

На правах рукописи

ШАТАЛОВ ДЕНИС ОЛЕГОВИЧ

**РАЗРАБОТКА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА
РАЗВЕТВЛЕННОГО ОЛИГОГЕКСАМЕТИЛЕНГУАНИДИН
ГИДРОХЛОРИДА**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Самара– 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Московский государственный университет тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова» Министерства образования и науки Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор технических наук, профессор *Кедик Станислав Анатольевич*

Официальные оппоненты:

Петр Петрович Пурыгин - доктор химических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение «Самарский государственный университет» Министерства образования и науки Российской Федерации, кафедра органической, биоорганической и медицинской химии, заведующий кафедрой.

Ольга Георгиевна Потанина – доктор фармацевтических наук, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки Российской Федерации; Центр коллективного пользования (научно-образовательный центр); Центр научных исследований и разработок Центра коллективного пользования, директор Центра.

Ведущая организация:

федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова», Федерального агентства научных организаций, г. Москва.

Защита состоится «04» декабря 2015 г в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 208.085.06 при государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (443079, г. Самара, пр. К. Маркса, 165 Б).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171) и на сайте (<http://www.samsmu.ru/science/referats>) государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат диссертации разослан « » октября 2015 г

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат фармацевтических наук,
доцент

Петрухина Ирина Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Инфекционные болезни – одна из самых распространенных групп заболеваний человека в настоящее время (Покровский В.И., 2010). В первой половине XX века были достигнуты значительные успехи в борьбе с инфекционными болезнями, однако на сегодняшний день они по-прежнему играют существенную роль в патологии человека и наносят огромный экономический ущерб обществу. Во многих странах ситуация усугубляется неблагоприятной социально-экономической обстановкой; тем не менее, во всем мире, независимо от уровня экономического развития, отмечается рост заболеваемости инфекционными болезнями, и даже регистрируются эпидемии (Weijia X., 2014).

Указанные факты свидетельствуют о возрастающем распространении болезней, возбуждаемых патогенной микрофлорой. Одной из причин этой проблемы является приобретение микроорганизмами резистентности к существующим лекарственным препаратам (Pasberg-Gauhl C., 2014), что делает их малоэффективными, либо вызывает необходимость повышения дозы препарата. Все это обуславливает необходимость создания новых фармацевтических субстанций с широким спектром антимикробного действия.

В качестве действующего вещества новых лекарственных препаратов перспективно использовать олиго- и полимерные биоциды, которые обладают относительно низкой токсичностью и высокой эффективностью действия на микроорганизмы. Среди указанных биоцидов следует отметить полигуанидины – вещества, содержащие в своем составе гуанидиновые фрагменты (рис. 1).

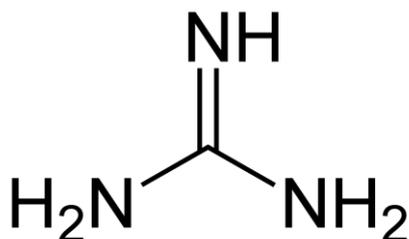


Рис.1. Структура гуанидинового фрагмента

Высокая эффективность действия полигуанидинов дает возможность предложить их использование в качестве фармацевтической субстанции, пригодной для создания различных готовых лекарственных форм на её основе.

Наиболее оптимально использовать существующее производство разветвленного ОГМГ гидрохлорида (ОГМГ-ГХ) (Кедик С.А., 2012), который обладает высокой эффективностью по отношению к широкому спектру патогенной микрофлоры и низкой токсичностью в отношении человека. Отметим, что серьезным препятствием для применения ОГМГ-ГХ и других полигуанидинов в качестве фармацевтической субстанции является недостаточно полный и точный контроль качества, осуществляющийся на производстве: он охватывает узкий перечень параметров, а аналитические методы не позволяют получать достоверных данных.

В связи с этим, разработка достоверных методов контроля качества разветвленного ОГМГ-ГХ по параметрам, регламентируемым нормативной документацией и необходимым для его применения в качестве фармацевтической субстанции, а также разработка методов для контроля препаратов на основе разветвленного ОГМГ-ГХ, является важной и актуальной задачей. Её решение позволит провести дальнейшие мероприятия по регистрации фармацевтической субстанции и созданных на ее основе эффективных препаратов для борьбы с инфекционными заболеваниями.

Степень разработанности темы. Вопросами изучения полиалкиленгуанидинов занималось большое количество исследователей. Гембицкий П.А., Воинцева И.И. внесли огромный вклад в развитие направления синтетических биоцидных полимеров, разрабатывая условия синтеза, изучая их свойства и находя различные сферы применения. В работах Абрикосовой Ю.Е. и Ха К.А. отражены исследования в области применения различных солей полигуанидинов в качестве фармацевтических субстанций, создания и стандартизации на их основе лекарственных форм. Однако полученные результаты так и не нашли практического применения, а разработанные методы контроля качества не учитывают ряд особенностей строения используемых веществ, что в свою очередь является залогом определенной погрешности.

В то же время, существует реализованное производство разветвленного ОГМГ-ГХ данное соединение по многим характеристикам превосходит ряд существующих солей полиалкиленгуанидинов, но не применяется в фармации и не имеет достоверных методов контроля.

Таким образом, актуальным является изучение, разработка и стандартизация методов контроля качества разветвленного ОГМГ-ГХ для использования данного соединения в качестве фармацевтической субстанции.

Цель и задачи исследования: Целью диссертационной работы является изучение, разработка и стандартизация методов контроля качества разветвленного ОГМГ-ГХ.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи:**

- выявить связи и закономерности между химической структурой (молекулярная масса и степень разветвления) и свойствами (показатель преломления, температура стеклования) ОГМГ-ГХ;
- предложить экспресс-метод оценки молекулярно-массовых характеристик олигомера по его температуре стеклования;
- разработать:
 - методику количественного определения основного действующего вещества в разветвленном ОГМГ-ГХ и провести ее валидацию;

- методику количественного определения мономерной примеси ГГХ в разветвленном ОГМГ-ГХ и провести ее валидацию;
- методику количественного определения мономерной примеси ГМДА в разветвленном ОГМГ-ГХ и провести ее валидацию;
- методику количественного определения разветвленного ОГМГ-ГХ в препаратах на его основе, провести ее испытания и валидацию с использованием многокомпонентных модельных смесей;
- предложить программно-аппаратный комплекс, позволяющий проводить количественное определение ОГМГ-ГХ в многокомпонентных препаратах на его основе;
- составить и апробировать нормативную документацию (проект НД) для субстанции.
- разработать технические условия для осуществления производства субстанции.

Научная новизна. Выявлены связи и закономерности между молекулярной структурой (молекулярная масса и степень разветвления) и свойствами (показатель преломления, температура стеклования) разветвленного ОГМГ-ГХ. Разработан новый экспресс-метод оценки молекулярно-массовых характеристик олигомера и методики определения содержания остаточных мономеров (гексаметилендиамина и гуанидингидрохлорида) в условиях их низких концентраций в субстанции и содержания основного вещества (разветвленного ОГМГ-ГХ) в субстанции. Разработано программное обеспечение, интегрированное в аналитический комплекс приборов, что позволяет проводить определение ОГМГ-ГХ в многокомпонентных препаратах на его основе.

Теоретическая и практическая значимость работы. Установлена корреляция между химической структурой и свойствами ОГМГ-ГХ. На основании проведенных исследований разработаны и внедрены:

- методы стандартизации субстанции «ДЕЗАПОЛ» (проект нормативной документации (НД) на субстанцию «ДЕЗАПОЛ», апробированный ЗАО «Институт фармацевтических технологий», 04.09.13; акт внедрения от 09.04.15; технические условия ТУ 9300-006-83188314-2013);
- аналитический комплекс приборов для определения ОГМГ-ГХ в многокомпонентных препаратах на его основе (заявка на патент на полезную модель, (регистрационный № 2015109857).

