

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ТОНКИХ ХИМИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА»
МИНИСТЕРСТВА ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ШАТАЛОВ ДЕНИС ОЛЕГОВИЧ

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

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата фармацевтических наук

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ
доктор технических наук,
профессор С.А. Кедик

Москва - 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	12
ГЛАВА 1. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РАЗВЕТВЛЕННОГО ОЛИГОГЕКСАМЕТИЛЕНГУАНИДИН ГИДРОХЛОРИДА В КАЧЕСТВЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ (обзор литературы)	12
1.1. Перспективы использования разветвленного ОГМГ-ГХ в качестве фармацевтической субстанции	12
1.1.1. Применение синтетических антимикробных веществ в качестве фармацевтических субстанций	12
1.1.2. Разветвленный ОГМГ-ГХ – соединение ряда катионных полиэлектролитов	17
1.2. Особенности проведения валидации разрабатываемых аналитических методов контроля качества	29
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	33
2.1. Объекты исследования	33
2.2. Методы исследования	39
2.2.1. ЯМР-13С спектроскопия	40
2.2.2. Дифференциальная сканирующая калориметрия	42
2.2.3. Фотоколориметрия	43
2.2.4. УФ-спектрофотометрия	43
2.2.5. Высокоэффективная жидкостная хроматография	43
2.2.5.1. Определение примеси ГМДА в разветвленном ОГМГ-ГХ методом ВЭЖХ и подходы к проведению ее валидации	44
2.2.5.2. ВЭЖХ методика определения примеси ГТХ в разветвленном ОГМГ-ГХ и подходы к проведению ее валидации	50
2.2.6. Рефрактометрия	56
2.2.7. Определение общего содержания азота методом Кьельдаля	60
2.2.7.1. Разработка и валидация метода определения низких концентраций ОГМГ-ГХ	60
2.2.7.2. Разработка программно-аппаратного комплекса для определения разветвленного ОГМГ-ГХ в многокомпонентных препаратах на его основе	64
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА РАЗВЕТВЛЕННОГО ОГМГ-ГХ	66
3.1. Контроль молекулярно-массовых характеристик разветвленного ОГМГ-ГХ	66
3.2. Разработка и валидация метода контроля мономерной примеси ГМДА в разветвленном ОГМГ-ГХ	70
3.2.1. Разработка метода контроля мономерной примеси ГМДА в разветвленном ОГМГ-ГХ	70
3.2.2. Валидация метода контроля мономерной примеси ГМДА в разветвленном ОГМГ-ГХ	73

3.3. Разработка и валидация метода контроля мономерной примеси ГГХ в разветвленном ОГМГ-ГХ	79
3.3.1. Разработка метода контроля мономерной примеси ГГХ в разветвленном ОГМГ-ГХ	79
3.3.2. Валидация метода контроля мономерной примеси ГГХ в разветвленном ОГМГ-ГХ	81
3.4. Разработка и валидация метода определения основного вещества в разветвленном ОГМГ-ГХ	87
3.4.1. Разработка метода определения основного вещества в разветвленном ОГМГ-ГХ	87
3.4.2. Валидация метода определения основного вещества в фармацевтической субстанции ОГМГ-ГХ	92
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДА И УСТАНОВКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАЗВЕТВЛЕННОГО ОГМГ-ГХ В МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ПРЕПАРАТАХ НА ЕГО ОСНОВЕ	98
4.1. Разработка и валидация метода определения низких концентраций разветвленного ОГМГ-ГХ	99
4.2. Разработка установки определения разветвленного ОГМГ-ГХ в многокомпонентных препаратах на его основе	105
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	111
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	113
БИБЛИГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	115
ПРИЛОЖЕНИЯ	126
Приложение 1. Акт внедрения МИТХТ им. М.В. Ломоносова	126
Приложение 2. Акт внедрения ЗАО «ИФТ»	128
Приложение 3. Учебно-методическое пособие	129
Приложение 4. Уведомление о поступлении заявки на Патент РФ	130
Приложение 5. Проект НД на субстанцию	131
Приложение 6. Протоколы валидации	134
Приложение 7. Технические условия	137

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы.

Инфекционные болезни – одна из самых распространенных групп заболеваний человека в настоящее время [23]. 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, регистрируются эпидемии [108].

В настоящее время официальная статистика в России регистрирует лишь 47 инфекционных заболеваний, хотя только в последние 2-3 десятилетия описано более 20 ранее неизвестных инфекционных болезней. Многие из этих заболеваний представляют высокую эпидемическую опасность и характеризуются высокой летальностью – например, болезнь легионеров [102], геморрагические лихорадки (Эбола, Марбург, Венесуэльская, хантавирусный легочный синдром [38], при котором каждый второй заболевший погибает от некардиогенной легочной недостаточности или шока) [23]. С другой стороны, и заболеваемость «обычными» инфекционными патологиями имеет тенденцию к росту: так, по данным портала Федеральной службы государственной статистики [102], на территории Российской Федерации в январе-октябре 2014г., по сравнению с соответствующим периодом 2013г., эпидемиологическая обстановка характеризовалась ростом заболеваемости населения по ряду инфекционных заболеваний.

Указанные факты свидетельствуют о возрастающем распространении болезней, возбуждаемых патогенной микрофлорой. Одной из причин этой проблемы является приобретение микроорганизмами резистентности к существующим лекарственным препаратам [79], что делает их малоэффективными, либо

вызывает необходимость повышения дозы препарата. Последнее обстоятельство сопряжено с ростом токсичности и повышенной вероятностью появления побочных эффектов. Все это обуславливает необходимость создания новых эффективных фармацевтических субстанций с широким спектром антимикробного действия, с целью разработки на их основе эффективных лекарственных препаратов, к которым патогенная микрофлора не выработала резистентность.

В качестве действующего вещества новых лекарственных препаратов, перспективно использовать олиго- и полимерные биоциды, которые обладают относительно низкой токсичностью и высокой эффективностью действия на микроорганизмы [14,17,30,73,111,112]. Среди указанных биоцидов следует отметить полигуанидины – вещества, содержащие в своем составе гуанидиновые фрагменты:

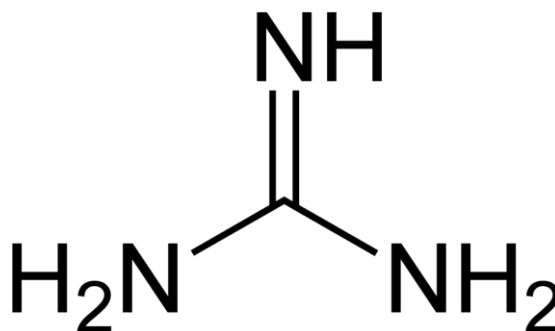


Рис. 1 - структура гуанидинового фрагмента

На основе этих соединений изготавливают дезинфицирующие средства различного назначения [14], в том числе дезинфицирующие салфетки [17], моющие растворы, покрытия с пролонгированными дезинфицирующими свойствами и т.п., которые используются в специализированных областях медицины, в том числе для дезинфекции помещений и воздуха, стерилизации медицинского оборудования и др.

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

Ха Кам Ань [34] проведена достаточно большая исследовательская работа по использованию в качестве фармацевтической субстанции гидросукцината ОГМГ, но результаты данной работы не нашли практической реализации ввиду высокой себестоимости конечного продукта и отсутствия реализованной промышленной базы производства. Наиболее оптимально использовать существующее производство разветвленного олигогексаметиленгуанидин гидрохлорида (ОГМГ-ГХ) [21], который обладает высокой эффективностью по отношению к широкому спектру патогенной микрофлоры и низкой токсичностью в отношении человека. 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 существующие методы его анализа не позволяют получать достоверные данные.

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.

Исходя из этого, разработка достоверных методов контроля качества разветвленного ОГМГ-ГХ по параметрам, регламентируемым нормативной документацией [19] 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.

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 оли-

гомера 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, фотоколориметрия, ЯМР-спектроскопия, дифференциальная сканирующая калориметрия, титриметрия. Данные исследований обработаны математическим методом (Microsoft Excel 2010).

Связь задач исследования с планом научноисследовательских работ. Диссертационная работа выполнена в рамках НИР кафедры Биомедицинских и

фармацевтических технологий Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова» (НИР 2Б-18-357).

Диссертация соответствует паспорту специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 1, 2 и 3 паспорта специальности «Фармацевтическая химия, фармакогнозия».

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 объемом 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 10 работ, из них 4 – в научных изданиях, входящих в перечень ВАК.

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие в разработке и обсуждении основных идей диссертации, построении и проведении экспериментальных исследований, а также анализе полученных 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.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 1. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РАЗВЕТВЛЕННОГО ОЛИГОГЕКСАМЕТИЛЕНГУАНИДИН ГИДРОХЛОРИДА В КАЧЕСТВЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ (обзор литературы)

1.1. Перспективы использования разветвленного ОГМГ-ГХ в качестве фармацевтической субстанции

1.1.1. Применение синтетических антимикробных веществ в качестве фармацевтических субстанций

Самым распространенным классом лекарственных средств, применяющихся для борьбы с воздействием патогенной микрофлоры на человеческий организм, являются антибиотики. Антибиотики – это лекарства, предотвращающие рост или уничтожающие патогенные бактерии путем вмешательства в важнейшие стадии метаболизма [68].

Большинство антибиотиков специфически ориентированы на конкретные механизмы действия, в связи с чем они способны нарушать определенные клеточные функции – такие, как синтез клеточной стенки, белка или РНК, ДНК репликацию или энергетический обмен [69,70,79,89,103,105,106]. Антибиотики широко используются для лечения различных заболеваний, что приводит к формированию устойчивых бактериальных штаммов, количество которых постоянно увеличивается. Бактерии могут быть устойчивы к определенным веществам или преодолеть восприимчивость с помощью генетической адаптации. За счет приобретенной резистентности бактерии теряют восприимчивость ко многим лекарственным средствам [106]. Распространение устойчивости патогенной микрофлоры к воздействию существующих лекарственных средств представляет собой динамический процесс [79], который становится причиной распространения инфекционных заболеваний. Например, в США, около 2 миллионов человек заражаются устойчивыми к антибиотикам бактериям, из них примерно 23 тыс. человек умирают каждый год в результате осложнений от инфекций [79].

С момента начала промышленного производства пенициллина в 1940 году к настоящему времени отмечено более 80 различных антибиотиков. До 1970 года в

фармацевтике отмечался устойчивый рост разработок и использования новых антибиотиков, в том числе с модифицированными механизмами действия, для исключения проблемы устойчивости патогенной микрофлоры к применяемым ранее препаратам. После 1980 года отмечается снижение появления на фармацевтическом рынке новых классов антибиотиков – тем самым ограничивается возможность эффективного воздействия на резистентную патогенную микрофлору [43,52,103,104].

Антибиотики являются одними из наиболее часто назначаемых препаратов, используемых для лечения бактериальных заболеваний у людей и животных. За период с 1981 по 2005 год 73% от общего числа антибиотиков составляли цефалоспорины, макролиды, пенициллины и хинолоны [55]. Однако за прошедшие 10-20 лет основная масса известных патогенных бактерий приобрела к ним множественную лекарственную устойчивость [69,70,79,89,103,105,106], что указывает на снижение эффективности применяемых ранее лекарственных средств данного класса. Результаты резистентности бактерий выражаются не только в повышении смертности пациентов, но и значительные расходы, например в Европе общие социальные затраты, направленные на борьбу с заболеваниями, вызванными патогенной микрофлорой, оценивается примерно в 1,5 млрд. евро каждый год [79].

Четвертичные аммонийные соединения (ЧАС). ЧАС используются в борьбе с патогенной микрофлорой уже несколько десятилетий. Первый представитель данного класса был синтезирован 90 лет назад (в 1925 году), но активное их использование в области медицины, фармацевтики отмечается с 1930 годов [35,53,62,85]. Однако после 20 лет их применения появляются работы [39,40,46,48,54,74,107], выявляющие развитие резистентности у патогенной микрофлоры. Было показано, что у *E. coli* и *S. marcescens* появляется резистентность к ЧАС, так же отмечено, что высокие концентрации данных соединений не развивают резистентности у золотистого стафилококка, однако наблюдается изменение физических характеристик его колоний. Также установлено что *P. aeruginosa* может вырабатывать невосприимчивость к ЧАС после длительного их применения, а остатки ЧАС на поверхности после обработки способствуют избирательному разви-

тию резистентности у различной микрофлоры. Подтвержден факт появления устойчивости у *E. coli* и *P. fluorescens*, причем в ходе эксперимента наблюдалось постепенное накопление индивидуальных клеток в испытуемом образце, тогда как в контрольном (не содержащем ЧАС) рост отсутствовал, что свидетельствовало о приобретении резистентности.

Экспериментально подтверждена зависимость проявления резистентных свойств у бактерий от уровня pH [37,49,84]. На примере бензалкония хлорида установлено, что данное вещество более активно при щелочном уровне pH: например, при pH=6.8 у *S.marcescens* наблюдалось повышение устойчивости за счет увеличения роста в 20 раз, тогда как при pH=7.7 рост увеличился всего в 2.2 раза.

Фенолы. Фенолы достаточно долго применяются в фармацевтике и медицине, благодаря своим антисептическим, дезинфицирующим и консервирующим свойствам. Активность фенолов основана на мембранотропных свойствах [47,50,51], в связи с чем фенолы так же называют «протоплазматическими ядами».

Установлено что фенолы при взаимодействии с патогенной микрофлорой провоцируют утечку межмолекулярной составляющей, включая ионы калия, тем самым повреждая мембрану [66,67]. Существует предположение [44,97-99], что действие фенолов происходит в точке деления пар дочерних клеток, так как молодые клетки более чувствительны к их воздействию, чем старые.

Однако ряд экспериментальных исследований подтверждает, что патогенная микрофлора быстро приобретает резистентность к фенолпроизводным соединениям. В ранних исследованиях [75] описана адаптация бактерий к фенолам, в том числе к резорцину. На примере *Micrococcus pyogenes var. aureus* (*S. aureus*), показано наличие роста колоний данной культуры в присутствии фенола, так же установлено, что фенол-резистентные штаммы более устойчивы к воздействию летальных концентраций, чем штаммы общего типа. Более того устойчивость штаммов остается неизменной, даже при разведении в 40 раз.

Доказано [36], что одной из причин формирования резистентности является межклеточный материал истечения клеток, подвергшихся воздействию фенола, который служит питательной средой. Вследствие этого повышается количество колоний образующих единиц на последующих стадиях обработки. В эксперименте [63] со *S. aureus* установлено, что фенилфенол способствует повышению в клетке содержания жиров, тем самым защищая клетку от ингибирования. Однако в других исследованиях [59,63,64,110] при использовании фенолята и салициланилида защита клетки с помощью жиров не наблюдалась.

Бигуанидины. Хлоргексидин является самым широко используемым биоцидом в антисептических продуктах; его соль (биглюконат) зарегистрирована в качестве фармацевтической субстанции, которая используется в ряде препаратов (глазные капли, стоматологические гели, ополаскиватели, суппозитории для лечения заболеваний, передаваемых половым путем и т.п.). Несмотря на широкий спектр преимуществ производных бигуанидинов, к их недостаткам можно отнести зависимость их активности от уровня pH, значительное снижение которой наблюдается в присутствии органических веществ.

Исследования механизма действия глюконата хлоргексидина на бактериях [57] и дрожжах [61] показали наличие скорого эффекта, направленного на повреждение внешней клеточной стенки, но недостаточного для инициирования ее лизиса или смерти. Также, на примере тест-культуры *Enterococcus faecalis*, экспериментально подтверждено [60], что хлоргексидин способен ингибировать мембраносвязывание и мешать растворимости АТФазы, однако для этого требуется очень высокая концентрация.

Выявлено [66,67,87], что соли хлоргексидина не обладают спороцидным действием, а высокие концентрации при комнатной температуре не способны подавить рост спор *Bacillus*. Угнетение роста отмечалось только при повышенных температурах. Также отмечено, что соединениям хлоргексидина присущ незначительный эффект гермицинации спор [80-83], однако существенного влияния на подавление общего роста не зафиксировано.

Различна антивирусная активность хлоргексидина и изучение его воздействия на различные типы бактериофагов показали отсутствие подавления в отношении таких типов как MS2 или К колифаг [71]. Высокие концентрации солей хлоргексидина оказались неспособными к инаktivации фага F116 *Pseudomonas aeruginosa*, ДНК и белка фага [72]. Тем не менее, выявлена способность хлоргексидина и других биоцидов нарушать процесс трансдукции. Антивирусная активность хлоргексидина проявляется лишь в отношении вирусов, имеющих липидообразную оболочку [77,78].

