концентраций от 1 до 5 мг/мл фенола с более чем 20 %-ным запасом нижней и верхней границ.

Специфичность методики подтверждает отсутствие сигналов в области времени удерживания пиков фенола и 2-феноксэтанола, способных повлиять на количественное определение фенола на хроматограммах испытуемых образцов с добавлением внутреннего стандарта 2-феноксэтанола в конечной концентрации 1,7 мкл/мл.

Для оценки правильности метода готовили модельные растворы, представляющие собой образец 1 с добавленным количеством фенола в диапазоне от 0,2 до 1 мг. Строили график линейной зависимости “теоретическая — экспериментально найденная концентрация” фенола. Теоретическую концентрацию фенола в образцах рассчитывали как среднее значение ($n = 18$) концентрации фенола в образце 1 без добавки плюс добавленное количество фенола.

Используя данные табл. 4, строили график зависимости экспериментально полученных значений концентраций фенола в образцах от теоретических значений концентраций, данная зависимость описывается уравнением линейной регрессии вида: $y = b \cdot x + a$, $y = 1,0871x - 0,2511$. Коэффициент детерминации регрессионной зависимости $R^2 = 1$. Полуширина доверительных интервалов отклонений констант уравнения

регрессии при уровне значимости $p = 0,05$ имеет следующие расчетные значения: $\Delta b = 0,82259$; $\Delta a = 2,594$. Таким образом, значение углового коэффициента 1,0871 полученной калибровочной кривой отвечает диапазону $(1 \pm 0,82259)$, что статистически не отличается от 1, а значение свободного члена 0,2511 отвечает диапазону $(0 \pm 2,5945)$, что статистически не отличается от 0 [10].

Также правильность и специфичность методики подтверждается расчетом процента выявления ожидаемого количества и отклонения от ожидаемого количества фенола.

В табл. 5 показано, что значения отклонения от ожидаемого количества находится в пределах $(100 \pm 1,62)$ %.

Статистические величины для полученного графика регрессии между экспериментально найденными и теоретическими значениями концентраций фенола и расчет процента выявления и отклонения от ожидаемого количества показывают, что методика дает правильные, свободные от системной ошибки результаты.

При оценке прецизионности методики получены значения относительного отклонения в условиях повторяемости и внутрिलाбораторной воспроизводимости, величина которых составляла не более 2 %.

Таким образом, установленные в ходе валидации характеристики, а также специфичность и аналитическая область позволяют рассматривать разработанную методику количественного определения фенола в БЛП

в качестве альтернативной для количественного определения фенола в указанных препаратах.

ЛИТЕРАТУРА

1. EMA, *Points to consider on the reduction, elimination or substitution of thiomersal in vaccines*; [Электронный ресурс], URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003929.pdf.
2. ГОСТ 17025-2009, *Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий*, Москва (2012).
3. О. Б. Рунова, Р. А. Волкова, *Клин. лаб. диагностика*, № 7, 12 – 14 (2000).
4. Agilent Technologies [Электронный ресурс]: www.agilent.com/chem/.
5. К. Хайвер, *Высокоэффективная газовая хроматография*, Мир, Москва (1993).
6. European Pharmacopoeia, *Chromatographic separation techniques 07/2016:20246/*; [Электронный ресурс], URL: <http://online6.edqm.eu/ep902/#>
7. European Pharmacopoeia, *Gas chromatography 01/2008:20228/*; [Электронный ресурс], URL: <http://online6.edqm.eu/ep902/#>
8. О. Н. Колесникова, М. Г. Коротков, В. И. Малкова и др., *Биопрепараты*, № 4, 44 – 51 (2015).
9. Государственная фармакопея РФ, *Валидация аналитических методик ОФС 1.1.002.15/*; [Электронный ресурс], URL: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia1/HTML/#222.
10. Государственная фармакопея РФ, *Статистическая обработка результатов ОФС 1.1.0013.15/*; [Электронный ресурс] URL: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia1/HTML/#234.

Поступила 28.04.18

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF PHENOL IN BIOLOGICAL MEDICINAL PRODUCTS

O. N. Kolesnikova*, O. B. Runova, and O. B. Ustinnikova

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 127051 Russia;

* e-mail: KolesnikovaO@expmed.ru

A method for the quantitative determination of phenol in biological medicinal products by gas-liquid chromatography was developed. Optimum separation was achieved using Agilent Technologies DB-WAX column (30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 μm) operated at the injector and detector temperatures of 250°C, split ratio of 40 : 1, and an injected sample volume of 0.5 mL. Helium was used as a carrier gas at constant column pressure and flow rate of 1.4 mL/min. Oven temperature was programmed at 160°C (3 min), ramp at 40°C/min rate to 200°C, kept for 0.6 min, and ramp at 40°C/min rate to 220°C, with a total analysis time of 7.133 min at detector temperature of 250°C. Validation of the proposed method established its analytical range of phenol concentrations within 1–5 mg/mL and confirmed correctness, specificity, and precision of analysis. The results showed this method to be good alternative for the quantitative determination of phenol in biological medicinal products.

Keywords: phenol; gas-liquid chromatography; biological medicinal preparations; quantitative determination.