Основные положения и результаты диссертации внедрены в учебный процесс кафедры биомедицинских и фармацевтических технологий МИТХТ имени М.В. Ломоносова (акт внедрения от 25.05.15).

Методология и методы исследования. Методология диссертационного исследования построена на изучении и обобщении литературных данных по разработке и стандартизации методов контроля качества объекта исследования, оценке степени разработанности и актуальности темы. В процессе исследования использованы методы: ВЭЖХ-хроматография, УФ-спектрофотометрия, рефрактометрия, фотоколлориметрия, ЯМР-спектроскопия, дифференциальная сканирующая калориметрия, титриметрия. Данные исследований обработаны математическим методом (Microsoft Excel 2010).

Положения, выносимые на защиту:

- результаты экспериментальных исследований по выявлению связей и закономерностей между молекулярной структурой (молекулярная масса и степень разветвления) и свойствами (показатель преломления, температура стеклования) ОГМГ-ГХ, и разработанный на их основе экспресс-метод оценки молекулярно-массовых характеристик вещества;
- результаты экспериментальных исследований по разработке и валидации методики определения основного вещества в разветвленном ОГМГ-ГХ;
- результаты экспериментальных исследований по разработке и валидации методики определения мономерной примеси ГГХ в разветвленном ОГМГ-ГХ;
- результаты экспериментальных исследований по разработке и валидации методики определения мономерной примеси ГМДА в разветвленном ОГМГ-ГХ;
- результаты экспериментальных исследований по разработке и валидации методики определения разветвленного ОГМГ-ГХ в многокомпонентных лекарственных препаратах на его основе;
- результаты создания программного обеспечения, интегрированного в аналитический комплекс приборов, для определения разветвленного ОГМГ-ГХ в многокомпонентных лекарственных препаратах на его основе.

Степень достоверности результатов исследования. Достоверность полученных результатов определяется достаточным объёмом проведенных исследований, применяемыми современными, информативными методами исследования, статистической достоверностью полученных данных.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы доложены на I международной интернет-конференции «На стыке наук. Физико-химическая серия», (г. Казань, 2013), V молодежной научно-технической конференции «Наукоемкие химические технологии-2013» (г. Москва, 2013), III международной научно-практической конференции «Перспективы развития научных исследований в 21 веке» (г. Махачкала, 2013), Всероссийской научной

интернет-конференции с международным участием «Спектрометрические методы анализа» (г.Казань, 2013), международной научно-практической конференции «Биотехнология и качество жизни» (г. Москва, 2014), научно-практической конференции «Новые химико-фармацевтические технологии» (г. Москва, 2014), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации» (г. Санкт-Петербург, 2014).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 11 работ, из них 4 – в научных изданиях, входящих в перечень ВАК министерства образования и науки Российской Федерации.

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие в разработке и обсуждении основных идей диссертации, а также анализе экспериментальных результатов. Самостоятельно провел обзор и анализ литературы (в том числе, анализ требований нормативной документации, регламентирующей критерии, предъявляемые к разработке методов контроля качества фармацевтических субстанций), а также выполнил основной объем экспериментальных исследований, включая разработку чувствительных методик контроля качества фармацевтической субстанции на основе ОГМГ-ГХ. Диссертантом полностью выполнено оформление результатов диссертации в виде публикаций, научных докладов и рукописи диссертации.

Объём и структура диссертации. Диссертация изложена на 137 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (объекты и методы), обсуждения результатов исследований, выводов, списка литературы, а также приложений. Работа иллюстрирована 43 таблицами и 40 рисунками. Библиографический указатель включает 112 источников, из них 78 на иностранных языках.

Во введении изложены актуальность, цель и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость работы. Первая глава отражает информацию по основным классам веществ используемых длительное время в фармацевтике для борьбы с патогенной микрофлорой. В качестве перспективной субстанции обладающей широким спектром антимикробного действия предложен разветвленный ОГМГ-ГХ, обозначены проблемы связанные с его использованием. В главе 2 приведена характеристика объектов и методов исследования. Глава 3 отражает результаты позволившие: выявить взаимосвязи между структурой и свойствами разветвленного ОГМГ-ГХ, разработать методы определения примесей исходных мономеров и содержания основного вещества. В главе 4 приведены результаты разработки методов

контроля содержания разветвленного ОГМГ-ГХ во многокомпонентных препаратах на его основе.

В Приложение вынесены акты внедрения, проект НД «ДЕЗАПОЛ», протоколы валидации разработанных методов контроля, технические условия на сополимер гексаметилендиамина и гуанидин гидрохлорида «ДЕЗАПОЛ ГХ», уведомление о поступлении заявления о выдаче патента Российской Федерации, учебно-методическое пособие «Практикум по физико-химическим методам в биотехнологии».

Результаты, полученные при проведении исследований, обработаны статистически и представлены в таблицах, в формулах, на рисунках, которые приведены в тексте диссертации.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Объекты и методы исследования

В работе использовали разветвленный ОГМГ-ГХ производства ЗАО «Институт Фармацевтических Технологий» (Россия). При разработке методов контроля примесных соединений использовали гексаметилендиамин (ГМДА) и гуанидина гидрохлорид (ГГХ) (в качестве стандартов), 9-флуоренилметил хлорформиат (ФМОС) и *o*-фталевый альдегид (в качестве флуоресцентных меток), пентадецилсульфонат натрия и октодецилсульфонат натрия (в качестве ион-парных реагентов).

Бензалкония хлорид, лидокаина гидрохлорид и ментол - основные компоненты, использованные для приготовления моделей препаратов на основе разветвленного ОГМГ-ГХ, которые применялись на этапе разработки метода и установки определения разветвленного ОГМГ-ГХ.

Для определения температуры стеклования промышленных серий разветвленного ОГМГ-ГХ использовали метод ДСК. Эксперимент проводили на высокоточном дифференциальном сканирующем калориметре Netzsch DSC 204F1 Phoenix 240-12-0070-L (диапазон температур 20-300 °С, при постоянной скорости нагрева 10 К/мин).

Для анализа структурных характеристик используемых промышленных серий разветвленного ОГМГ-ГХ использовали метод ЯМР ¹³С. Эксперимент проводили на ЯМР-спектрометре Bruker DPX-300 при рабочей частоте на протонах не менее 200 МГц и температуре 30 °С в режиме Inverse Gate. Определяли степень разветвления и среднечисловую молекулярную массу.

Разработку и валидацию метода определения мономерных примесей (ГГХ и ГМДА) проводили с использованием хроматографа «Стайер» (Аквилон, Россия), с колонкой Luna C₁₈(2), 250×4,6 мм, 5 мкм. Для оценки возможности осуществления

прямого детектирования определяемых соединений применяли метод УФ-спектрофотометрии. Измерения проводились на спектрофотометре СФ-104 (толщина поглощающего слоя кюветы 1 см, диапазон длин волн: 190-540 нм) при 25°C.

При разработке метода определения основного вещества в разветвленном ОГМГ-ГХ предварительно проводили оценку возможности использования существующих методов контроля с помощью ВЭЖХ (на оборудовании, использованном при контроле примесей исходных мономеров) и фотоколориметрии, на фотоэлектроколориметре ФЭК 03-01 (толщина поглощающего слоя кюветы 5 см, рабочая длина волны 540 нм) с использованием красителя Эозин Н. Исследования по дальнейшей разработке и валидации осуществлялись методом рефрактометрии, по традиционной методике, с помощью рефрактометра УРЛ-1 с термостатируемым блоком призм при 25 °С.