Еще одним представителем класса бигуанидинов является алексидин, который отличается от хлоргексидина наличием гексильных концевых групп. Отмечено что, по сравнению с хлоргексидином, алексидин обладает более быстрым бактерицидным действием [41,42]. При изучении способности алексидина и хлоргексидина оказывать влияние на процессы разделения липидов и образования липидных доменов в цитоплазматической мембране установлено отсутствие такой способности у хлоргексидина. Причиной этого могут являться гексильные группы алексидина вместо фенольных хлоргексидиновых [41].

Приведенная в данном разделе информация подробно освещает проблемы, связанные с приобретением патогенной микрофлорой резистентности к основным классам биоцидов, применяемых длительное время в медицине и фармацевтике. Указаны принципы воздействия антимикробных веществ и возможные механизмы адаптации к ним у патогенной микрофлоры, что еще раз подтверждает актуальность поиска нового биоцида, обладающего иным механизмом действия, для его использования в качестве фармацевтической субстанции.

1.1.2. Разветвленный ОГМГ-ГХ – соединение ряда катионных полиэлектролитов

Разработка фармацевтических субстанций с новым механизмом действия, направленным на подавление резистентных штаммов патогенной микрофлоры, является насущной задачей, которая стоит перед отечественной и международной фармацевтической отраслью и требует безотлагательного решения. Однако процесс разработки новых активных соединений реализуется в настоящее время достаточно медленно [55,56], причиной чего служит, в том числе, сосредоточенность компаний-разработчиков новых лекарственных средств на иных фармацевтических целях (производство препаратов второго поколения, дистрибуция и др.).

Биоцидные катионные полимеры являются одним из перспективных классов, представителей которого возможно использовать в качестве фармацевтической субстанции. Данные вещества уже более 80 лет используются в медицине, промышленности и домашней гигиене в качестве антисептиков, поверхностных дезинфектантов и топических антимикробных средств [76]. В последние десятилетия отмечается появление новых соединений данного класса и исследований проводимых в данном направлении [58,65,88,100], с учетом анализа накопленного материала, в качестве решения поставленной ранее задачи, наиболее оптимально использовать разветвленный ОГМГ-ГХ [21] – соединение ряда биоцидных катионных полимеров(полигуанидинов).

Обобщенная характеристика

Соединения класса полигуанидинов – твердые, термически стабильные вещества без цвета и запаха, легко растворяются в воде, сочетают свойства биоцида, флокулянта, катионного полиэлектролита и ПАВ; стабилизируют материалы в отношении био- и окислительной деструкции, старения; хорошо совмещаются с другими полимерами, легко подвергаются химической модификации, сохраняя биоцидные свойства [4].

Разветвленный ОГМГ-ГХ является синтетическим высокомолекулярным производным гуанидина. В России разработка и исследование веществ данного класса начинается с 1950 года. Установлено [4], что разветвленный ОГМГ-ГХ одновременно может воздействовать на аэробную и анаэробную микрофлору, а также обладает продолжительным биоцидным действием. Данное соединение и его ближайшие аналоги характеризуются антимикробной, спороцидной, антивирусной, инсектицидной, фунгицидной и альгицидной активностью, что обеспечивает широкий спектр биоцидного действия при относительно низкой токсичности.

Способы синтеза и строение получаемых соединений

Соединения ряда полимерных алкиленгуанидинов представляют собой полифункциональные катионные сополимеры, в каждом мономерном звене которых содержатся гуанидиновые группировки и связывающий эти группировки в цепь углеводородный радикал:

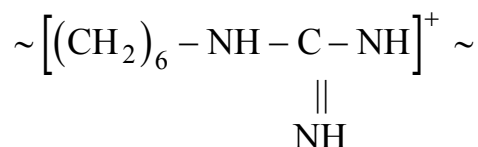


Рис.2. Мономерное звено полимерного алкиленгуанидина

В зависимости от природы исходных веществ и условий проведения химической реакции, возможно получать конечные продукты синтеза с различными молекулярно-массовыми характеристиками. Это влияет на тип структуры вещества: линейная, разветвленная или сшитая (гель), которая, в свою очередь, определяет физико-химические и биоцидные свойства продукта.

В России в конце 1960-х гг. д.х.н. Гембицким был предложен наиболее простой способ получения полиалкиленгуанидинов, заключающийся в поликонденсации исходных мономеров ГГХ с ГМДА [1, 5]. Предложенное решение лежит в основе многих существующих технологий производства биоцидных полимеров; отличия заключаются лишь в условиях проведения синтеза (время, температура и

т.п.) и соотношениях исходных мономеров, что и определяет структуру и молекулярно-массовые характеристики конечного продукта.

Способ синтеза полигуанидинов линейной структуры

Данный способ предполагает предварительное получение ГГХ в процессе 3-х часового сплавления хлористого аммония с дициандиамидом при температуре 150-180 °С, затем в расплавленный ГГХ добавляют ГМДА (мольное соотношение 1:1), снижая температуру на начальной стадии поликонденсации до 100-120 °С. После прекращения выделения аммиака продолжают синтез в течении 10 часов в интервале температур 150-180 °С. По завершении реакции образуется гидрохлорид ПГМГ линейной структуры, растворимый в воде, ацетоне и спирте; его среднечисловая молекулярная масса составляет 800 кДа, а степень полимеризации 4-5. МЗК против *P.aeruginosa* составляет 156 мкг/мл, LD₅₀=300 мкг/мл. Реакция синтеза представлена ниже:

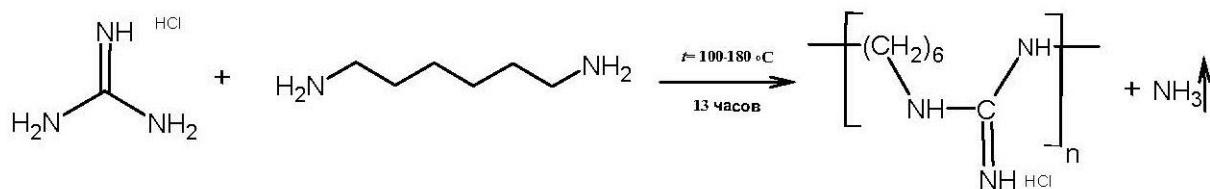


Рис.3. Реакция синтеза ПГМГ линейной структуры

Способ синтеза полигуанидинов сшитой структуры (гидрогели)

Полигуанидины сшитой структуры получают при проведении поликонденсации ГГХ и ГМДА в два этапа, которые во времени накладываются друг на друга. На первом этапе образуются линейные макромолекулы полимера с концевыми аминогруппами, причем с ростом температуры длина этих молекул возрастает. На втором этапе линейные макромолекулы взаимодействуют с аминогруппой ГГХ с образованием сшитого продукта. Процесс синтеза проводят в течении 9 часов в температурном интервале 160-250 °С; увеличение температуры приводит к росту молекулярно-массовых характеристик, и к увеличению выхода геля (сшитого по-

лимера) [2]. По завершении процесса синтеза получается гидрофильный поперечно-сшитый полимер, который представляет собой нерастворимую объемную полимерную сетку, способную набухать в воде [31]. Один грамм такого полимера может поглотить до 200 мл воды [32].

В силу того, что фрагменты пространственной полимерной сетки не могут отщепляться без разрыва прочных химических связей, данные соединения имеют малую токсичность [5,32]. Топологические характеристики гидрогелей ПГМГ (структурные параметры сетки) определяют степень и скорость их набухания, а так же уровень чувствительности к изменению pH среды, в зависимости от которого происходит набухание или коллапс [79]. Реакция синтеза сшитых полигуанидинов представлена ниже:

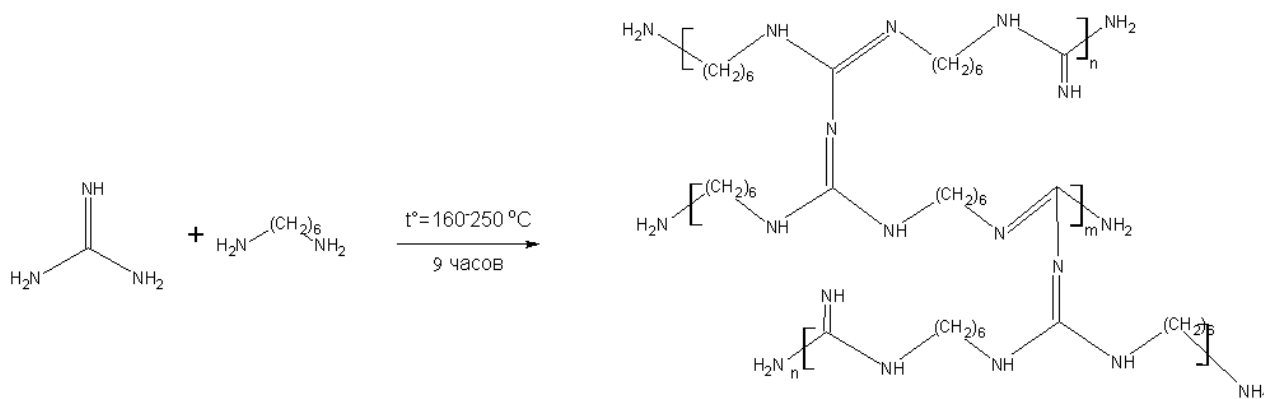
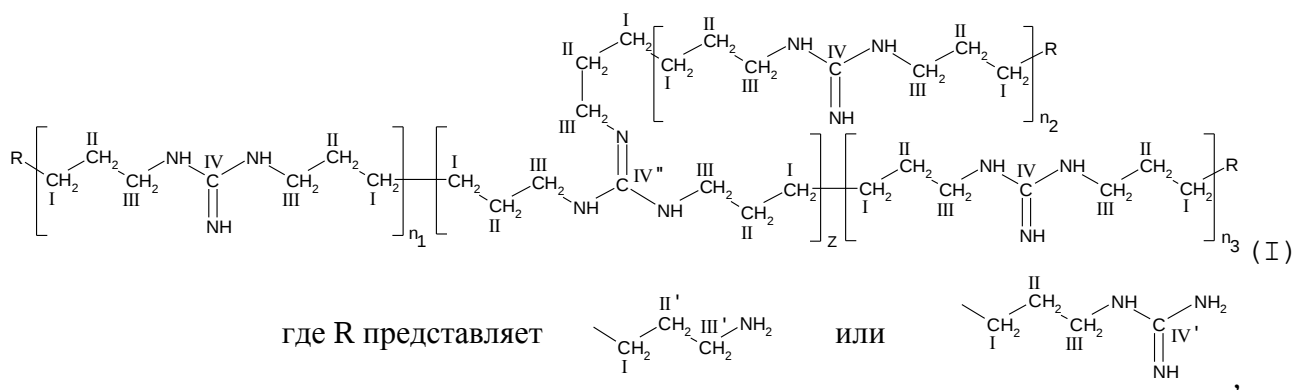


Рис. 4. Реакция синтеза ПГМГ сшитой структуры

Следует отметить, что сшитые полигуанидины не растворяются ни в одном растворителе, в связи с чем, спектр их применения очень ограничен.

Способ синтеза олигогуанидинов разветвленной структуры

Исследования проведенные, специалистами ЗАО «Институт Фармацевтических Технологий» [12], позволили разработать достаточно точные методы определения структурных характеристик олигогуанидинов, и обоснованно привести доказательную характеристику олигомеров разветвленной структуры – представителей класса гуанидиновых биоцидных полимеров:



а n_1 , n_2 и n_3 равны 1-3, а z равно 0,3-2,0

Рис.5. Структурная формула разветвленного ОГМГ-ГХ

Разветвленные ОГМГ получают конденсацией ГМДА и ГГХ в молярном соотношении 1.0: (1.0-1.2) соответственно, при 180-230 °С, в течении 3-12 часов. Соединения, получаемые вышеописанным способом, представляют собой гидрохлориды ОГМГ разветвленной структуры со средним количеством разветвлений 0.16-1.08 на молекулу, и характеризуются достаточно широким молекулярно-массовым распределением.

Испытания свойств разветвленных гуанидиновых олигомеров [21], по сравнению с их линейными аналогами, показывают, что разветвленные ОГМГ-ГХ обладают значительно меньшей токсичностью (10-15%) и коррозионной активностью (10-50%), чем линейные. Также им присуща более высокая бактерицидная, противовирусная и противогрибковая активность [58]. Это указывает на целесообразность применения именно разветвленных ОГМГ-ГХ в качестве активной основы эффективных антибактериальных препаратов.

Механизм действия

Отрицательная заряженность – это характерная особенность бактериальной клетки, природа ионогенных групп в которой зависит от вида бактерии. При наличии достаточного количества биоцидного гуанидинового полимера поверхностный заряд бактериальной клетки очень быстро нейтрализуется, переходя затем в противоположный. Уровень обращения заряда пропорционален концентрации полимера и достигает устойчивого равновесия уже через пять минут. Резкое электростатическое притяжение катионного полимера и отрицательно заряженной

бактериальной клетки способствует быстрому ее уничтожению под действием гуанидиновых биоцидов [38]. Предполагается, что биоцидный полимер гуанидинового ряда конкурирует с негативными участками пептидогликанового слоя, приводя к замещению катионов металлов. Вследствие нарушения целостности наружной мембраны клетка становится подверженной воздействию биоцида, остающегося в растворе.

Цитоплазматическая мембрана бактериальной клетки является важным местом при летальных действиях, ведущих к ее уничтожению. Предполагают, что биохимия цитоплазматической мембраны мало различается для разных видов бактерий, в связи с чем летальная последовательность действия биоцидных гуанидиновых полимеров состоит из ряда цитологических и физиологических изменений (некоторые из которых являются обратимыми), которые приводят к гибели клетки. Эта последовательность включает:

- Резкое притягивание к поверхности бактерии;
- Связывание с рецептивным участком на поверхности;
- Преодоление механизмов бактериальной защиты / исключения;
- Притягивание к цитоплазматической мембране;
- Вытекание компонентов цитоплазмы с низким молекулярным весом, например, K^+ , и подавление содержащихся в мембране ферментов, например, аденозинтрифосфатаз;
- Обширное разрушение цитоплазматической мембраны, вытекание макромолекулярных компонентов, например, нуклеотидов;
- Осаждение содержимого клетки.

В результате осуществления указанной последовательности происходит гибель клетки, подвергшейся воздействию разветвленного ОГМГ.

Спектр антимикробного действия гуанидиновых полимеров

Как уже было отмечено, гуанидиновые соединения широко распространены в природе и находят применение в качестве физиологически активных веществ: лекарств, антисептиков, пестицидов [4]. Гуанидиновая группировка служит активным центром многих лекарственных веществ (сульгин, исмелин, фарингосепт) и антибиотиков (стрептомицин, бластицидин, мильдомицин) [6]. Бактерицидный эффект производных гуанидина успешно используется за рубежом для создания антимикробных тканей и перевязочных средств. При этом доказано, что антисептики такого ряда не мигрируют из тканей и не нарушают нормальную флору кожи человека. Поликатионные соединения проходят через клеточную мембрану внутрь клетки, блокируя воспроизводящую способность нуклеиновой кислоты и белков, а также ферментную дыхательную систему, и угнетают развитие микроорганизма.

К настоящему времени накоплено достаточное количество информации, отражающей результаты исследований антимикробной активности гуанидиновых биоцидов. Так в начале 70-х годов установлено, что антимикробный эффект ПГМГ-ГХ наиболее выражен в отношении грамположительных видов организмов [4]. Водные растворы, содержащие небольшие концентрации ПГМГ-ГХ (0.05-0.10%), способны за короткий промежуток времени (5-25 мин) вызывать гибель широкого спектра патогенной микрофлоры (золотистый стафилококк, синегнойная и кишечная палочки, ботулинические бактерии и др.). Отмечено усиление антибактериальных свойств при увеличении температуры и уровня pH [28,29].

В 90-х годах осуществлен ряд исследований по выявлению сравнительной активности солей гуанидиновых полимеров. Установлено, что вещества в разной степени действуют на аэробную и анаэробную микрофлору (табл.1 и 2).