На этапе разработки и валидации метода контроля низких концентраций разветвленного ОГМГ-ГХ в многокомпонентных препаратах на его основе в качестве анализируемых образцов использовались модельные смеси с содержанием ОГМГ-ГХ 1 мг/мл. Концентрацию вещества определяли через общее содержание азота в смеси с помощью метода Къельдаля, на приборе для сжигания Дигестор DKL 8 (VELP Scientifica) с набором колб для сжигания, с использованием прибора для перегонки: полуавтоматический дистиллятор UDK 139 (VELP Scientifica), титровальной бюреткой, автоматическим и весовым титратором-дозатором «Титрион-рН».

Валидацию разработанных методов контроля проводили по параметрам и критериям, приведенным в таблицах 1, 2.

2. Разработка методов контроля качества разветвленного ОГМГ-ГХ

2.1. Контроль молекулярно-массовых характеристик разветвленного ОГМГ-ГХ

Известно, что одним из свойств, чувствительных к измерению молекулярно-массовых характеристик аморфных олиго- и полимеров, является их температура стеклования (T_g), которую в ряде случаев можно определить быстрее и проще, чем оценивать молекулярную структуру методом ^{13}C ЯМР. Поэтому для нескольких серий опытных образцов ОГМГ-ГХ были проведены исследования, позволившие установить взаимосвязь T_g с молекулярной массой ОГМГ и количеством разветвлений, приходящихся на его молекулу (рис. 2).

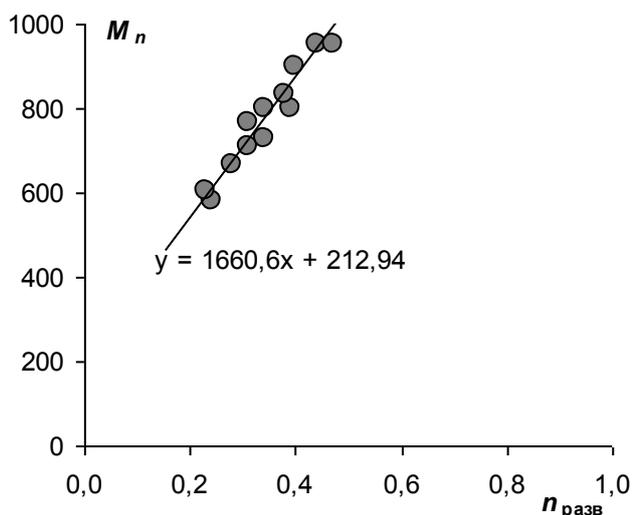


Рис. 2. Взаимосвязь между среднечисловой молекулярной массой и количеством разветвлений, приходящихся на одну молекулу ОГМГ, определенными методом ^{13}C ЯМР

Для проведения дальнейших исследований были выбраны пять промышленных серий разветвленного ОГМГ-ГХ с наиболее отличающимися структурными характеристиками. Для них методом ДСК определена температура стеклования (рис. 3).

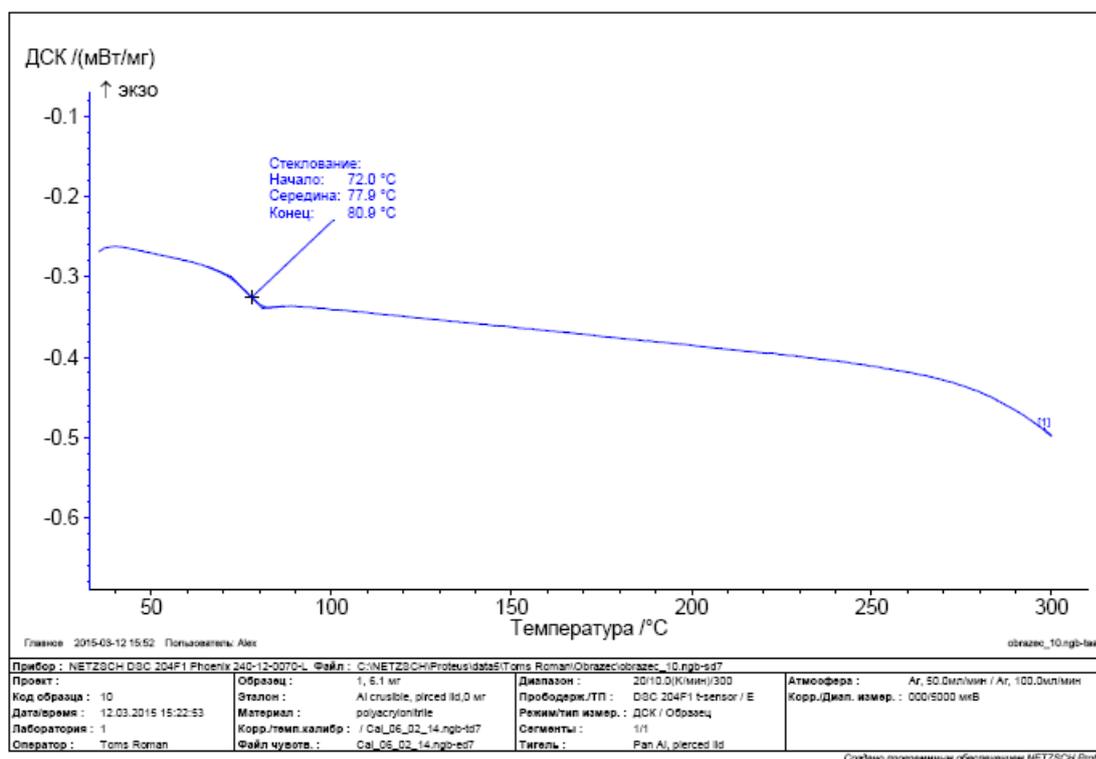


Рис. 3. Типичная ДСК-термограмма разветвленного ОГМГ-ГХ

Сопоставление молекулярных характеристик выбранных образцов ОГМГ-ГХ и определенной для них температуры стеклования показало, что между M_n и T_g существует определенная корреляция (рис. 4).

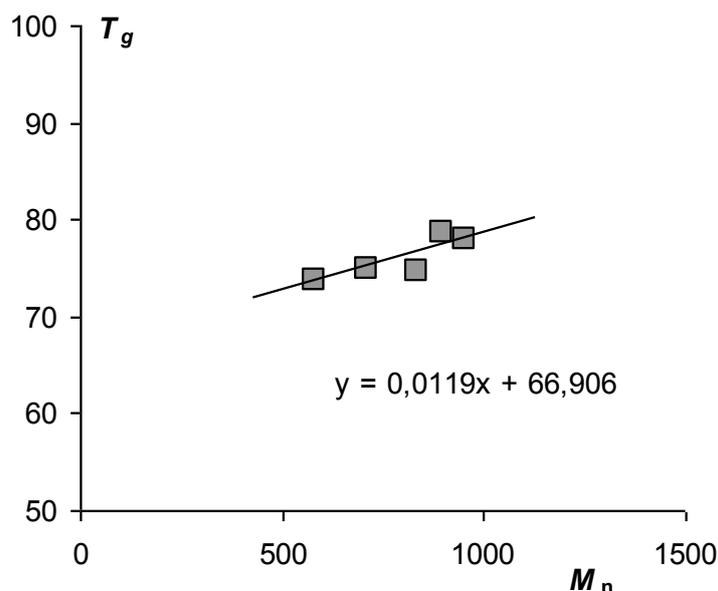


Рис. 4. Корреляция между среднечисловой молекулярной массой и температурой стеклования в промышленных образцах ОГМГ-ГХ

Исходя из полученных результатов, молекулярную массу ОГМГ можно выразить формулой 1, а среднее число разветвлений на молекулу ОГМГ формулой 2.

$$M_n = \frac{T_g - 66.91}{0.0119} \quad (1)$$

$$n_{разв} = \frac{T_g - 69.44}{19.76} \quad (2)$$

Для ОГМГ с $M_n \leq 800$ Да ошибка определения обоих параметров не превышает 5%.

Таким образом, по значениям температуры стеклования ОГМГ-ГХ можно оценить их молекулярные характеристики: среднечисловую молекулярную массу и степень разветвления. Это быстрее, аппаратно доступнее и дешевле по сравнению с методом ЯМР ^{13}C спектроскопии.

2.2. Разработка и валидация метода контроля мономерной примеси ГМДА в разветвленном ОГМГ-ГХ

2.2.1. Разработка метода контроля мономерной примеси ГМДА в разветвленном ОГМГ-ГХ

Предварительно был зарегистрирован УФ-спектр водного раствора стандарта вещества с концентрацией, соответствующей предельному значению содержания вещества в ОГМГ-ГХ (0,3 %). Отсутствие поглощения на нем свидетельствует о невозможности прямого детектирования примеси ГМДА в анализируемом веществе. Поэтому было принято решение использовать ВЭЖХ-метод с модификацией искомого продукта с помощью оптической метки.

Для детектирования низких концентраций определяемого вещества при помощи УФ-детектора необходимо использование дериватизирующего агента. Из набора доступных дериватизаторов были выбраны *o*-фталевый альдегид и FMOC. Показано, что применение *o*-фталевого альдегида нецелесообразно из-за нестабильности образующегося комплекса. Поэтому были проведены эксперименты с использованием в качестве дериватизирующего агента FMOC. ВЭЖХ-хроматограммы свежеприготовленной пробы с FMOC и ее повторный анализ через 1 час (рис. 5). Хроматограммы свидетельствуют об идентичности отклика анализируемого вещества при первоначальном и повторном (через 1 час) анализе пробы: площади пика ГМДА равны 250,32 в обоих случаях. Таким образом, обеспечивается воспроизводимость количественного определения ГМДА на протяжении длительного времени.

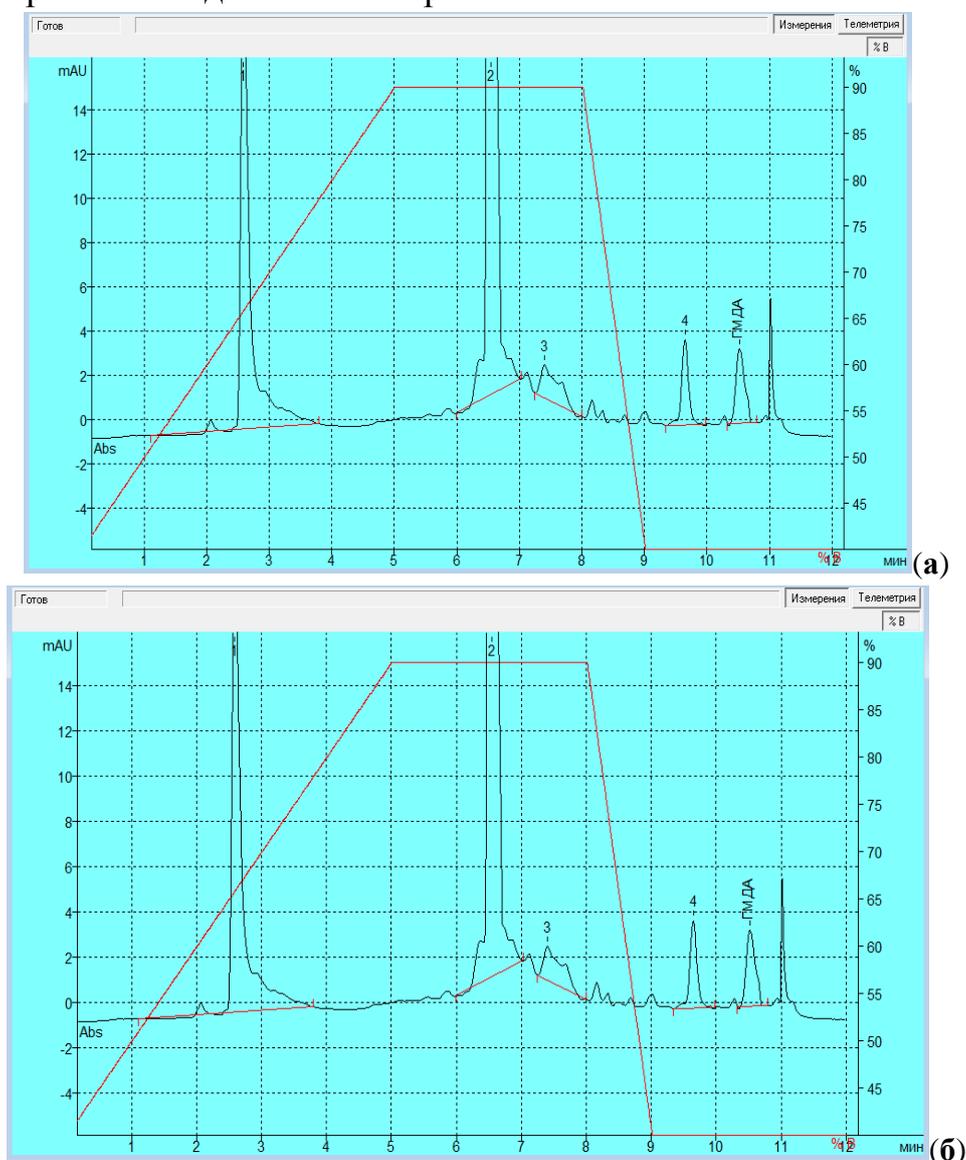


Рис. 5. ВЭЖХ-хроматограммы свежеприготовленного (а) раствора ГМДА в присутствии FMOC и этого же раствора через 1 час (б).

2.2.2. Валидация метода контроля мономерной примеси ГМДА в разветвленном ОГМГ-ГХ

Валидацию разработанного метода проводили по параметрам и критериям, указанным в табл. 1. Результаты, приведенные в табл. 1, полностью удовлетворяют предъявленным критериям приемлемости, что подтверждает валидацию методики контроля содержания мономерной примеси ГМДА в разветвленном ОГМГ-ГХ.

Таблица 1.