Таблица 1. Минимальная концентрация препаратов, задерживающая рост микроорганизмов (бактериостатическая концентрация, мкг/мл) [20]

Вид микроорганизма	ПГМГ-ГХ	ПГМ-Гф	ПГМГ-Гл	Хлоргексидина биглюконат
1	2	3	4	5
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,6	0,3	0,6	2,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9,7	6,2	9,0	25,0
<i>Serratia marcescens</i>	12,1	10,0	12,0	30,0

<i>Proteus vulgaris</i>	1,2	0,6	1,2	15,0
<i>Klebsiella pneumonice</i>	0,2	0,1	0,2	6,2
<i>Echerichia coli</i>	0,3	0,1	0,2	10,5
<i>Aspergillus niger</i>	14,7	12,0	18,0	–
<i>Candida geotrichim</i>	9,8	7,2	10,2	15,0
<i>Penicillium glaucum</i>	11,0	10,1	12,0	-
<i>Salmonella th, murum</i>	1,8	1,5	–	4,0
<i>Pytiosporum</i>	24,0	16,0	30,0	–
<i>Alternaria tennes</i>	21,0	17,0	27,1	–
<i>Coniophora cerebella</i>	19,3	18,0	23,1	–
<i>Polipoms versicolor</i>	22,2	20,0	24,0	–
<i>Trichophyton crateriform</i>	34,0	33,0	36,0	–
<i>Mycosporum lanosum</i>	16,2	14,0	19,9	–
<i>Dermatophyton</i>	18,0	18,0	20,0	–
<i>Frichoderma viride</i>	18,0	18,0	23,0	–
<i>Epidermaphyton rubrum</i>	20,1	18,0	24,0	–

Продолжение Табл.1.

1	2	3	4	5
<i>Epidrmaphyton kaufman</i>	15,0	10,0	18,0	–
<i>Zeitimis tigrinus</i>	29,0	26,0	30,0	–
<i>Selerophoma pityophila</i>	25,0	25,0	29,0	–
<i>Scendesmus quadricauda</i>	31,0	26,0	35,0	–
<i>S, flexneri</i>	–	2,4	–	–
<i>S, cutiritides</i>	–	4,2	–	–
<i>S, typhi</i>	–	1,2	–	–
<i>Cl, Cliphtheriae</i>	–	1,2	–	–
<i>B, subfills</i>	–	2,4	–	–

Таблица 2. Минимальная бактерицидная концентрация солей ПГМГ и хлоргексидинбиглюконата, мг/мл [20]

Вид микроорганизма	ПГМГ-ГХ	ПГМГ-ф	Хлоргексидин биглюконат
Аэробы:			
<i>Staphyl, Aureus P 209</i>	6,0	5,0	10
<i>Bacillus lentus BKM 500</i>	6,0	6,0	>50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,0	0,05	>50

<i>Prot, mirabilis</i>	10,0	10,0	>50
<i>Candida albicans</i>	10,0	10,0	15
Анаэробы:			
<i>P, anaerobus</i>	0,60	0,60	5,0
<i>Str, i ntermed</i>	0,60	0,12	5,0
<i>Propionibacterium acnes</i>	0,60	0,06	5,0
<i>Clostridium bifermentas</i>	0,60	0,06	–
<i>Veillonella parvula</i>	0,06	0,06	–
<i>Prevotella melaninogen</i>	3,00	0,60	25
<i>Porfhiromonas gingivalis</i>	3,00	3,00	25
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	0,60	0,12	5,0
<i>Bast, Fragilis</i>	–	0,05	–
<i>Clost, Septicum</i>	0,60	0,50	–
<i>Str, intermedium</i>	0,60	0,50	–

В 2013 году в ЗАО «Институт фармацевтических технологий» были проведены исследования антимикробной активности разветвленных ОГМГ-ГХ по сравнению с имеющимися аналогами – результаты представлены в табл.3.

Таблица 3. Сравнительные значения биоцидной активности антисептиков

МПК (мкг/мл)	Субстанция				
	Октенидин	Хлоргексидин	Алексидин	ПГМГ-ГХ	разв. ОГМГ-ГХ
<i>S.aureus</i>	1,0	0,2	0,5	1,0	0,1
<i>E.coli</i>	1,0	0,5	2,0	2,0	0,5
<i>P.mirabilis</i>	2,0	15,6	31,3	1,0	1,0

Проведенные исследования показали, что разветвленный ОГМГ-ГХ обладает большей эффективностью по сравнению с представленными биоцидами, что скорее всего обусловлено его молекулярно-массовыми характеристиками [21].

Токсичность гуанидиновых полимеров

Сам гуанидин является малостабильным однокислотным основанием, однако в результате его протонирования образуется катион гуанидиния, в котором положительный заряд равномерно распределен между тремя атомами азота. Это определяет устойчивость солей гуанидина.

В работе [9] изучена токсичность и опасность ГГХ – одного из мономеров олигогексаметиленгуанидина гидрохлорида. Его ЛД₅₀ при внутрижелудочном введении белым крысам составляет 800 мг/кг. В хроническом токсикологическом эксперименте гемато-, гепато-, нейро-, рено- и адренотоксического действие ГГХ в дозах 2,0, 0,25, 0,05 и 0,01 мг/кг не установлено. Вместе с тем, оценка гонадотоксического эффекта вещества по морфометрическим и функциональным показателям сперматогенеза показала, что ГГХ в дозе 2 мг/кг вызывал достоверное снижение относительной массы семенников и времени подвижности сперматозоидов. Цито-гистологические показатели семенников опытных животных не отличались от контрольных. Мутагенный эффект (микроядерный тест) при внутрижелудочном введении ГГХ мышам в дозах 1/10, 1/50 и 1/250 ЛД₅₀ в подостром эксперименте выявлен не был. Пороговая доза по токсикологическому признаку вредности составила 2 мг/кг, а максимальная недействующая – 0,2 мг/кг.

В 1992 г. в ММА им. И.М.Сеченова проведены комплексные токсикологические исследования полигексаметиленгуанидина гидрохлорида, включавшие изучение острой, подострой и хронической токсичности при энтеральном пути поступления в организм, а также отдаленных эффектов [13]. С точки зрения токсикометрии несомненный интерес представляло изучение зависимости степени токсичности от химического строения и молекулярной массы препарата. Для изучения этого вопроса были проведены острые опыты с 5 образцами ПГМГ с ММ от 1 до 100 тыс. В результате чего, установлено, что препараты ПГМГ являются умеренно токсичными соединениями, для которых различия в видовой чувствительности нехарактерны.

В Ангарском НИИ медицины труда и экологии человека токсичность изучена при нанесении на кожу [4] и при нормировании в воздухе рабочей зоны. Проведено обоснование ПДК ПГМГ-ГХ в воде водных объектов [13]. Изучен механизм и характер действия вещества (общетоксический, раздражающий, сенсибилизирующий, отдаленные проявления интоксикации). Обоснован ПДУ на кожные покровы (0,2 мг/дм³) и ПДК в воде водных объектов 0,1 мг/л (по общесанитарному признаку вредности – 3 класс опасности).

В 2012 году сотрудниками ЗАО «Институт фармацевтических технологий» были проведены исследования токсического действия разветвленных ОГМГ-ГХ и ОГМГ-сукц, по сравнению с ПГМГ-ГХ, в опытах *in vivo* на белых нелинейных мышах массой 18-20 г при внутрижелудочном (LD_{50}) и накожном (LD_{50}^C) введении. Результаты исследований представлены в табл.4.

Таблица 4. Результаты сравнения токсичности гуанидиновых производных

Образец	(LD_{50}), мг/кг	(LD_{50}^C), мг/кг
ОГМГ-ГХ	4500	16000
ОГМГсукц	4200	15800
ПГМГГХ	3500	13500

Таким образом, разветвленный ОГМГ-ГХ из представленных веществ является наименее токсичным и согласно ГОСТ 12 1 007-76 «Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности» относится к IV классу малоопасных веществ при нанесении на кожу и к III классу умеренно опасных веществ при внутрижелудочном поступлении в организм.

Параметры и существующие методы контроля качества полигуанидинов

Контроль качества является неотъемлемой частью жизненного цикла лекарственного средства. Осуществление надлежащего контроля качества предполагает использование валидированных аналитических методов, гарантирующих получение достоверных результатов. Исходя из параметров качества, контроль которых обязателен для фармацевтических субстанций, по отношению к разветвленному ОГМГ-ГХ наиболее трудоемкими и проблемными будут являться определение содержания основного вещества и примесных соединений (ГГХ и ГМДА).

Существует ряд методик [16,18,27] определения ПГМГ-ГХ в промышленных продуктах и водных растворах, которые можно было взять за основу для разработки метода контроля содержания основного вещества. Однако на практике результаты этих методик не всегда адекватны и воспроизводимы. Причинами этого могут являться отсутствие стандарта и учета молекулярно-массовых характеристики анализируемого вещества. В связи с этим, необходимо провести оценку возможности применения традиционных методик для количественного определе-

ния ОГМГ-ГХ, а в случае их непригодности – разработка альтернативного, более адекватного, метода анализа.

Достоверное определение ГГХ и ГМДА, являющихся исходными соединениями в синтезе ОГМГ-ГХ и входящих в состав остаточных примесей в конечном продукте, также является задачей, требующей решения.

Известно, что в полимерном аналоге ОГМГ-ГХ – ПГМГ-ГХ (торговое название «БИОПАГ») остаточные мономеры определяют методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) [10]. Однако данный метод имеет определенные недостатки: является полуколичественным, имеет низкую чувствительность, недостаточную точность и плохую воспроизводимость [10].

Кроме того известен метод определения ГМДА, основанный на его взаимодействии с дабсилхлоридом [4]. Продукт реакции анализируют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в обращеннофазном варианте с флуориметрическим и масс-спектрометрическим детектированием. Однако необходимость использования дорогого и не всегда доступного оборудования для реализации этого метода осложняет его выполнение в производственных лабораториях контроля качества. Также существует более простой и доступный ВЭЖХ метод определения ГМДА в воздухе рабочей зоны [7], который возможно взять за основу разработки метода контроля данной примеси.

Исходя из приведенной информации, разработка высокоточных, аппаратно-доступных и селективных методов количественного контроля ГГХ и ГМДА в разветвленном ОГМГ-ГХ будет являться необходимым решением поставленной ранее задачи.

1.2. Особенности проведения валидации

разрабатываемых аналитических методов контроля качества

Разработка новых аналитических методов контроля является естественным следствием создания новых фармацевтических субстанций и препаратов на их основе. Помимо исследовательского комплекса мероприятий разработки аналитического метода (условия, пробоподготовка, и т.п.), обязательным требованием нормативных актов [19,24,25,33] является его валидация.

Валидация аналитической методики – это экспериментальное доказательство того, что методика пригодна для решения предполагаемых задач [26]. Она проводится для методов и методик, не включенных в фармакопею, а также для фармакопейных методик, воспроизводимых на предприятии (ограниченная) и при передаче технологий. Испытания аналитических методов проводят по следующим параметрам валидации [3,45,101]:

- *специфичность* – способность однозначно оценивать анализируемое вещество в присутствии других компонентов, которые могут присутствовать в образце.
- *правильность* или *точность* характеризует степень соответствия между известным истинным значением или справочной величиной и значением, полученным по данной методике.
- *прецизионность* аналитической методики выражает степень близости (или степень разброса) результатов для серии измерений, выполненных по данной методике на различных пробах одного и того же однородного образца.
 - *сходимость* характеризует прецизионность методики при ее выполнении в одних и тех же условиях (в частности, одним и тем же аналитиком или группой аналитиков) в течение небольшого промежутка времени.
 - *внутрилабораторная прецизионность* характеризует влияние внутрилабораторных вариаций: различные дни, различные аналитики, различное оборудование и т.д.

- *воспроизводимость* характеризует прецизионность в межлабораторном эксперименте (совместные исследования, обычно применяемые для стандартизации метода).
- *предел обнаружения* для конкретной аналитической методики представляет собой минимальное количество анализируемого вещества в образце, которое может быть обнаружено (при этом не обязательно должно быть определено точное значение).
- *предел количественного определения* для аналитической методики представляет собой минимальное количество анализируемого вещества в образце, которое может быть количественно определено с требуемой правильностью и прецизионностью.
- *линейность* – это способность методики (в пределах диапазона применения) получать результаты испытаний, прямо пропорциональные концентрации (количеству) анализируемого вещества в образце.
- *диапазоном применения* аналитической методики является интервал между минимальной и максимальной концентрациями (количествами) анализируемого вещества в образце (включая эти концентрации), для которого показано, что аналитическая методика имеет требуемую прецизионность, правильность и линейность.
- *робастность* (robustness) – это способность аналитической методики не подвергаться влиянию малых, задаваемых (контролируемых) аналитиком изменений, в условиях выполнения методики.

В табл.4 приведены валидационные характеристики, для разрабатываемых методов контроля качества.

Таблица 4. Параметры валидации аналитических методик

Характеристики	<i>Типы аналитических методик</i>			
	Иден- тифи- кация	Испытания на примеси		Количественное определение: - растворение (только определение), - содержание/ активность
		Количе- ствен- ные	предель- ные	
Правильность	-	+	-	+
Прецизионность:				
Сходимость	-	+	-	+
Внутрилабораторная прецизионность	-	+*	-	+*
Специфичность**	+	+	+	+
Предел обнаружения	-	***	+	-
Предел количествен- ного определения	-	+	-	-
Линейность	-	+	-	+
Диапазон применения	-	+	-	+
«—» — характеристика обычно не исследуется; «+» — характеристика обычно исследуется; * — в тех случаях, когда проводится исследование воспроизводимости, исследование внутрилабораторной прецизионности не требуется; ** — недостаток специфичности испытания можно компенсировать другим (другими) дополнительным(и) испытанием(ями); *** — может потребоваться в некоторых случаях (например, когда предел определения и нормируемый предел содержания определяемой примеси близки).				

Приведенные в таблице характеристики считаются наиболее важными при валидации различных аналитических методик. Этот список следует рассматривать как типовой для указанных испытаний (аналитических методик) [26].

Таким образом, в литературном обзоре приведена информация по основным классам веществ используемых длительное время в фармацевтике для борьбы с патогенной микрофлорой, а также обозначены проблемы их применения, связанные с приобретением патогенной микрофлорой резистентности к основным классам биоцидов. Указаны принципы воздействия антимикробных веществ и возможные механизмы адаптации к ним патогенной микрофлоры. Описан класс гуанидиновых катионных полиэлектролитов, представлены способы синтеза полигуанидинов различной структуры, определяющей их свойства. Рассмотрены основные этапы механизма действия данных соединений. Приведена сравнительная информация о спектре антимикробного действия представителей данного класса. основанная на результатах исследований проводимых в различные периоды времени. Определено, что разветвленный ОГМГ-ГХ – наиболее перспективное соединение, которое оптимально использовать в качестве фармацевтической субстанции. Однако существует ряд проблем, связанных с осуществлением контроля качества основных параметров (содержание основного вещества и примесных соединений), исходя из чего, существует необходимость в разработке и последующей валидации методов достоверного контроля указанных параметров.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Основными объектами исследования являлись синтетический биоцид – разветвленный ОГМГ-ГХ, а также исходные мономеры ГГХ и ГМДА, используемые в синтезе указанного вещества. Дополнительно при разработке методов контроля, был использован ряд вспомогательных веществ.

Разветвленный олигогексаметиленгуанидин гидрохлорид

Разветвленный ОГМГ-ГХ – олиго(имнокарбонимидоилимино-1,6-гександиил) гидрохлорид (рис.5):

Брутто формула: $[C_7H_{16}N_3Cl]_n$

Эквивалентная масса мономерного звена ОГМГ-ГХ: 177г/экв;

Фирма-производитель: ЗАО «Институт Фармацевтических Технологий».

ОГМГ-ГХ представляет собой белый гигроскопичный аморфный порошок или прозрачные куски от белого до слабо желтого цвета. Основные молекулярно-массовые характеристики использованных образцов ОГМГ-ГХ представлены в табл.5.

Таблица 5. Молекулярно-массовые характеристики промышленных серий вещества ОГМГ-ГХ, использованных в работе

№ серии	Среднечисловая молекулярная масса, Да	Степень разветвления
0313	802	0,39
0513	708	0,31
0613	951	0,47
0813	906	0,54
1113	579	0,24
0114	799	0,34
0214	898	0,40
0414	604	0,23
0514	730	0,34
0614	835	0,38

Гексаметилендиамин

ГМДА или 1,6-диаминогексан (рис.7) представляет собой бесцветные кристаллы с характерным аминным запахом похожим на пиперидин, легко растворим в органических растворителях.

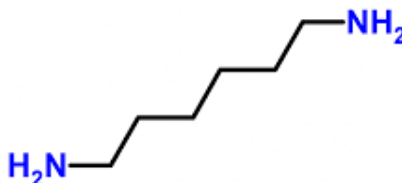


Рис.7. Структурная формула гексаметилендиамина

Брутто формула: $C_6H_{16}N_2$;

Молекулярная масса: 116.21 г/моль;

Т. плавления = 42 °С

Фирма-производитель: ACROS ORGANICS, Бельгия [90].