Результаты валидации разработанных методов контроля мономерных примесей ГМДА и ГГХ в разветвленном ОГМГ-ГХ

Параметр валидации		Критерии приемлемости	Результаты		
			ГМДА	ГГХ	
Специфичность		Должны отсутствовать пики, мешающие определению, в том числе, пик растворителя.	ГМДА имеет четкий пик в области времени удерживания 14,0-15,0 минут, который не перекрывается с пиками, других компонентов. Пик растворителя в этой области времен отсутствует.	ГГХ имеет четкий пик в области времени удерживания 4,0-4,5 минут, который не перекрывается с пиками, других компонентов. Пик растворителя в этой области времен отсутствует.	
Диапазон применения	Линейность	Коэффициент корреляции $\geq 0,990$	1,0	0,9998	
	Правильность	Фактор отклика: среднее значение 97,5-102,5%	100,14	100,2	
		Относительное стандартное отклонение $\leq 5,0\%$	0,17	0,35	
		доверительный интервал должен включать 100%	100,00-100,30	99,95-100,49	
	Прецизионность	по параметру <i>сходимость</i>	<i>Серия 1</i> : относительное стандартное отклонение $\leq 4,0\%$ (количество измерений $n \geq 6$)	0,449	2,91
		по параметру <i>промежуточная прецизионность</i>	<i>Серия 2</i> : относительное стандартное отклонение $\leq 4,0\%$ (количество измерений $n \geq 6$) C15	0,884	2,47
			критерий Фишера $F \leq F_{\text{табл.}}(5,05\%)$	3,93	1,37
Предел количественного определения		$\leq 1,560$ мкг/мл для ГМДА $\leq 70,0$ мкг/мл для ГГХ	0,056	14,97	

2.3. Разработка и валидация метода контроля мономерной примеси ГГХ в разветвленном ОГМГ-ГХ

2.3.1. Разработка метода контроля мономерной примеси ГГХ в разветвленном ОГМГ-ГХ

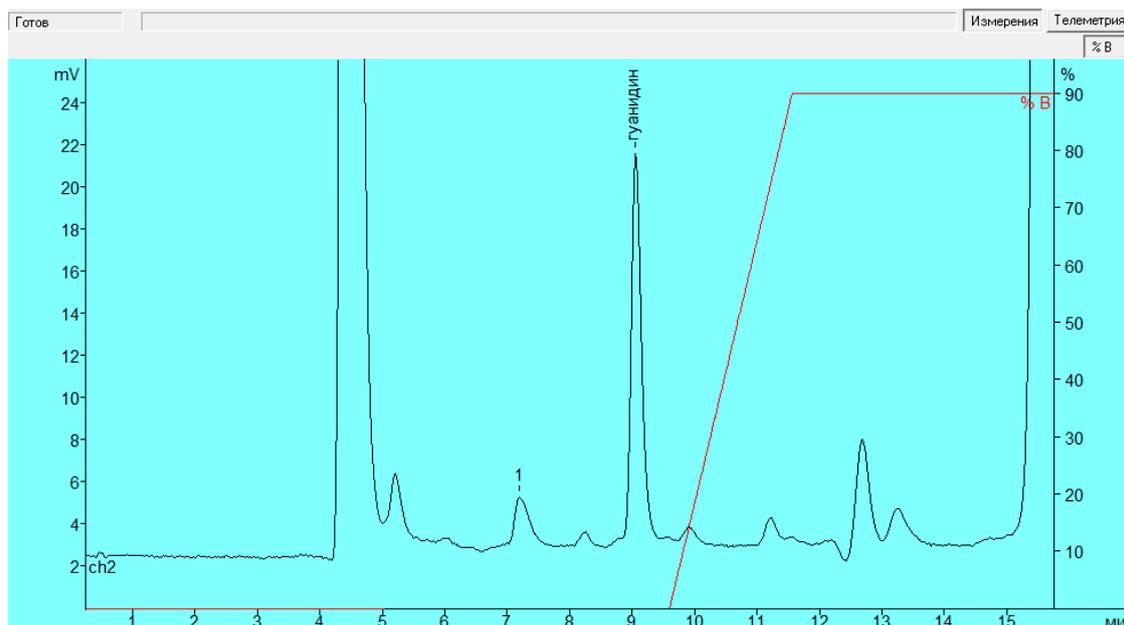
Предварительно полученный УФ-спектр водного раствора стандарта вещества (ГГХ) свидетельствует, о том что максимум поглощения у раствора с концентрацией 17,5 мкг/мл наблюдается при длине волны 195 нм. Это означает возможность прямого детектирования анализируемого вещества. Наиболее оптимально проводить анализ ГГХ в разветвленном ОГМГ-ГХ на том же оборудовании, которое применяется для разработанного ранее метода определения ГМДА, исходя из чего, использовали ВЭЖХ.

Так как определяемое вещество в нормальной и кислой среде находится в ионной форме, которая обуславливает нестабильное состояние ГГХ во время проведения ВЭЖХ анализа, при разработке метода использовался ион-парный реагент. Он переводит анализируемое вещество в гидрофобный комплекс, который является более стабильным. Данное решение позволит обеспечить приемлемую воспроизводимость разрабатываемого метода. В связи с этим были проведены эксперименты с использованием в качестве ион-парных реагентов пентадецилсульфоната натрия и октодецилсульфоната натрия. Оказалось, что при использовании пентадецилсульфоната натрия время выхода пика ГГХ меньше, по сравнению с октодецилсульфонатом натрия (рис. б). Также в пользу выбора пентадецилсульфоната натрия свидетельствует то, что его углеводородная цепь и молекулярная масса меньше, чем у октодецилсульфоната натрия. Это обеспечит более быструю и полную регенерацию хроматографической колонки от ион-парного реагента.

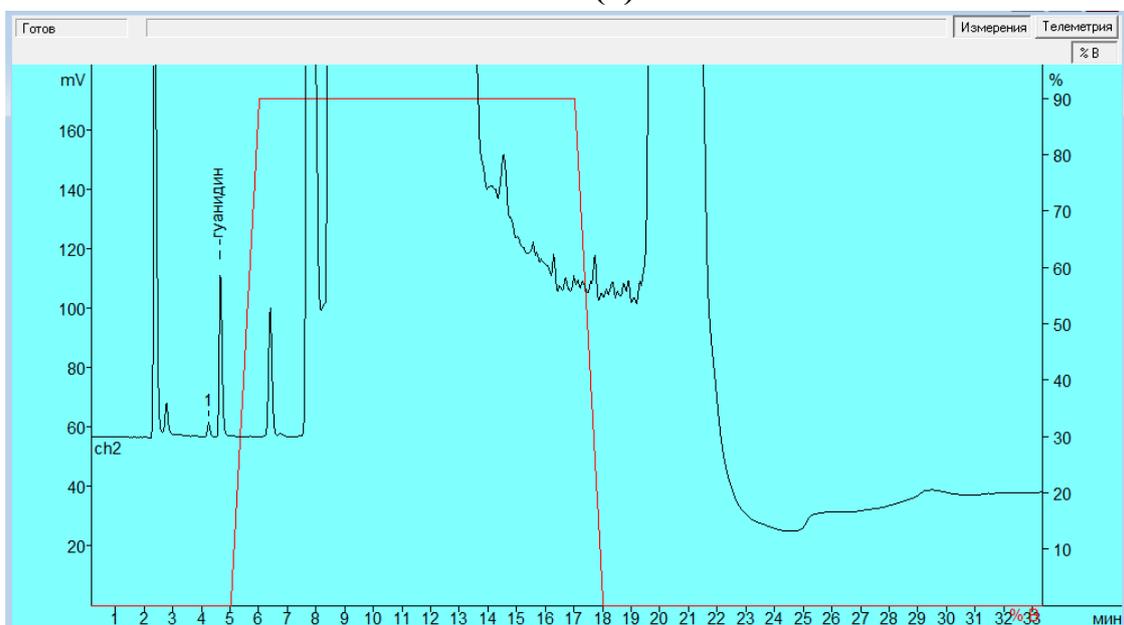
В техническом отношении разработанный метод позволяет проводить анализ на оборудовании и условиях, которые используются при определении примеси ГМДА, что обеспечивает удобство воспроизведения методов контроля.

2.3.2. Валидация метода контроля мономерной примеси ГГХ в разветвленном ОГМГ-ГХ

Валидацию разработанного метода проводили по параметрам и критериям, указанным в табл. 1 Результаты, приведенные в табл. 1, полностью удовлетворяют предъявленным критериям приемлемости, что подтверждает валидацию методики контроля содержания мономерной примеси ГГХ в разветвленном ОГМГ-ГХ.



(а)



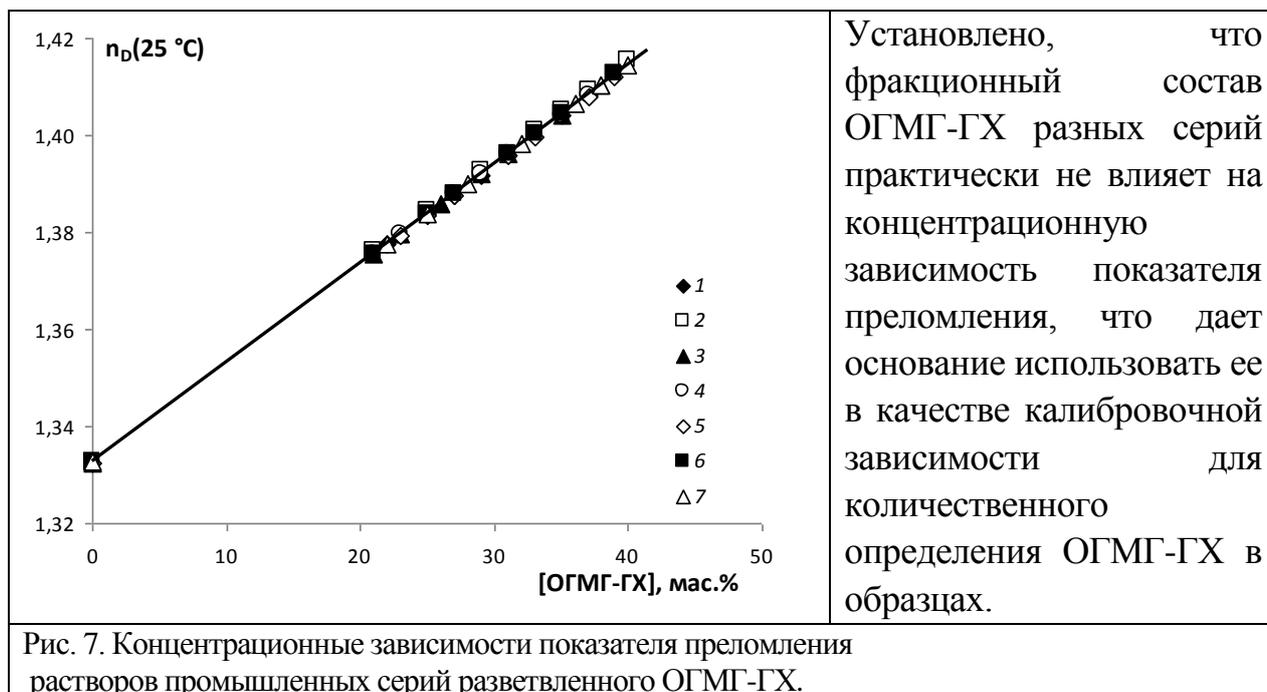
(б)

Рис. 6. ВЭЖХ-хроматограммы раствора ГГХ с использованием октодецилсульфоната натрия (а) и пентадецилсульфоната натрия (б)

2.4. Разработка и валидация метода определения основного вещества в разветвленном ОГМГ-ГХ

2.4.1. Разработка метода определения основного вещества в разветвленном ОГМГ-ГХ

В качестве метода контроля предложено использовать рефрактометрическое определение содержания разветвленного ОГМГ-ГХ. Экспериментально определены зависимости показателя преломления растворов ряда промышленных серий ОГМГ-ГХ от их концентрации (рис. 7).



В соответствии с полученной калибровочной прямой, содержание основного вещества (Р) в образцах ОГМГ-ГХ следует определять по формуле 3.

$$P = \frac{(n_D^{25} - n_{D0}^{25}) \cdot m}{F \cdot a} \quad (3)$$

где n_D^{25} – показатель преломления анализируемого раствора при 25 °С;

n_{D0}^{25} – показатель преломления дистиллированной воды при 25 °С; m – масса раствора, г;

a – масса анализируемого образца, г;

F – инкремент показателя преломления раствора ОГМГ-ГХ при увеличении концентрации на 1%. Для ОГМГ-ГХ $F=0,00205$.

2.4.2. Валидация метода определения основного вещества в фармацевтической субстанции ОГМГ-ГХ

Валидацию разработанного метода проводили по параметрам и критериям, указанным в табл. 2. Результаты, приведенные в табл. 2, полностью удовлетворяют предъявленным критериям приемлемости, что подтверждает валидацию методики контроля содержания основного вещества в разветвленном ОГМГ-ГХ.

Результаты валидации разработанных методов количественного определения разветвленного ОГМГ-ГХ

Параметр валидации		Критерии приемлемости	Результаты		
			1*	2**	3***
Специфичность		Интенсивность сигналов спектра ЯМР ¹³ C испытуемого образца должна соответствовать интенсивности сигналов типичного спектра ЯМР ¹³ C разветвленного ОГМГ-ГХ	Интенсивность сигналов спектра ЯМР ¹³ C испытуемого образца совпадает с интенсивностью сигналов типичного спектра ЯМР ¹³ C разветвленного ОГМГ-ГХ		—
Линейность		Коэффициент корреляции $\geq 0,990$	0,9996	0,995	—
Правильность		Фактор отклика: среднее значение 97,5-102,5%	101,2	101,2	100,04
		Относительное стандартное отклонение $\leq 5,0\%$	3,2	1,43	1,88
		Доверительный интервал должен включать 100% значение	99,2-103,3	100,0-102,2	100,0-100,1
Прецизионность	по параметру сходимости	<i>Серия 1:</i> относительное стандартное отклонение $\leq 4,0\%$ (количество измерений $n \geq 6$)	0,53	0,77	0,05
	по параметру промежуточной прецизионности	<i>Серия 2:</i> относительное стандартное отклонение $\leq 4,0\%$ (количество измерений $n \geq 6$)	0,61	0,55	0,06
		критерий Фишера $F \leq F_{\text{табл.}}(5,05\%)$	0,75	1,78	1,61

*- метод определения содержания основного вещества в разветвленном ОГМГ-ГХ

** - метод определения содержания разветвленного ОГМГ-ГХ

***- метод определения низких концентраций разветвленного ОГМГ-ГХ, в многокомпонентных препаратах, на его основе

3. Разработка метода и установки определения разветвленного ОГМГ-ГХ в многокомпонентных препаратах на его основе

3.1. Разработка и валидация метода определения низких концентраций разветвленного ОГМГ-ГХ

Проведена экспериментальная работа по адаптации метода Кьельдаля для количественного определения сравнительно низких концентраций разветвленного ОГМГ-ГХ (1мг/мл). Установлено, что на стадии титрования оптимально использовать автоматический весовой титратор-дозатор «Титрион-рН», который обеспечивает шаг дозирования титранта (10 мкл) меньше, чем для бюретки (50 мкл). Применение в качестве сенсора стеклянного электрода исключает субъективный фактор индивидуальных особенностей цветовосприятия.

В качестве моделей препаратов на основе разветвленного ОГМГ-ГХ использовали составы, приведенные в табл. 3.