Гуанидина гидрохлорид

ГГХ рис.7 представляет собой бесцветное кристаллическое вещество, расплывается на воздухе вследствие поглощения влаги.

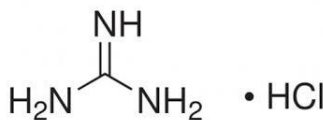


Рис.7. Структурная формула ГГХ

Брутто формула: CH_6N_3Cl ;

Молекулярная масса: 95,53 г/моль;

Т. плавления = 181-183 °С

Фирма-производитель: Sharlab S.L., Испания [86].

Вспомогательные вещества

9-Флуоренилметил хлорформиат (ФМОС) (рис.8) представляет собой белый кристаллический порошок. Использовался в качестве дериватизирующего агента при разработке метода определения ГМДА.

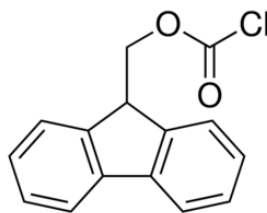


Рис.8. Структурная формула 9-флуоренилметил хлорформиата

Брутто формула: $C_{15}H_{11}ClO_2$;

Молекулярная масса: 258.7 г/моль;

Т. плавления = 62-64 °С

Фирма-производитель: Sigma-Aldrich Chemie, ФРГ [94].

Ортофталевый альдегид (рис.9) – порошок светло-желтого цвета, использовался в качестве дериватизирующего агента при разработке метода определения ГМДА.

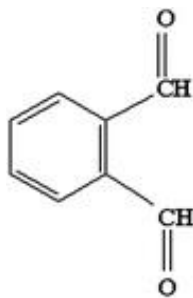


Рис.9. Структурная формула ОФА

Брутто формула: $C_8H_6O_2$;

Молекулярная масса: 134,13 г/моль;

Т. плавления = 52-55 °С

Фирма-производитель: Sigma-Aldrich Chemie, ФРГ [96].

Пентадецилсульфонат натрия – натриевая соль 1-пентасульфоновой кислоты (рис.10) – представляет собой порошок белого или светло-желтого цвета. Данное вещество использовалось в качестве ион-парного агента при разработке метода определения ГГХ.

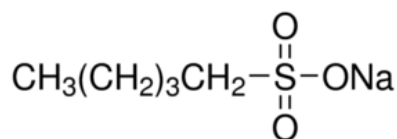


Рис.10. Структурная формула пентадецилсульфоната натрия

Брутто формула: $CH_3(CH_2)_{14}SO_3Na$;

Молекулярная масса: 174,19 г/моль;

Т. плавления = 300°C

Фирма-производитель: Sigma-Aldrich Chemie, ФРГ [92].

Октадецилсульфонат натрия – натриевая соль 1-октасульфоновой кислоты (рис.11) – порошок белого цвета. Использовалось в качестве ион-парного агента при разработке метода определения ГГХ.

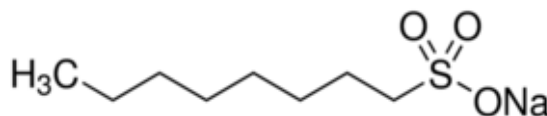


Рис.11. Структурная формула октадецилсульфоната натрия

Брутто формула: $C_{18}H_{37}O_2SNa$;

Молекулярная масса: 336,52 г/моль;

Фирма-производитель: Sigma-Aldrich Chemie, ФРГ [91].

Компоненты для приготовления модельных смесей

экспериментальных образцов препаратов на основе разветвленного ОГМГ-ГХ

Ниже приведены основные компоненты, использованные для приготовления моделей препаратов на основе разветвленного ОГМГ-ГХ, которые применялись на этапе разработки метода и установки определения разветвленного ОГМГ-ГХ.

Бензалкония хлорид – алкилбензилдиметиламмония хлоридом (рис.12) - кристаллы белого цвета

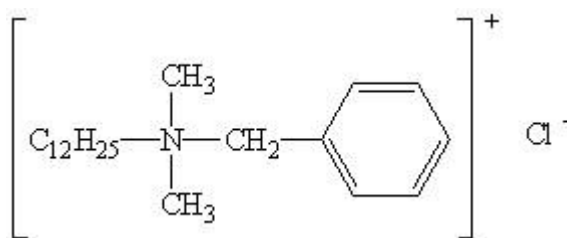


Рис.12. Структурная формула БАХ

Брутто формула: $C_{21}H_{38}ClN$;

Молекулярная масса: 357,00 г/моль;

Фирма-производитель: Sigma-Aldrich Chemie, ФРГ [93].

Лидокаина гидрохлорид – 2-Диэтиламино-2',6'-ацетоксилидида гидрохлорид (рис.13.) – порошок белого цвета.

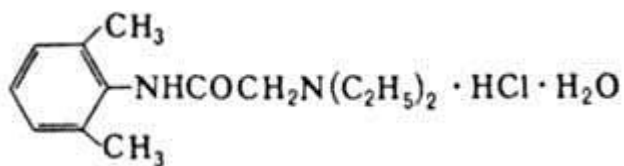


Рис.13. Структурная формула ЛГХ

Брутто формула: $C_{14}H_{22}N_2O \cdot HCl \cdot H_2O$;

Молекулярная масса: 228,8 г/моль;

Фирма-производитель: Sigma-Aldrich Chemie, ФРГ [95].

Ментол [8] - (2R)-(2-пропил)-(5S)-метил-(1R)-циклогексано́л (рис.14.) – прозрачное кристаллическое вещество.

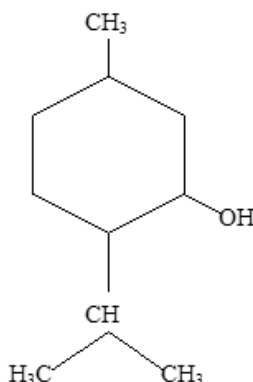


Рис.14. Структурная формула ментола

Брутто формула: $C_{10}H_{19}OH$;

Молекулярная масса: 156,27 г/моль;

Фирма-производитель: Swati, Индия.

Реактивы, используемые для выполнения разработанных методов анализа

В табл.6 приведены реактивы, использованные для выполнения разработанных методов анализа.

Таблица 6. Используемые реактивы

№ п/п	Название	Качество	Метод контроля в котором применяется
1	Натрия гидроксид раствор 1 М	ГФ XII, ч.1, с. 332	Определение мономерной при- меси ГМДА в разветвленном ОГМГ-ГХ
2	Борная кислота	ГФ XII, ч.1, с. 244	
3	Вода для хроматографии	ГФ XII, ч.1, с. 253	Определение мономерной при- меси ГМДА/ГГХ в разветвлен- ном ОГМГ-ГХ
4	Ацетонитрил для хроматографии	ГФ XII, ч.1, с. 240	
5	Ортофосфорная кислота концентрированная,	ГФ XII, ч.1, с. 349	Определение мономерной при- меси ГГХ в разветвленном ОГМГ-ГХ
6	Спирт 96%	ГФ XII, ч. 1, с. 376	Определение содержания основ- ного вещества в разветвленном ОГМГ-ГХ
7	Серная кислота конц.	ГФ XII, ч. 1, с. 386	Определение низких concentra- ций разветвленного ОГМГ-ГХ
8	Метиленовый красный	ЧДА	
9	Метиленовый синий (чда)	ГФ XII, ч. 1, с. 386	
10	Перекись водорода 30%	ГФ XII, ч. 1, с. 253	

2.2. Методы исследования

В табл. 7 обобщенно представлены параметры валидации и критерии приемлемости [98,101], применяемые к разрабатываемым методам контроля качества.

Таблица 7. Параметры и критерии валидации разрабатываемых методов контроля

Параметр валидации			Критерии приемлемости	
			Примесные соединения	Содержание осн. вещества
Специфичность			Должны отсутствовать пики, мешающие определению. На хроматограмме растворителя образца не должно быть пиков, имеющих такое же удерживание, как и гуанидин. Разрешение между посторонним пиком и пиком гуанидина должно быть не менее, чем 1,5	Интенсивность сигналов спектра ЯМР ¹³ С испытуемого образца, должна соответствовать интенсивности сигналов типичного спектра ЯМР ¹³ С
Диапазон применения	Линейность		Коэффициент корреляции ≥ 0,990	
	Правильность		Фактор отклика: среднее значение 97,5-102,5%. относительное стандартное отклонение ≤ 5,0%. доверительный интервал должен включать 100% значение	
	Прецизионность	по параметру сходимости	Серия 1: относительное стандартное отклонение ≤4,0% (количество измерений n≥6)	
		по параметру промежуточная прецизионность	относительное стандартное отклонение ≤4,0% (количество измерений n≥6); критерий Фишера ≤5,05%	
Предел колич. определения			не должен превышать 1,560 мкг/мл и 70,0 мкг/мл для ГМДА и ГГХ соответственно	—

2.2.1. ЯМР- ^{13}C спектроскопия

Данный метод применялся при анализе структурных характеристик используемых промышленных серий разветвленного ОГМГ-ГХ. Среднечисловую молекулярную массу и степень разветвления определяли в соответствии с методиками, представленными ниже.

Степень разветвления.

Приготовление испытуемого образца.

Взвешивают 100.0 мг субстанции, навеску вносят в пробирку Эппендорфа вместимостью 1 мл, затем с помощью микродозатора приливают 500.0 мкл воды дейтерированной (дейтерия оксид) (ГФ XII, Ч.1, С.260). Смесь тщательно перемешивают на вортексе до полного растворения анализируемого вещества. Полученный раствор переносят в ампулу для ЯМР диаметром 5 мм. Ампулу закрывают колпачком, раствор перемешивают и направляют на регистрацию.

Описание методики.

^{13}C ЯМР-спектр испытуемого образца регистрируется на спектрометре ЯМР (Bruker DPX-300 или аналогичный) с рабочей частотой на протонах не менее 200 МГц, при температуре 30 °C (303 K) в режиме Inverse Gate, при котором происходит полное широкополосное подавление протонов и отсутствует ядерный эффект Оверхаузера. Количество сканирований – 200. В качестве внутреннего стандарта для отнесения пиков используют натриевую соль 3-триметилсилил-1-пропансульфоокислоты (Sigma, № S1885-1G или аналогичный). Задержка между импульсами по правилу 5T1 должна составлять не менее 30 секунд. Типичный вид регистрируемого спектра с отнесением сигналов к соответствующим атомам структуры ОГМГ-ГХ приведен на рис.15 и в табл.8 [81].

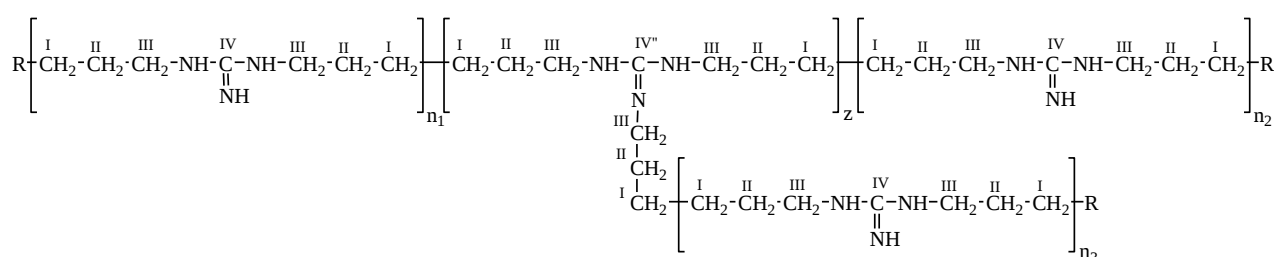
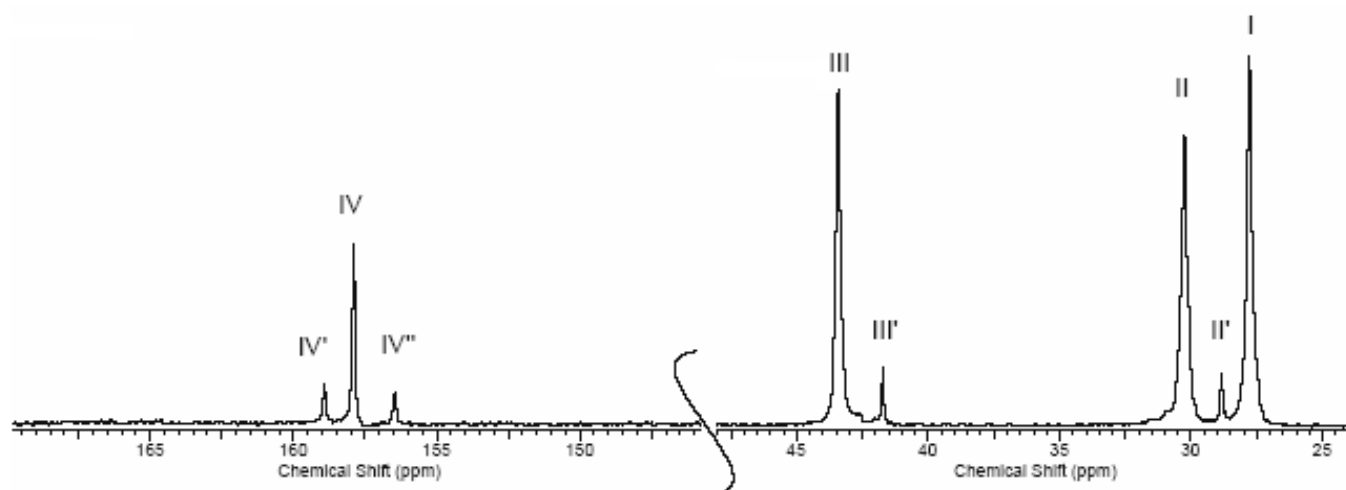


Рис.15. Типичный спектр ЯМР ^{13}C субстанции разветвленного ОГМГ-ГХ
и отнесение сигналов[12]

Таблица 8. Отнесение сигналов в типичном спектре ЯМР ^{13}C
разветвленного ОГМГ-ГХ[81]

№	Отнесение сигнала или группы сигналов	Обозначение	Химический сдвиг, м.д.
1.	Сигнал С1 ПГМГ-ГХ в случае замещения одного атома азота (концевой)	IV'	157,11
2.	Сигнал С1 ПГМГ-ГХ в случае замещения двух атомов азота (в цепи)	IV	156,08
3.	Сигнал С1 ПГМГ-ГХ в случае замещения трех атомов азота (разветвленный)	IV''	154,61
4.	Сигнал С2 и С7 атомов углерода ПГМГ-ГХ	III	41,72
5.	Сигнал С7 атома углерода ПГМГ-ГХ в концевой группе	III'	40,10
6.	Сигнал С3 и С6 атомов углерода ПГМГ-ГХ	II	28,56
7.	Сигнал С6 атома углерода ПГМГ-ГХ в концевой группе	II'	27,60
8.	Сигнал С4 и С5 атомов углерода ПГМГ-ГХ	I	26,09

Из интегральных интенсивностей сигналов «неразветвленных» и «разветвленных» звеньев, концевых фрагментов гуанидина и гексаметилендиамина, рассчитывают количество разветвлений на молекулу по формуле:

$$z = \frac{2 - \frac{2b}{a+1}}{\frac{2b}{d} + 3b + \frac{b}{a+1} - 1} \quad (1)$$

где коэффициенты a , b и d выражаются через интегральные интенсивности сигналов S_{II} , S_{III} , S_{IV} , $S_{II'}$, $S_{III'}$, $S_{IV'}$ и $S_{IV''}$ соответствующих атомов углерода следующим образом:

$$a = \frac{S_{III'}}{S_{IV'}} \quad (2); \quad b = \frac{S_{III'} + S_{IV'}}{S_{III}} \quad (3); \quad d = \frac{S_{IV''}}{S_{IV}} \quad (4);$$

Среднечисловая молекулярная масса M_n .

Методика приготовления образца и условия проведения анализа приведены в разделе «Степень разветвления».

Исходя из количества «неразветвленных» и «разветвленных» звеньев, концевых фрагментов гуанидина и гексаметилендиамина, а также их молекулярных масс (141, 182, 100 и 58, соответственно), рассчитывают среднечисловую молекулярную массу образца субстанции по формуле:

$$M_n = (n_1 + n_2 + zn_3) \cdot 141 + z \cdot 182 + [\text{гуан}]_{\text{конц}} \cdot 100 + [\text{ГМДА}]_{\text{конц}} \cdot 58 = \frac{z}{d} \cdot 141 + z \cdot 182 + \frac{2+z}{a+1} \cdot 100 + a \cdot \frac{2+z}{a+1} \cdot 58 \quad (5)$$

где значения коэффициентов a , d и z рассчитывают по формулам, описанным в разделе «Степень разветвления».