Таблица 3

Составы модельных смесей

№ п/п	Вещество	Концентрация азотсодержащего соединения в смеси, мг/мл	Молекулярная масса азотсодержащего соединения, г/моль	Молекулярная масса атомов N, г/моль
<i>Состав 1</i>				
1	Разветвленный ОГМГ-ГХ	1	177	42,0
<i>Состав 2</i>				
1	Разветвленный ОГМГ-ГХ	1	177	42,0
2	Бензalconия хлорид	0,5	357	14,0
Вспомогательные вещества: ФБР, вода				
<i>Состав 3</i>				
1	Разветвленный ОГМГ-ГХ	1	177	42,0
2	Бензalconия хлорид	0,5	357	14,0
3	Лидокаина гидрохлорид	1,5	228,8	28,0
Вспомогательные вещества: ментол, глицерин, этанол, вода				



Рис. 8. Кривая титрования *Состав № 1* (интерфейс прибора)

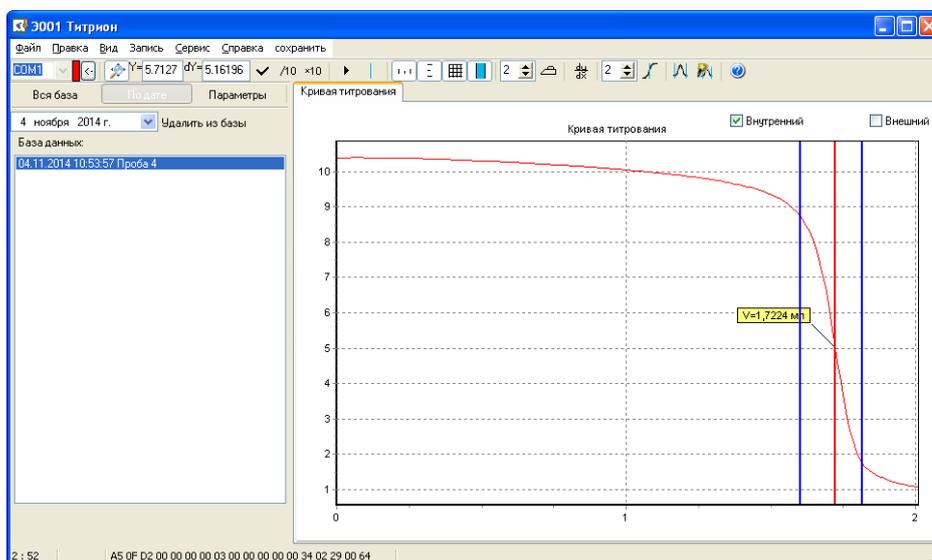


Рис. 9. Кривая титрования *Состав № 1* (при синхронизации с ПК)

После подбора оптимального шага дозирования титранта при анализе *Состава №1* были зарегистрированы кривые титрования, кривые отображались как на самом приборе (рис. 8), так и при последующей обработке полученных данных при синхронизации прибора с ПК (рис. 9).

Полученные данные наглядно характеризуют точку перегиба волнообразного участка кривой титрования (pH=5,4), которая является точкой эквивалентности и позволяет точно фиксировать объем титранта.

Валидацию метода контроля низких концентраций разветвленного ОГМГ-ГХ проводили с использованием в качестве анализируемого образца *Состав №1*, по параметрам и критериям, указанным в табл. 2. Результаты, приведенные в табл. 2, полностью удовлетворяют предъявленным критериям приемлемости, что подтверждает валидацию методики.

3.2. Разработка установки определения разветвленного ОГМГ-ГХ во многокомпонентных препаратах на его основе

Предложенный выше метод определения актуален, если в препарате кроме ОГМГ-ГХ не присутствует других азотсодержащих органических веществ. Для осуществления анализа многокомпонентных препаратов с несколькими азотсодержащими соединениями необходимо ввести поправку с учетом их концентраций, определенных ранее другими специфическими методами. Так как при воспроизведении метода Кьельдаля (из результатов титрования) мы получаем суммарное количество азота, содержащееся в анализируемом образце, а при наличии других азотсодержащих компонентов необходимо учитывать вклад каждого из них, для определения количества азота, приходящегося именно на долю ОГМГ-ГХ, предлагается использование формулы 4.

$$C = (W - (\sum_{i=1}^n \frac{14 \cdot z_i}{Mr_i} \cdot c_i)) \cdot K \quad (4)$$

где K – коэффициент пересчета для ОГМГ-ГХ; W – общее количество азота в мг/мл; 14 – молекулярная масса азота, г/моль; z_i – количество атомов азота в молекуле азотсодержащего компонента препарата; c_i – концентрация азотсодержащего компонента препарата, мг/мл; Mr_i – молекулярная масса молекулы азотсодержащего компонента препарата, г/моль

Разработанная методика расчета содержания ОГМГ-ГХ была интегрирована в виде программного обеспечения автоматического весового титратора-дозатора «Титрион-pH». Алгоритм работы установки при определении концентрации разветвленного ОГМГ-ГХ в модельной смеси *Состав №3* показан на рис. 10.

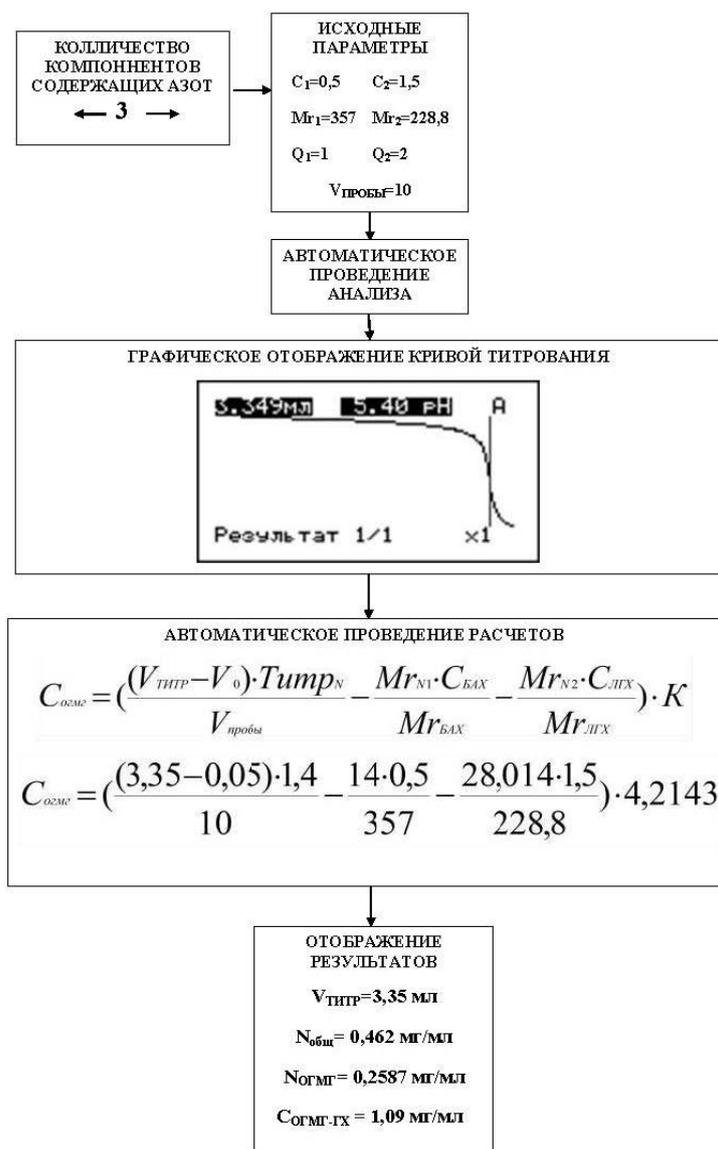


Рис. 10. Алгоритм работы установки для титрования «Титрион-рН» при определении разветвленного ОГМГ-ГХ

Для проверки адекватности результатов, получаемых при анализе препаратов, в состав которых входит несколько азотсодержащих веществ, была проверена валидация по параметрам правильность и прецизионность с использованием в качестве анализируемых образцов *Состав 2* и *Состав 3*, результаты приведены в табл.2.

Полученные данные свидетельствуют, о том что разработанный аналитический комплекс позволит проводить контроль достаточно низких концентраций разветвленного ОГМГ-ГХ в многокомпонентных препаратах на его основе с достаточной степенью точности и прецизионности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итоги выполненного исследования (выводы)

1. Проведенная работа позволила выявить связи и закономерности между молекулярной структурой (молекулярная масса и степень разветвления) и

свойствами (показатель преломления, температура стеклования) разветвленного ОГМГ-ГХ.

2. Предложен экспресс-метод оценки молекулярно-массовых характеристик (молекулярная масса и степень разветвления) олигомера по его температуре стеклования.

3. Разработан метод количественного определения основного вещества в разветвленном ОГМГ-ГХ и проведена его валидация, полученные экспериментальные значения удовлетворяют критериям приемлемости.

4. Предложены ВЭЖХ-методики количественного определения мономерных примесей ГГХ и ГМДА в разветвленном ОГМГ-ГХ и проведена их валидация; полученные экспериментальные значения удовлетворяют критериям приемлемости. Установлено, что пределы количественного определения составляют 1,560 мкг/мл и 70,0 мкг/мл для ГГХ и ГМДА соответственно.

6. Обоснована методика количественного определения низких концентраций разветвленного ОГМГ-ГХ, проведены ее испытания и валидация с использованием многокомпонентных модельных смесей, полученные экспериментальные значения удовлетворяют критериям приемлемости.

4. Предложен программно-аппаратный комплекс, позволяющий проводить количественное определение низких концентраций ОГМГ-ГХ в многокомпонентных препаратах на его основе, подана заявка на патент на полезную модель (регистрационный № 2015109857).

5. Составлена и апробирована нормативная документация (проект НД) для лекарственной субстанции «Дезапол» (разветвленный ОГМГ-ГХ).

6. Разработаны и зарегистрированы технические условия для осуществления производства субстанции (ТУ 9300-006-83188314-2013).

Практические рекомендации

Результаты диссертационной работы позволяют зарегистрировать разветвленный ОГМГ-ГХ в качестве фармацевтической субстанции на территории Российской Федерации, а так же проводить достаточно точный и достоверный контроль качества указанного вещества.

Перспективы дальнейшей разработки темы диссертационного исследования имеют важное научно-практическое значение для фармацевтической химии с целью дальнейшей разработки на основе разветвленного ОГМГ-ГХ новых эффективных фармацевтических препаратов, а также разработки отвечающих современным требованиям методов их стандартизации с применением новых методик анализа и приборной базы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Кедик, С.А. Разработка и валидация метода контроля мономерной примеси гидрохлорида гуанидина в фармацевтической субстанции «разветвленный гидрохлорид олигогексаметиленгуанидина» / С.А. Кедик, Д.О. Шаталов, С.Г. Бексаев, И.П. Седишев, Е.С. Жаворонок, В.В. Суслов, А.В. Панов // **Вестник МИТХТ.** – 2014. - Т.9, №2. - С. 32-36.

2. Кедик, С.А. Методика количественного определения основного действующего вещества в фармацевтической биоцидной субстанции «разветвленный олигогексаметиленгуанидин гидрохлорид» / С.А. Кедик, Д.О. Шаталов, Д.В. Еремин, А.В. Панов, В.В. Суслов, И.П. Седишев, Е.С. Жаворонок // **Биофармацевтический журнал.** – 2014. - Т.6, №4. - С. 31-36.

3. Шаталов, Д.О. Разработка и валидация метода контроля «разветвленного олигогексаметиленгуанидин гидрохлорида» в глазных каплях на его основе / Д.О. Шаталов, С.А. Кедик, А.В. Панов, И.П. Седишев, В.В. Суслов, Ю.А. Котова, Д.В. Александрова, И.С. Иванов // **Бутлеровские сообщения.** - 2014. - Т.38, №4. - С. 53-57

4. Кедик, С.А. Разработка и валидация метода контроля мономерной примеси гексаметилендиамина в разветвленном гидрохлориде олигогексаметиленгуанидина / С.А. Кедик, Д.О. Шаталов, С.Г. Бексаев, И.П. Седишев, Е.С. Жаворонок, В.В. Суслов, А.В. Панов, Нгуен Тхи Тхань Там // **Заводская лаборатория. Диагностика материалов.** – 2014. - № 9 (80). - С. 22-26.

5. Кедик, С.А. Альтернативный метод определения разветвленного олигогексаметиленгуанидин гидрохлорида. / С.А. Кедик, Д.О. Шаталов, Д.В. Еремин, И.П. Седишев, В.В. Суслов, А.В. Панов // «Научно-технические технологии-2013». Тезисы докладов V молодежной научно-технической конференции. - Москва, 2013. – С. 54.

6. Кедик, С.А. Разработка метода количественного определения содержания гексаметилендиамина в полигексаметиленгуанидин гидрохлориде. / С.А. Кедик, Д.О. Шаталов, А.В.Панов, В.В.Суслов, Ха Кам Ань, И.П.Седишев, С.Г.Бексаев // «На стыке наук. Физико-химическая серия». Материалы I международной интернет-конференции. - Казань, 2013. - С.143-144.

7. Кедик, С.А. Разработка перспективных фармацевтических препаратов для предупреждения и лечения венерических и лор-заболеваний / С.А. Кедик, Д.О. Шаталов, И.П. Седишев, А.В. Панов, В.В. Суслов, Д.В. Александрова // «Перспективы развития научных исследований в 21 веке». Сборник материалов III международной научно-практической конференции. - Махачкала, 2013. – С. 198-201.

8. Кедик, С.А. Альтернатива спектрофотометрической методике определения основного действующего вещества в биоцидной фармацевтической субстанции разветвленном олигогексаметиленгуанидин гидрохлориде / С.А. Кедик, Д.О. Шаталов, Д.В. Еремин, И.П. Седишев, В.В. Суслов, А.В. Панов // «Спектрометрические методы анализа». Материалы всероссийской научной интернет-конференции с международным участием. - Казань, 2013. – С. 40-42.

9. Кедик, С.А. Новое биоцидное средство — разветвлённый олигогексаметиленгуанидин. / С.А.Кедик, Панов А.В., Шаталов Д.О., И.П. Седишев, В.В. Суслов // Материалы международной научно-практической конференции «Биотехнология и качество жизни». - РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2014. – С. 495-496

10. Кедик, С.А. Разработка лекарственных препаратов на основе «разветвленного олигогексаметиленгуанидин гидрохлорида» и методов его контроля. / С.А. Кедик, Д.О. Шаталов, А.В. Панов, И.П. Седишев, В.В. Суслов, Ю.А. Котова, Д.В. Александрова, И.С. Иванов // «Новые химико-фармацевтические технологии». Сборник тезисов под общей редакцией Г.В. Авраменко, А.Е. Коваленко. РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2014 – С. 129-131

11. Шаталов, Д.О. Разработка способа получения разветвленного олигогексаметиленгуанидин гидрохлорида, для использования в качестве фармацевтической субстанции / Д.О. Шаталов, С.А. Кедик, А.В. Панов, И.П. Седишев, И.С. Иванов, О.Е. С.В. Сиситкина, Беляков // «Инновации в здоровье нации». Сборник материалов II всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – СПб.: Изд-во СПХФА, 2014. – С. 664-668.