2.2.2. Дифференциальная сканирующая калориметрия

ДСК – популярный метод термического анализа, измеряющий тепловые эффекты процессов, происходящих в образце, в зависимости от температуры. Данный метод использовали для определения температуры стеклования промышленных серий разветвленного ОГМГ-ГХ при выявлении связей и закономерностей между строением (степень разветвления, среднечисловая молекулярная масса) и свой-

ствами (показатель преломления, температура стеклования) указанного вещества. Анализ проводили в температурном диапазоне от + 20 °С до 300 °С, при постоянной скорости нагрева 10 К/мин, на высокоточном дифференциальном сканирующем калориметре Netzsch DSC 204F1 Phoenix 240-12-0070-L.

2.2.3. Фотоколориметрия

Данный метод применяли при разработке метода определения содержания основного вещества в разветвленном ОГМГ-ГХ по градуировочной зависимости оптической плотности от концентрации раствора содержащего разветвленный ОГМГ-ГХ. Градуировки строили для четырех промышленных серий разветвленного ОГМГ-ГХ, имеющих различные молекулярно-массовые характеристики. Для каждой из четырех серий готовили ряд стандартных водных растворов с концентрацией 1-5 мас.%. Измерения осуществляли при 25 °С согласно [4], на фотоэлектроколориметре ФЭК 03-01 (толщина поглощающего слоя кюветы 5 см, рабочая длина волны 540 нм), с использованием красителя Эозин Н.

2.2.4. УФ-спектрофотометрия

Метод УФ-спектрофотометрии использовали на этапе разработки методов контроля примесных соединений, для определения возможности прямого детектирования. Проводили измерения водных растворов ГМДА (3000 мкл/мл) и ГГХ (17,5мкл/мл), на спектрофотометре СФ-104 (толщина поглощающего слоя кюветы 1 см, диапазон длин волн: 190-540 нм) при 25 °С.

2.2.5. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Метод ВЭЖХ применяли на этапах разработки методов контроля примесных соединений (ГГХ и ГМДА) и содержания основного вещества, описание и подходы к валидации которых будут представлены ниже. Так же с помощью уже разработанных методов контроля мономеров, определяли содержание ГГХ и ГМДА в промышленных сериях разветвленного ОГМГ-ГХ, при разработке метода определения содержания основного вещества, результаты анализа представлены в табл.9.

Таблица 9. Содержание примесей исходных мономеров
в промышленных образцах ОГМГ-ГХ

№ п/п	Контролируемые параметры	Номер серии							
		0313	0513	0613	0813	1113	0114	0214	0414
1	Содержание свободного ГМДА, %	<0,010	<0,010	0,120	0,30	0,235	0,140	0,170	<0,010
2	Содержание свободного ГГХ, %	<0,010	<0,010	0,560	0,70	0,571	0,580	0,570	<0,010

Данные табл.9 подтверждают, что используемая технология синтеза разветвленного ОГМГ-ГХ [21,109], позволяет получать целевой продукт с содержанием мономерных примесей $\leq 1\%$, исходя из чего в качестве граничных значений (использованных при валидации разработанных методов контроля и составлении проекта нормативной документации) определено, что содержание ГМДА должно быть $\leq 0,3\%$, а содержание ГГХ $\leq 0,7\%$.

2.2.5.1. Определение примеси ГМДА в разветвленном ОГМГ-ГХ методом ВЭЖХ и подходы к проведению его валидации

В ходе проведенных исследований по определению оптимальных условий определения примеси ГМДА в разветвленном ОГМГ-ГХ был разработан метод его количественного контроля, ниже будет приведено его описание и представлены подходы к проведению его валидации.

Методика проведения измерений:

Определение проводят с использованием ВЭЖХ, содержание гексаметилендиамина (ГМДА) рассчитывают методом внешнего стандарта.

Реактивы

Натрия гидроксид раствор 1 М;

Борная кислота;

Вода для хроматографии;

9-флуоренилметил хлорформиат (FMOC);

Ацетонитрил для хроматографии.

Стандартный образец: гексаметилендиамин;

Буферный раствор с $\text{pH}=10,4$: 6,2 г борной кислоты растворяют в 600,0 мл воды, прибавляют 1 М раствор гидроксида натрия до $\text{pH}=10,4$ и доводят водой до объема 1000,0 мл в мерной колбе. Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор FMOC: В пенициллиновый пузырек вместимостью 10 мл помещают навеску 10,0 мг FMOC, приливают 10,0 мл ацетонитрила и перемешивают до растворения. Раствор тщательно укупоривают во избежание гидролиза. Раствор используют свежеприготовленным.

Испытуемый раствор: Навеску 130,0 мг испытуемой субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, растворяют в 200,0 мл воды и доводят водой до метки. 1,0 мл приготовленного раствора помещают в пенициллиновый пузырек вместимостью 10 мл, добавляют 0,1 мл боратного буфера, 1,0 мл ацетонитрила и 0,1 мл раствора FMOC. Полученный раствор тщательно перемешивают и выдерживают при комнатной температуре 5 минут. Раствор готов для введения в хроматограф.

Раствор стандартного образца: 125,0 мг гексаметилендиамина помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, растворяют в 200,0 мл воды и доводят водой до метки. Концентрация раствора 500 мкг/мл.

Стандартные растворы: Аликвоту раствора стандартного образца помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 80,0 мл воды, тщательно перемешивают и доводят водой до метки. Значения алиquot и концентраций раствора приведены в табл.10.

Таблица 10. Приготовление стандартного раствора и его концентрация

Номер стандартного раствора	Объем раствора стандартного образца, мкл	Концентрация раствора, мкг/мл
1	50,0	0,25
2	100,0	0,50
3	500,0	2,50
4	1000,0	5,00

Хроматографические условия:

Колонка Luna C18(2), 5 мкм, 250 x 4,6 мм или аналогичная

Подвижная фаза А: вода для хроматографии.

Подвижная фаза В: ацетонитрил.

Анализ проводится в градиентном режиме

Таблица 11. Программа градиента

Время, мин	А, %	В, %
0	60	40
1	60	40
10	10	90
16	10	90
17	60	40
20	60	40

Скорость потока – 1 мл/ мин;

Детектор – спектрофотометрический;

Длина волны – 264 нм;

Температура – 30 °С;

Объем петли – 100 мкл;

Время анализа – 20 мин;

Объем вводимой пробы: 20,0 мкл.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность для пика производного гексаметилендиамина (ГМДА) на хроматограммах стандартного раствора №1 должна составлять не менее 10 000 теоретических тарелок;
- относительное среднеквадратичное отклонение площадей пиков производного ГМДА на хроматограммах стандартного раствора №1 должна составлять не более 5%.

Описание методики

В хроматограф, выведенный на рабочий режим, 5 раз вводят стандартный раствор №1. На хроматограммах идентифицируют пики производного ГМДА и определяют их площади. Время удерживания составляет примерно 14,5 мин. Определяют параметры пригодности системы. Затем в хроматограф последова-

тельно вводят стандартные растворы, начиная с раствора с наименьшей концентрацией. Строят график зависимости концентрации ГМДА от площади пика.

В хроматограф вводят 3 раза испытуемый раствор. На хроматограммах идентифицируют пики производного ГМДА и определяют их площади. По графику зависимости концентрации ГМДА от площади пика определяют концентрацию амина в испытуемом растворе.

Проведение расчетов

Содержание гексаметилендиамина в % определяется по формуле:

$$c = \frac{C_{исп} \cdot 250 \cdot P}{1000 \cdot a \cdot 100\%} \cdot 100\% = \frac{C_{исп} \cdot P}{4 \cdot a} \quad (6)$$

где $C_{исп}$ – концентрация ГМДА в испытуемом растворе, полученная по градуировочному графику, мкг/мл; a – навеска субстанции, использованная при приготовлении испытуемого раствора, мг; P – содержание основного вещества в стандартном образце в мас.д; 250 – объем мерной колбы, использованной для приготовления испытуемого раствора; 1000 – коэффициент пересчета мкг/мл в мг/мл.

Подходы к проведению валидации разработанной методики:

1. Определение специфичности методики

Специфичность метода должна быть подтверждена хроматограммами следующих растворов:

- растворителя образца;
- стандартного раствора;
- испытуемого раствора

2. Определение линейности методики

Готовят серию растворов, охватывающую исследуемый диапазон концентраций (в диапазоне 80-120% от предельного значения концентрации определяемой примеси в испытуемом растворе, принимая предельное значение за 100%, для ГМДА данное значение будет составлять 1,56 мкг/мл). В качестве критерия линейности рассматривают величину коэффициента корреляции r^2 зависимости площади пика определяемого вещества от его концентрации.

Для определения линейности готовят ряд стандартных растворов с концентрациями от 1,245 до 1,873 мкг/мл.

Критерии приемлемости: на основании полученных данных рассчитывают коэффициенты уравнения линейной зависимости площади пика определяемого вещества от его концентрации и величину коэффициента корреляции r^2 . Величина коэффициента корреляции должна быть не менее 0,99.

3. Определение правильности методики

В используемом для данного испытания образце промышленной серии субстанции ОГМГ-ГХ №1113 начальное содержание ГМДА составило 0,235% (или 1,235 мкг/мл в испытуемом растворе, приготовленном в соответствии с методом определения). Затем методом добавок [26] готовят 9 растворов, охватывающих диапазон концентраций 80-120% от предельного значения концентрации определяемой примеси в испытуемом растворе, принимая предельное значение за 100%, для ГМДА данное значение будет составлять 1,56 мкг/мл.

Оценку проводят сравнением (фактор отклика) определенной концентрации раствора с известной концентрацией

Приготовление испытуемых растворов

На аналитических весах взвешивают три навески ГМДА (табл.12), количественно переносят их в отдельные мерные колбы на 1000 мл, растворяют в 100 мл дистиллированной воды, а затем доводят объёмы до меток. Концентрация полученных растворов ГМДА приведена в табл.15. Из приготовленных растворов отбирают аликвоты 10 мл, помещают в мерные колбы на 1000 мл и доводят объёмы до меток дистиллированной водой; содержание ГМДА в растворах аликвот также приведено в табл.15. Далее в три мерные колбы на 10 мл, содержащие по 5 мл испытуемого раствора субстанции (приготовленного в соответствии с методикой определения), концентрация которого по ГМДА составляет 1,235 мкг/мл, добавляют по 1 мл в каждую ранее приготовленных растворов аликвот (каждой мерной колбе на 10 мл соответствует одна мерная колба на 1000 мл из которой отбирают 1 мл раствора, и переносят в колбу на 10 мл), объём доводят до метки испы-

туемым раствором субстанции. После чего проводят анализ растворов в соответствии с описанным методом измерения. Концентрации итоговых растворов и процент, который эта концентрация составляет от предельного значения концентрации определяемой примеси в испытуемом растворе, представлены в табл.12.

Таблица 12. Приготовление испытуемых растворов

Условия приготовления раствора	Номер испытуемого раствора		
	1-3	4-6	7-9
Навеска ГМДА, мг	136,5	448,5	760,5
Концентрация раствора ГМДА, мкг/мл, приготовленного из:			
из навески ГМДА	136,5	448,5	760,5
из аликвоты	1,365	4,485	7,605
итогового,	1,248±0,025	1,560±0,025	1,872±0,025
(% от предельного значения)	(80)	(100)	(120)

По результатам анализа определяют фактор отклика (Q), %:

$$Q = \frac{c_2}{c_1} \cdot 100 \quad (7)$$

где c_1 - известная концентрация ГМДА в анализируемом растворе, мкг/мл;

c_2 - определенная концентрация ГМДА в анализируемом растворе, мкг/мл.

Из полученных девяти значений фактора отклика рассчитывают: среднее значение, относительное стандартное отклонение и доверительный интервал

4. Определение прецизионности методики

4.1. Прецизионность по параметру сходимость

Готовят шесть испытуемых растворов одной серии субстанции, проводят анализ на жидкостном хроматографе, в соответствии с описанным методом. Оценивают сходимость по величине относительного стандартного отклонения.

4.2. Прецизионность по параметру промежуточная прецизионность

Два сотрудника в разные дни готовят шесть испытуемых растворов одной серии субстанции, проводят анализ на жидкостном хроматографе, в соответствии с описанным методом. Оценивают промежуточную прецизионность по величине

относительного стандартного отклонения для каждой серии измерений, и критерию Фишера.

5. Диапазон применения

Соответствующим образом доказанные линейность, специфичность и прецизионность аналитической методики подтверждают диапазон применения как параметр валидации.

6. Предел количественного определения.

Данный параметр валидации определяли, используя значения площадей пиков и тангенса угла наклона калибровочной прямой, полученные при проведении валидации по параметрам прецизионность (сходимость) и линейность соответственно. Расчет предела количественного определения производится с использованием калибровочной прямой.

$$LOQ = 10 \cdot \frac{s}{b}, \quad (8)$$

где b – наклон калибровочной прямой, s – стандартное отклонение сигнала.

2.2.5.2. ВЭЖХ методика определения примеси ГГХ в разветвленном ОГМГ-ГХ и подходы к проведению ее валидации

В ходе проведенных исследований по определению оптимальных условий определения примеси ГГХ в разветвленном ОГМГ-ГХ, был разработан метод его контроля, ниже будет приведено его описание и представлены подходы к проведению его валидации.

Методика проведения измерений:

Реактивы

1. Вода для хроматографии;
2. Ацетонитрил для хроматографии;
3. Ортофосфорная кислота концентрированная;
4. 1-Pentane Sulfonic Acid Sodium Salt.

Стандартный образец:

1. Гуанидина гидрохлорид.

Подвижная фаза А. В мерную колбу на 1000 мл помещают 870 ± 1 мг 1-Pentane Sulfonic Acid Sodium Salt, приливают около 300,0 мл воды для хроматографии и полностью растворяют соль. Затем в ту же колбу приливают 10,0 мл ортофосфорной кислоты концентрированной, тщательно перемешивают, доводят объем в колбе до метки водой для хроматографии и еще раз тщательно перемешивают. Отбирают 600,0 мл для приготовления градуировочных растворов и раствора образца. Используют свежеприготовленный раствор.

Подвижная фаза В: ацетонитрил.

Испытуемый раствор: $1,000 \pm 0,001$ г субстанции помещают в мерную колбу на 100 мл и растворяют в 50-70 мл раствора начальной подвижной фазы, используя ультразвуковую ванну при комнатной температуре в течении 5 минут, затем доводят объем до метки раствором подвижной фазы и еще раз тщательно перемешивают. Концентрация исходной субстанции полимера 10 000 мг/л (10 мг/мл)

Раствор стандартного образца. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают $50,0 \pm 0,5$ мг гуанидина гидрохлорида, приливают 20-30 мл подвижной фазы, растворяют полностью соль и доводят объем подвижной фазой до метки. Концентрация гуанидина гидрохлорида $1,000 \pm 0,0005$ мг/мл.

Градуировочные растворы (100 мкг/мл по гуанидину гидрохлориду). Аликвоту раствора стандартного образца или градуировочного раствора помещают в мерную колбу на 10 мл, доводят ее объем подвижной фазой до метки и тщательно перемешивают. Концентрация гуанидина гидрохлорида приведена в табл.13.

Таблица 13. Приготовление градуировочных растворов и их концентрация

Номер градуировочного раствора	Аликвота, мл	Концентрация раствора по ГТХ, мкг/мл	Концентрация по свободному гуанидину, мкг/мл
1	5,0 мл раствора №2	10	6,18
2	2,0 раствора №3	20	12,36
3	1,0 стандартного раствора	100	61,8

Хроматографические условия:

Колонка: Gemini C18, 110A, 3 мкм 4.6x150 мм, заполненная сферическими частицами силикагеля размером 3 мкм, эффективным диаметром пор 110 Å⁰ и модифицированными C18 группами (L1 by USP column selection) или аналогичная;

Подвижная фаза: А: 5 mM 1-Pentane Sulfonic Acid Sodium Salt, 1% раствор ортофосфорной кислоты, 1% раствор ацетонитрила в воде;

Фаза В: ацетонитрил;

Таблица 14. Программа градиента

Время, мин	Фаза А, %	Фаза В, %
0	100	0
3	100	0
4	10	90
15	10	90
16	100	0
40	100	0

Расход: 0,7 мл/мин

Температура: комнатная;

Детектирование: в УФ области;

Длина волны: 205 нм;

Объем вводимой пробы: 20,0 мкл;

Время анализа: 40 мин.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность колонки, рассчитанная по пику гуанидина, на хроматограмме градуировочного раствора №3 не менее 5000 теоретических тарелок;
- относительное среднеквадратичное отклонение площадей пиков гуанидина на 5 хроматограммах градуировочного раствора №3 – не более 5%.

Проведение анализа:

В хроматограф, выведенный на рабочий режим, последовательно вводят 5 раз градуировочный раствор №3. На хроматограммах идентифицируют пики гуанидина и определяют их площади. Оценивают пригодность системы. Далее в хроматограф последовательно вводят градуировочные растворы, начиная с раствора с наименьшей концентрацией (градуировочный раствор №1), затем градуировочный раствор №2 и градуировочный раствор №3. На хроматограммах идентифицируют пики гуанидина и определяют их площади. По полученным данным строят градуировочный график зависимости концентрации гуанидина гидрохлорида от площади пика.

После проведения градуировки в хроматограф вводят 3 раза испытуемый раствор. На хроматограммах идентифицируют пики гуанидина и определяют их площади. По градуировочному графику определяют концентрацию гуанидина гидрохлорида в испытуемом растворе.

Проведение расчетов:

Рассчитывают содержание гуанидина гидрохлорида в субстанции в % по формуле:

$$Y = \frac{C_{исп} \cdot 100 \cdot P}{1000 \cdot a \cdot 100\%} \cdot 100\% = \frac{C_{исп} \cdot P}{10 \cdot a} \quad (9)$$

где $C_{исп}$ – концентрация гуанидина в испытуемом растворе, полученная по градуировочному графику, мкг/мл; a – навеска субстанции, использованная при приготовлении испытуемого раствора, мг; P – содержание основного вещества в стандартном образце, мас. д.; 100 – объем мерной колбы, использованной для приготовления испытуемого раствора; 1000 – коэффициент пересчета мкг/мл в мг/мл.

*Подходы к проведению валидации разработанной методики:**1. Специфичность методики*

Специфичность метода должна быть подтверждена хроматограммами растворителя образца, а также градуировочного и испытуемого растворов.

2. Определение линейности методики

Готовят серию стандартных водных растворов ГГХ по два раствора каждой концентрации от 56,0 до 84,0 мкг/мл с шагом 0,7 мкг/мл, данные значения охватывают диапазон 80-120% от предельной концентрации определяемой примеси в испытуемом растворе (принимая предельное значение за 100%, что для ГГХ составляет 70,0 мкг/мл), приготовление которого отражено в представленной выше методике проведения измерений.

Определяют площади пиков приготовленных стандартных растворов, в соответствии с приведенной методикой, из двух полученных значений рассчитывают среднюю площадь пика, и используют ее для отображения линейной зависимости от соответствующей концентрации ГГХ.

3. Определение правильности методики

В используемом для данного испытания образце промышленной серии субстанции ОГМГ-ГХ №1113, начальное содержание примеси ГГХ составило 0,571% (или 50,0 мкг/мл в испытуемом растворе, приготовленном в соответствии с методом определения). Затем методом добавок [26] готовят 9 растворов охватывающих диапазон концентраций 80-120% (с шагом 20%, по три раствора на каждый уровень концентрации) от предельного значения концентрации определяемой примеси в испытуемом растворе, принимая предельное значение за 100%, для ГГХ данное значение будет составлять 70,0 мкг/мл. Оценку проводят сравнением (фактор отклика) определенной концентрацией раствора с известной концентрацией

Приготовление испытуемых растворов. На аналитических весах взвешивают три навески ГГХ, количественно переносят их в отдельные мерные колбы на 100 мл, растворяют в 50 мл дистиллированной воды, затем доводят объёмы до меток. Концентрация полученных растворов ГГХ приведена в табл.18. Далее в мерную колбу на 10 мл, содержащую 5 мл испытуемого раствора субстанции (приготовленного в соответствии с методикой определения), концентрация которого по ГГХ составляет 50,0 мкг/мл, добавляют по 1 мл в каждую ранее приготовленных

растворов ГГХ (каждой мерной колбе на 10 мл соответствует одна мерная колба на 100 мл из которой отбирают 1 мл раствора, и переносят в колбу на 10 мл), объём доводят до метки испытуемым раствором субстанции. После чего проводят анализ растворов в соответствии с описанным методом измерения. Концентрации итоговых растворов и процент, который эта концентрация составляет от предельного значения концентрации определяемой примеси в испытуемом растворе, представлены в табл.15.

Таблица 15. Приготовление испытуемых растворов

Условия приготовления раствора	Номер испытуемого раствора		
	1-3	4-6	7-9
Навеска ГГХ, мг	11,0	25,0	39,0
Концентрация раствора ГГХ, мкг/мл, приготовленного из:			
из навески ГГХ	110,0	250,0	390,0
итогового,	56±0,5	70±0,5	84±0,5
(% от предельного значения)	(80%)	(100%)	(120%)

По результатам анализа определяют фактор отклика (формула 7).

Из полученных девяти значений фактора отклика рассчитывают: среднее значение, относительное стандартное отклонение и доверительный интервал.

4. Определение прецизионности методики

4.1. Прецизионность по параметру сходимость

Готовят шесть испытуемых растворов одной серии субстанции, проводят анализ на жидкостном хроматографе, в соответствии с описанным методом. Оценивают сходимость по величине относительного стандартного отклонения.

4.2. Прецизионность по параметру промежуточная прецизионность

Два сотрудника в разные дни готовят шесть испытуемых растворов одной серии субстанции, проводят анализ на жидкостном хроматографе, в соответствии с описанным методом. Оценивают промежуточную прецизионность по величине относительного стандартного отклонения для каждой серии измерений, и критерию Фишера.

5. Диапазон применения

Соответствующим образом доказанные линейность, специфичность и прецизионность аналитической методики, подтверждают диапазон применения как параметр валидации.

6. Предел количественного определения.

Данный параметр валидации определяли, используя значения площадей пиков и тангенса угла наклона калибровочной прямой, полученные при проведении валидации по параметрам прецизионность (сходимость) и линейность соответственно. Расчет предела количественного определения производится с использованием калибровочной прямой (формула 8).

2.2.6. Рефрактометрия

Рефрактометрия применялась на этапе выявления связей и закономерностей между строением и свойствами разветвленного ОГМГ-ГХ. Рефрактометрические исследования осуществляли по традиционной методике [8], с помощью рефрактометра УРЛ-1 с термостатируемым блоком призм при 25 °С. Проводили определение показателя преломления 20% водных растворов восьми промышленных серий разветвленного ОГМГ-ГХ. Также рефрактометрия использовалась при разработке и валидации метода определения основного вещества в разветвленном ОГМГ-ГХ, ниже представлена разработанная методика и описаны подходы к проведению ее валидации.

Методика проведения измерений:

Для определения используют рефрактометр с термостатируемым блоком призм.

Реактивы

Вода очищенная;

Спирт 96%.

Испытуемый раствор: 1-2 грамма субстанции (точная навеска) помещают в бюкс, добавляют не более 5 граммов раствора (точная навеска) дистиллированной

воды. После полного растворения образца, раствор используют для измерения коэффициента преломления. Полученный раствор имеет концентрацию в интервале 20-40 %.

Пригодность рефрактометрической системы. Перед определением поверхности призм рефрактометра трижды промывают дистиллированной водой, затем спиртом 96% и вытирают любым мягким неворсистым материалом. Блок призм рефрактометра и раствор термостатируют при 25 ± 0.1 °C в течение 15 минут. Затем проверяют точность прибора по воде дистиллированной, показатель преломления которой при 25 °C равен $n_D^{25}(H_2O) = 1,33250 \pm 0,00005$ (ГФ XII, ч.1, с. 53)

Проведение анализа.

Перед измерением термостатируют раствор субстанции при 25 ± 0.1 °C в течение 15 минут. Проводят измерение показателей преломления раствора субстанции согласно ГФ XII, Ч.1, С.52. За результат определения показателя преломления принимают среднее арифметическое двух параллельных измерений, допускаемое расхождение между которыми не должны превышать 0.0002. Содержание основного вещества в препарате (P, %) рассчитывают по формуле:

$$P = \frac{(n_D^{25} - n_{D0}^{25}) \cdot m \cdot 100}{F \cdot a \cdot (100 - W)} \quad (10)$$

где n_D^{25} – показатель преломления раствора препарата при 25 °C; n_{D0}^{25} – показатель преломления раствора сравнения при 25 °C; m – масса раствора, г; a – навеска субстанции, г; W – потеря массы при высушивании анализируемой субстанции, %; F – фактор, показывающий прирост показателя преломления раствора субстанции при увеличении концентрации на 1%, равный 0,00205.

Подходы к проведению валидации разработанной методики:

1. Определение специфичности методики

Недостаток специфичности испытания можно компенсировать другим дополнительным испытанием [3,26], исходя из чего для осуществления валидации

по параметру специфичность, использовали метод ЯМР ^{13}C – спектроскопии. В качестве критерия приемлемости определено, что интенсивность сигналов спектра ЯМР ^{13}C испытуемого образца, должна соответствовать интенсивности сигналов типичного спектра ЯМР ^{13}C разветвленного ОГМГ-ГХ.

2. Определение линейности методики.

Готовят серию стандартных водных растворов ОГМГ-ГХ по два раствора каждой концентрации от 24 до 36% с шагом 3,0%, данные значения охватывают диапазон 80-120% от концентрации действующего вещества в испытуемом растворе (принимая концентрацию испытуемого раствора за 100%, что для ОГМГ-ГХ составляет 30,0%), приготовление которого отражено в представленной выше методике проведения измерений. Определяют показатели преломления приготовленных стандартных растворов, в соответствии с приведенной методикой, из двух полученных значений рассчитывают средний показатель преломления, и используют его для отображения линейной зависимости от соответствующей концентрации ОГМГ-ГХ.

3. Определение правильности методики

Проводится измерение не менее 9 измерений (независимые навески), 3 концентраций внутри определенного диапазона применения. Оценку проводят сравнением (фактор отклика) определенной концентрацией раствора (без пересчета на содержание основного вещества) с известной концентрацией формула 7)

Испытуемые растворы 1-3

Три независимые навески по $1,2000 \pm 0,1$ грамма субстанции (точная навеска) помещают в отдельные бюксы с крышками, затем в бюксы, добавляют воды, чтобы общая масса каждого раствора составляла 5 грамм, закрывают крышками и растворяют с помощью ультразвуковой ванны. После полного растворения образцов, растворы используют для измерения коэффициента преломления. Полученные растворы имеют концентрации $24,00 \pm 0,1$ масс. % (что соответствует 70% от уровня концентрации испытуемого раствора описанного в методике определения).

Испытуемые растворы 4-6

Три независимые навески по $1,5040 \pm 0,1$ грамма субстанции (точная навеска) помещают в отдельные бюксы с крышками, затем в бюксы, добавляют воды, чтобы общая масса каждого раствора составляла 5 грамм, закрывают крышками и растворяют с помощью ультразвуковой ванны. После полного растворения образцов, растворы используют для измерения коэффициента преломления. Полученные растворы имеют концентрации $30,08 \pm 0,1$ масс. % (что соответствует 100% от уровня концентрации испытуемого раствора описанного в методике определения).

Испытуемые растворы 7-9

Три независимые навески по $1,8000 \pm 0,1$ грамма субстанции (точная навеска) помещают в отдельные бюксы с крышками, затем в бюксы, добавляют воды, чтобы общая масса каждого раствора составляла 5 грамм, закрывают крышками и растворяют с помощью ультразвуковой ванны. После полного растворения образцов, растворы используют для измерения коэффициента преломления. Полученные растворы имеют концентрации $36,00 \pm 0,1$ масс. % (что соответствует 120% от уровня концентрации испытуемого раствора описанного в методике определения).

Из полученных девяти значений фактора отклика рассчитывают: среднее значение, относительное стандартное отклонение и доверительный интервал.

4. Определение прецизионности методики

4.1. Прецизионность по параметру сходимость.

Готовят шесть испытуемых растворов одной серии субстанции проводят анализ на рефрактометре, согласно описанного метода. Оценивают сходимость по величине относительного стандартного отклонения.

4.2. Прецизионность по параметру промежуточная прецизионность.

Два сотрудника в разные дни готовят шесть испытуемых растворов одной серии субстанции, проводят анализ на рефрактометре, согласно описанного мето-

да. Оценивают промежуточную прецизионность по величине относительного стандартного отклонения для каждой серии измерений, и критерию Фишера.

2.2.7. Определение общего содержания азота методом Къельдаля

Метод Къельдаля для определения общего содержания азота, использовался на этапах разработки и валидации метода определения низких концентраций разветвленного ОГМГ-ГХ и разработки установки определения разветвленного ОГМГ-ГХ в многокомпонентных препаратах на его основе.

2.2.7.1. Разработка и валидация метода определения низких концентраций ОГМГ-ГХ

При разработке и валидации метода определения низких концентраций ОГМГ-ГХ, использовался водный раствор разветвленного ОГМГ-ГХ концентрацией 1 мг/мл, определение которого осуществлялось в соответствии с адаптированным в процессе разработки методом Къельдаля

Методика проведения измерений:

Приборы и оборудование:

- Прибор для сжигания Дигестор DKL 8 (VELP Scientifica) с набором колб для сжигания;
- Прибор для перегонки: Полуавтоматический дистиллятор UDK 139 (VELP Scientifica);
- Автоматический весовой титратор-дозатор «Титрион-рН»

Реактивы:

- Катализатор Kjeltabs (VELP Scientifica) или таблетки Къельдаля , Merk Co;
- Серная кислота конц.;
- Метиленовый красный;
- Метиленовый синий;
- Перекись водорода 30%;
- Натрия гидроксид ;
- Борная кислота ;

- Вода очищенная

Раствор натрия гидроксида 30%: Навеску гидроксида натрия массой 30 г помещают в мерную колбу на 100 мл, растворяют в 50 мл дистиллированной воды и доводят объем до метки дистиллированной водой, полученный раствор имеет концентрацию 30%.

Раствор борной кислоты 4%: навеску борной кислоты массой 4,0 г помещают в мерную колбу на 100 мл, растворяют в 50 мл дистиллированной воды и доводят объем до метки дистиллированной водой, полученный раствор имеет концентрацию 4.0 %.

Проведение анализа:

Точно отмеренные 10 мл препарата помещают в колбу для сжигания по Кьельдалю, добавляют таблетку катализатора и упаривали до объема 1-3 мл в аппарате для сжигания при 200 °С. Затем в охлажденную пробу добавляют 10 мл концентрированной серной кислоты и 1 мл перекиси водорода и сжигают в режиме: 30 минут при 300 °С и 60 минут при 420 °С. По окончании сжигания проба прозрачная, бесцветная. Далее охлажденную колбу помещали в аппарат для перегонки. В нее автоматически подается 50 мл воды и 50 мл 30% раствора натрия гидроксида. Отгонку проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации установки для получения пара, используют воду свободную от аммиака. Отгон собирают в приемник (колбу для титрования) с 10 мл раствора борной кислоты 4%. Титрование осуществляют 0,05 М раствором серной кислоты, на автоматической весовой титраторе-дозаторе «Титрион-рН» до достижения точки эквивалентности. Параллельно проводят контрольный опыт, где вместо препарата используют дистиллированную воду.

Проведение расчетов:

По определенным значениям рассчитывают общее содержание азота в пробе (N, мг/мл):

$$N = \frac{(V - V_0) \cdot 1,4}{A} \quad (11)$$

где 1.4 - количество азота в мг, эквивалентное 1 мл 0,05 М серной кислоты;

V - объем 0,05 М серной кислоты при титровании пробы, мл;

V_0 - объем 0,05 М серной кислоты при титровании контрольного раствора, мл;

A - объем пробы препарата для сжигания, мл.

Количество анализируемого вещества пропорционально содержанию в нем азота, исходя из чего коэффициент пересчета K для ПГМГ-ГХ составляет:

$$K = \frac{177}{42} = 4,2143 \quad (12)$$

где 177 – эквивалентная масса фрагмента цепочки ПГМГ-ГХ, г/экв;

42 – эквивалентная масса трех атомов азота в звене цепи ПГМГ-ГХ, г/экв.

Содержание разветвленного ОГМГ-ГХ (C) в пробе мг/мл, определяют по формуле:

$$C = N \cdot K \quad (13)$$

Подходы к проведению валидации разработанной методики:

1. Определение специфичности методики

Поводят определение содержания азота в пробе растворителя, азот должен отсутствовать в указанной пробе.

Так же специфичность испытания можно компенсировать другим дополнительным испытанием [3,97], исходя из чего для осуществления валидации по параметру специфичность, использовали метод ЯМР ^{13}C – спектроскопии.

Пробу раствора разветвленного ОГМГ-ГХ объемом 200 мл упаривали на ротационном испарителе, сухой осадок анализировали методом ЯМР ^{13}C – спектроскопии.

2. Определение линейности методики

Готовят серию стандартных водных растворов ОГМГ-ГХ по два раствора каждой концентрации от 0,8 до 1,2 мг/мл с шагом 0,1 мг/мл, данные значения охватывают диапазон 80-120% от концентрации действующего вещества в анализируемом растворе (принимая концентрацию анализируемого раствора за 100%, что для ОГМГ-ГХ составляет 1,0 мг/мл).

Определяют объем 0,05 М раствора H_2SO_4 пошедший на титрование приготовленных стандартных растворов, из двух полученных значений рассчитывают средний объем, и используют его для отображения линейной зависимости от соответствующей концентрации ОГМГ-ГХ.

Величина коэффициента корреляции должна быть не менее 0,99.

3. Определение правильности методики

Проводится измерение не менее 9 измерений (независимые навески), 3 концентраций внутри определенного диапазона применения. Оценку проводят сравнением (фактор отклика) определенной концентрацией раствора (без пересчета на содержание основного вещества) с известной концентрацией.

Испытуемые растворы 1-3

Три независимые навески по $0,8 \pm 0,1$ грамма разветвленного ОГМГ-ГХ (точная навеска) помещают в отдельные мерные колбы на 100 мл, вещество растворяют в 50 мл дистиллированной воды и доводят водой до метки. Полученные, растворы используют для определения объема 0,05 М раствора H_2SO_4 пошедшего на титрование раствора пробы, при осуществлении последней стадии выполнения анализа (определение общего азота методом Кьельдаля) . Полученные растворы имеют концентрации $0,8 \pm 0,1$ мг/мл (что соответствует 80% от уровня концентрации ОГМГ-ГХ в используемой модельной смеси).

Испытуемые растворы 4-6

Три независимые навески по $1,0 \pm 0,1$ грамма разветвленного ОГМГ-ГХ (точная навеска) помещают в отдельные мерные колбы на 100 мл, вещество растворяют в 50 мл дистиллированной воды и доводят водой до метки. Полученные, растворы используют для определения объема 0,05 М раствора H_2SO_4 пошедшего на титрование раствора пробы, при осуществлении последней стадии выполнения анализа (определение общего азота методом Кьельдаля). Полученные растворы имеют концентрации $1,0 \pm 0,1$ мг/мл (что соответствует 100% от уровня концентрации ОГМГ-ГХ в используемой модельной смеси).

Испытуемые растворы 7-9

Три независимые навески по $1,2 \pm 0,1$ грамма разветвленного ОГМГ-ГХ (точная навеска) помещают в отдельные мерные колбы на 100 мл, вещество рас-

творяют в 50 мл дистиллированной воды и доводят водой до метки. Полученные, растворы используют для определения объема 0,05 М раствора H_2SO_4 пошедшего на титрование раствора пробы, при осуществлении последней стадии выполнения анализа (определение общего азота методом Кьельдаля) . Полученные растворы имеют концентрации $1,2 \pm 0,1$ мг/мл (что соответствует 120% от уровня концентрации ОГМГ-ГХ в используемой модельной смеси).

По результатам анализа определяют фактор отклика (формула 7)

Из полученных девяти значений фактора отклика рассчитывают: среднее значение, относительное стандартное отклонение и доверительный интервал

4. Определение прецизионности методики

4.1. Прецизионность по параметру сходимость

Готовят шесть испытуемых растворов одной серии разветвленного ОГМГ-ГХ, проводят анализ согласно описанного метода. Оценивают сходимость по величине относительного стандартного отклонения.

4.2. Прецизионность по параметру промежуточная прецизионность

Два сотрудника в разные дни готовят шесть испытуемых растворов одной серии разветвленного ОГМГ-ГХ, проводят анализ согласно описанного метода. Оценивают промежуточную прецизионность по величине относительного стандартного отклонения для каждой серии измерений, и критерию Фишера.

2.2.7.2 Разработка программно-аппаратного комплекса для определения разветвленного ОГМГ-ГХ в многокомпонентных препаратах на его основе

На данном подэтапе в программное обеспечение автоматического весового титратора-дозатора «Титрион-рН», был интегрирован разработанный алгоритм определения концентрации разветвленного ОГМГ-ГХ в смеси с несколькими азотсодержащими компонентами. Исходя из чего, была проведена проверка валидационных характеристик (правильность и прецизионность), основанных на результатах полученных при осуществлении анализа модельных смесей с несколькими азотсодержащими компонентами, установкой с обновленным программным обеспечением.

При валидации по параметру прецизионность (сходимость, промежуточная

прецизионность) использовали *Состав 2* с двумя азотсодержащими компонентами.

Для оценки прецизионности (сходимость) использовали шесть проб модельной смеси, объемом 10 мл каждая. При определении промежуточной прецизионности два сотрудника в разные дни использовали шесть проб модельной смеси, проводили анализ согласно описанному методу. Оценивали промежуточную прецизионность по величине относительного стандартного отклонения для каждой серии измерений, и критерию Фишера. Так же проводили валидацию определения разветвленного ОГМГ-ГХ, в *Составе 3*, с тремя азотсодержащими компонентами, по параметру правильность.

Правильность оценивали методом добавок [26]: пробу анализируемой смеси разбавляли до уровня концентрации определяемого вещества 70% (0,7 мг/мл ОГМГ-ГХ), затем по 50 мл разбавленного раствора помещали в 9 мерных колб на 100 мл, и в каждую из колб добавляют навеску субстанции, доводя концентрации анализируемого образца до 80% (0,8 мг/мл), 100% (1,0 мг/мл) и 120% (1,2 мг/мл), объем доводили до метки разбавленным раствором, каждому уровню концентраций соответствовали три колбы с анализируемым веществом.

Результаты измерений обработаны математическим методом и являются статистически достоверными (Microsoft Excel 2010).

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА РАЗВЕТВЛЕННОГО ОГМГ-ГХ

3.1. Контроль молекулярно-массовых характеристик разветвленного ОГМГ-ГХ

Для характеристики молекулярной структуры промышленно выпускаемых олигогексаметиленгуанидин-гидрохлоридов (среднечисловой молекулярной массы и степени разветвления) ранее был разработан метод, основывающийся на ^{13}C ЯМР-спектроскопии [12]. Показано, что промышленные ОГМГ представляют собой слаборазветвленные олигомеры с невысокой молекулярной массой.

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 проводить эксперимент ^{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. Предварительно было показано, что для большого количества промышленных образцов ОГМГ-ГХ имеет место прямая корреляция между среднечисловой молекулярной массой и количеством разветвлений, приходящихся на одну молекулу ОГМГ (рис.16).

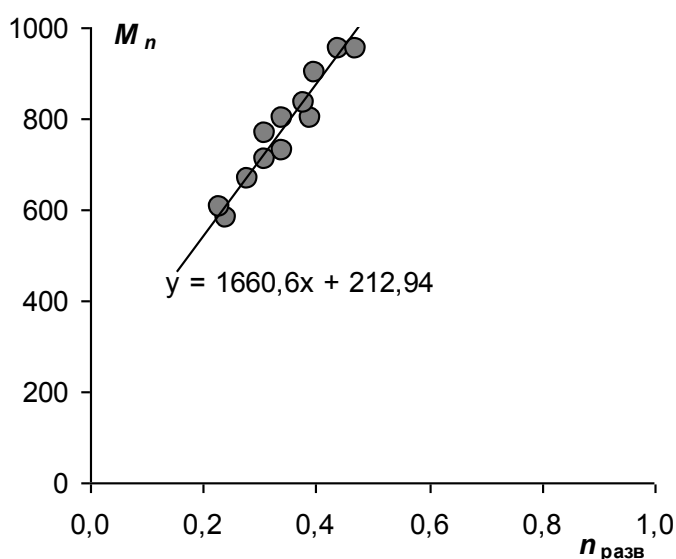


Рис.16. Взаимосвязь между среднечисловой молекулярной массой и количеством разветвлений, приходящихся на одну молекулу ОГМГ, определенными методом ^{13}C ЯМР

Для проведения дальнейших исследований были выбраны пять промышленных серий разветвленного ОГМГ-ГХ с наиболее отличающимися структурными характеристиками (табл.16).

Таблица 16. Характеристики промышленных серий ОГМГ-ГХ

№ серии	Среднечисловая молекулярная масса, Да (M_n)	Степень разветвления ($n_{разв}$)
0513	708	0,31
0613	951	0,47
1113	579	0,24
0214	898	0,40
0614	835	0,38

Для них методом ДСК была определена температура стеклования. На ДСК-термограммах (рис.16), имеющих одинаковый внешний вид, в области 65-85 °С наблюдается стеклование образцов, тогда как другие тепловые эффекты в исследованном интервале температур отсутствуют.

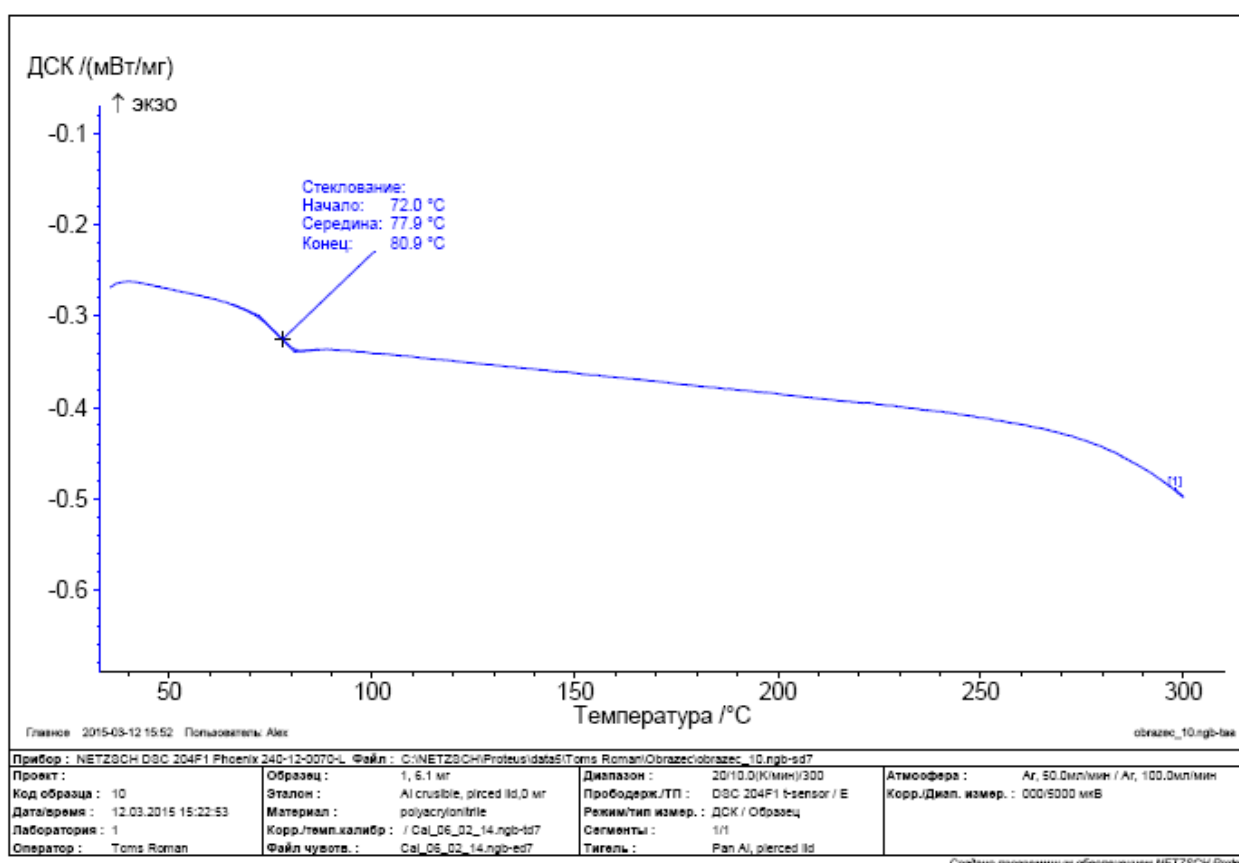


Рис.16. ДСК-термограмма разветвленного ОГМГ-ГХ серии 0613

Сопоставление молекулярных характеристик выбранных образцов ОГМГ-ГХ (табл.16) и определенной для них температуры стеклования показало, что между M_n и T_g существует определенная зависимость (рис.17):

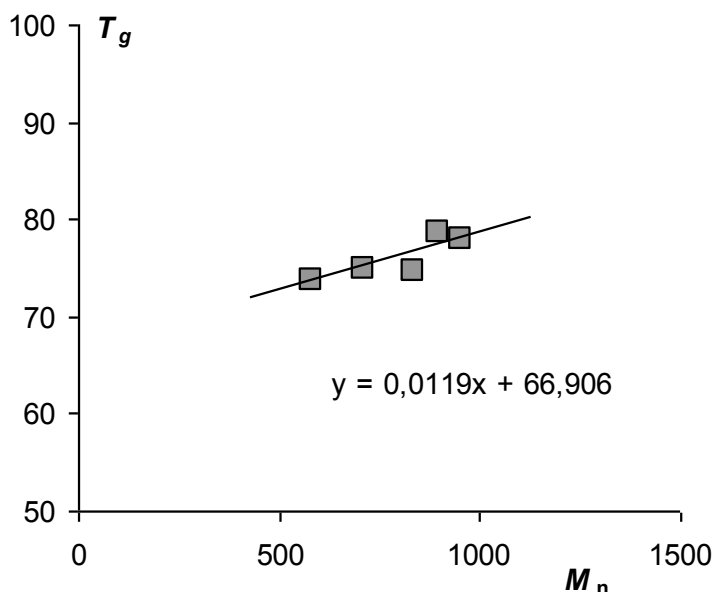


Рис.17. Зависимость среднечисловой молекулярной массы и температурой стеклования в промышленных образцах ОГМГ-ГХ

Исходя из полученных результатов, молекулярную массу ОГМГ можно выразить следующим образом:

$$M_n = \frac{T_g - 66.91}{0.0119} \quad (14)$$

а среднее число разветвлений на молекулу ОГМГ, как:

$$n_{разв} = \frac{T_g - 69.44}{19.76} \quad (15)$$

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.

Проведена оценка зависимости других свойств ОГМГ-ГХ, в частности показателя преломления водных растворов ОГМГ-ГХ, от его молекулярно-массовых характеристик. Результаты соответствующих экспериментов приведены в табл.17.

Таблица 17. Результаты определения ряда характеристик
промышленных серий ОГМГ-ГХ

№ серии	Среднечисловая молекулярная масса, Да (M_n)	Показатель преломления 20% р-ра при 25 °С (n_D)
0313	802	1,3828
0513	708	1,3848
0613	951	1,3823
0813	906	1,3845
1113	579	1,3828
0114	799	1,3825
0214	898	1,3841
0414	604	1,3841
0514	730	1,3835
0614	835	1,3841

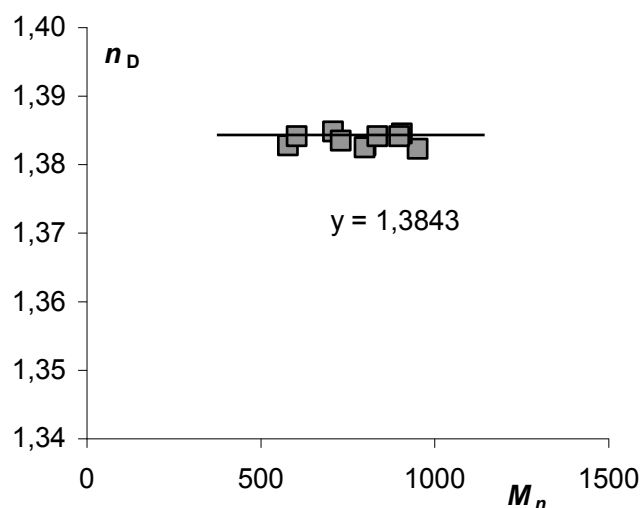


Рис.18. Зависимость молекулярной массы ОГМГ-ГХ
от показателя преломления его 20% водного раствора при 25 °С.

Из представленных на рисунке и в таблице данных, видно, что изменение среднечисловой молекулярной массы не влияет на показатель преломления раствора, так что эта величина не может быть использована для оценки молекулярных характеристик ОГМГ-ГХ.

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

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

Для разработки метода контроля 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 %) (рис.19).

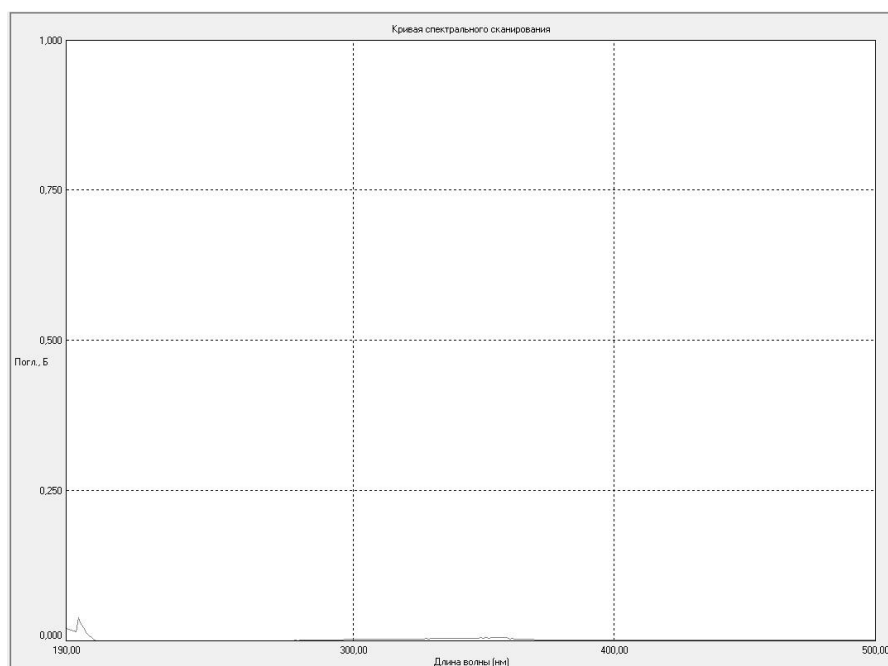
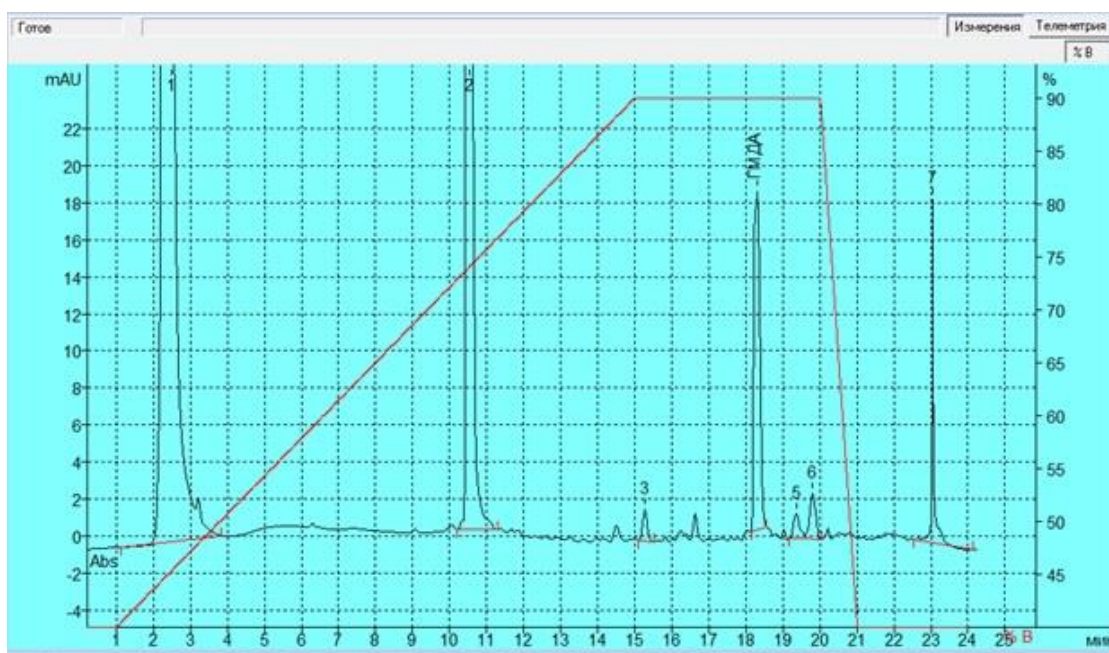


Рис.19. УФ-спектр водного раствора ГМДА

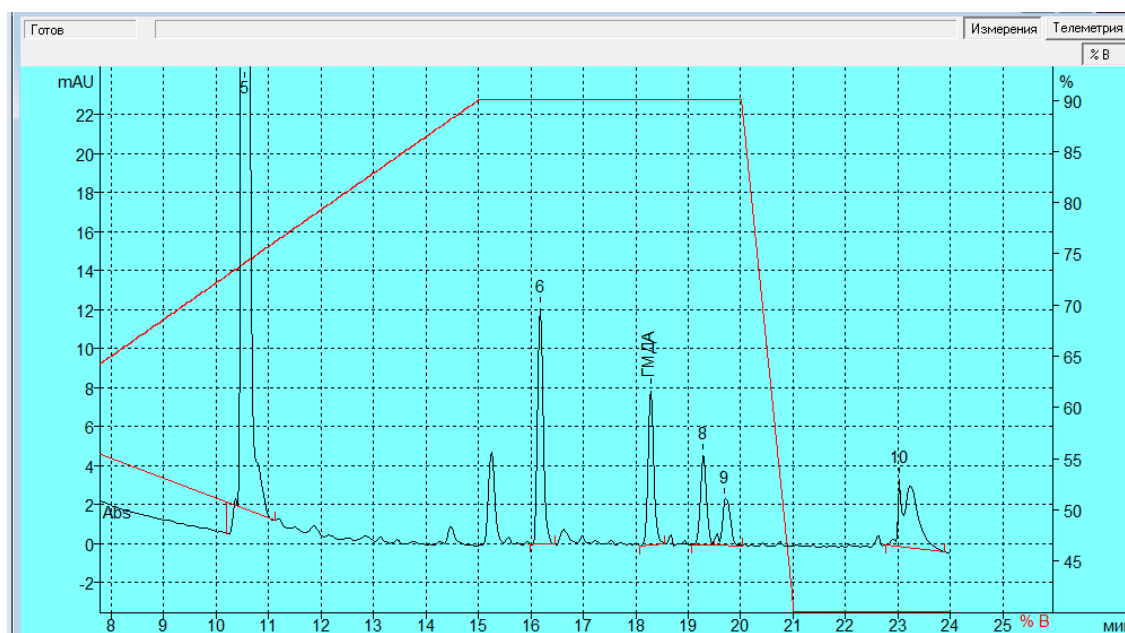
Отсутствие поглощения на нем свидетельствует о невозможности прямого детектирования примеси ГМДА в анализируемом веществе. Поэтому было принято решение использовать ВЭЖХ-метод, с модификацией искомого продукта с помощью оптической метки.

Для осуществление детектирования низких концентраций определяемого вещества при помощи УФ-детектора необходимо использование дериватизирующего агента. Из наиболее доступных дериватизаторов проведены эксперименты с FМОС и ортофталевым альдегидом, которые применяются для количественного определения аминов и аминокислот.

Первоначально проведены испытания с использованием ортофталевого альдегида: на рис.20 приведены хроматограммы свежеприготовленной пробы и ее повторного анализа через 15 минут соответственно.



(a)

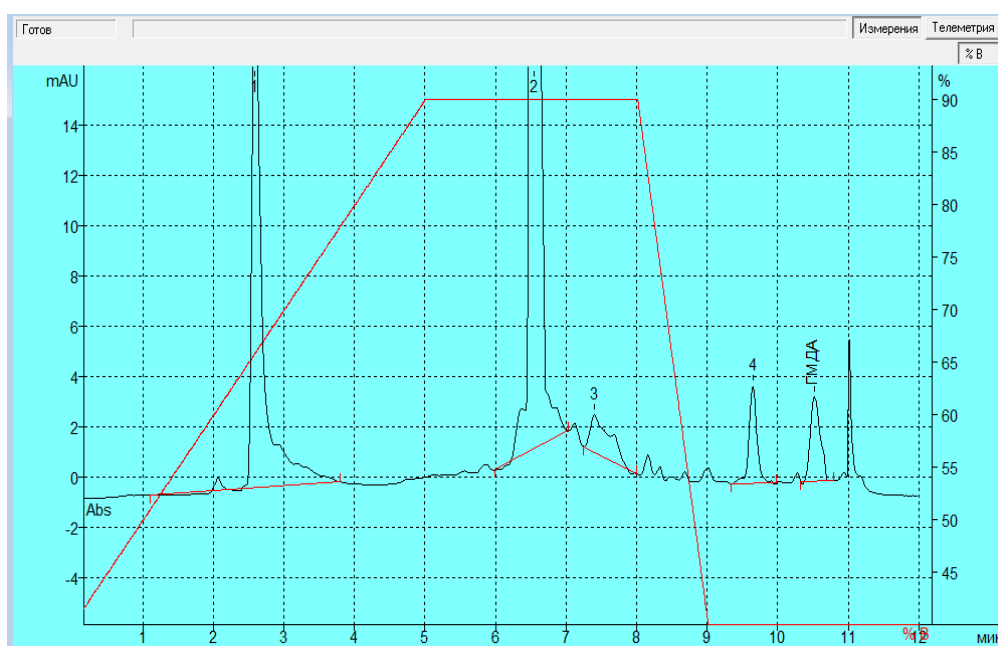


(б)

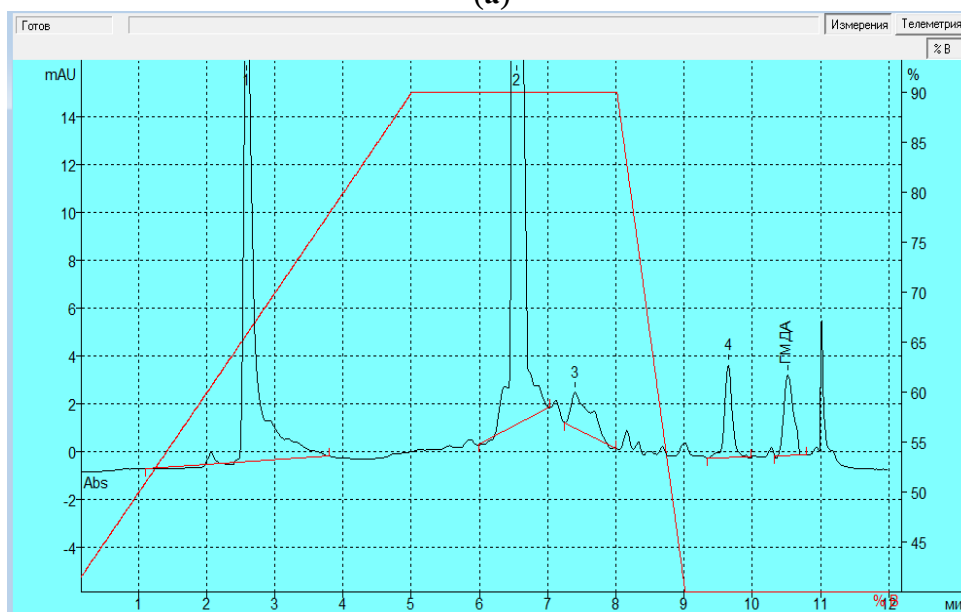
Рис.20. ВЭЖХ-хроматограммы свежеприготовленного (а) раствора ГМДА в присутствии ортофталевого альдегида и этого же раствора через 15 минут (б)

Видно, что при проведении повторного анализа пробы наблюдается уменьшение отклика анализируемого вещества, по сравнению с первоначальным: пло-

щадь пика ГМДА уменьшается с 32,47 до 18,77 mAU·сек. Таким образом, анализируемый препарат при использовании дериватизирующего агента методом ВЭЖХ детектировать возможно, однако применение конкретно ортофталевого альдегида нецелесообразно из-за нестабильности образующегося комплекса. Поэтому были проведены эксперименты с использованием в качестве дериватизирующего агента FMOC. На рис.21 приведены ВЭЖХ-хроматограммы свежеприготовленной пробы и ее повторного анализа через 1 час соответственно.



(а)



(б)

Рис.21. ВЭЖХ-хроматограммы свежеприготовленного (а) раствора ГМДА в присутствии FMOC и этого же раствора через 1 час (б).

Представленные выше хроматограммы свидетельствуют об идентичности отлика анализируемого вещества при первоначальном и повторном (через 1 час) анализе пробы: площади пика ГМДА равных 250,32 mAU·сек в обоих случаях. Таким образом, между анализируемым веществом и дериватизирующим агентом ФМОС образуется устойчивый комплекс. Это, в свою очередь, обеспечивает воспроизводимость количественного определения ГМДА на протяжении длительного времени.

В техническом отношении при выполнении анализа использовалась классическая обращенно-фазовая хроматография, в качестве подвижной фазы применяли смесь ацетонитрил: вода, с проведением анализа в градиентном режиме, с увеличением органической составляющей в ходе анализа. Данные условия проведения способствуют полной десорбции анализируемого вещества олигомерной природы, с поверхности сорбента, тем самым обеспечивая более продолжительный срок службы используемого оборудования.

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

Валидацию и оценку результатов проводили по параметрам и критериям, указанным в табл.7.

ВЭЖХ-хроматограммы растворителя образца, градуировочного раствора и испытуемого раствора ОГМГ-ГХ приведены на рисунках 22, 23 и 24 соответственно.

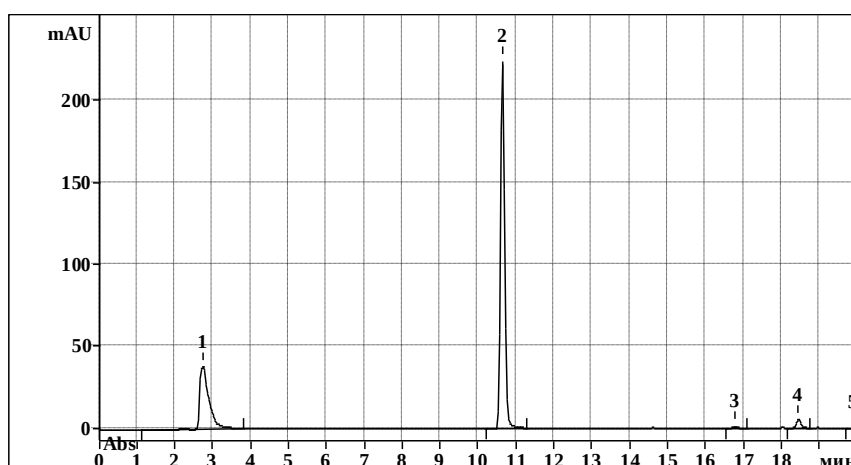


Рис.22. Хроматограмма растворителя образца

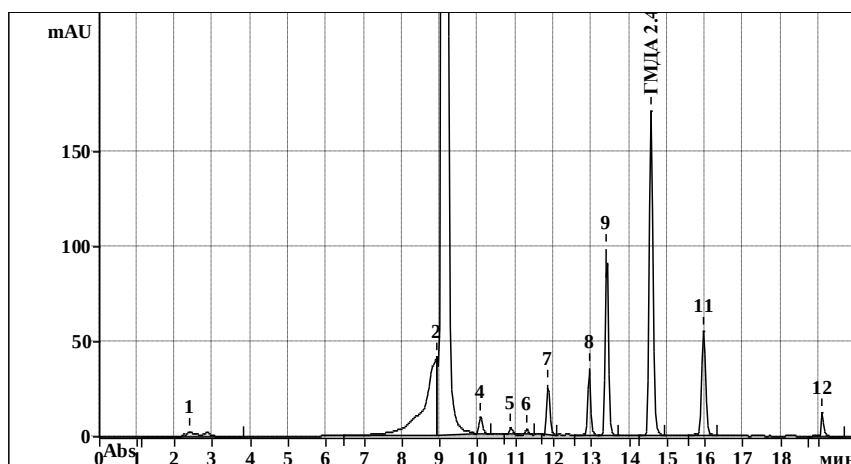


Рис.23. Хроматограмма стандартного раствора

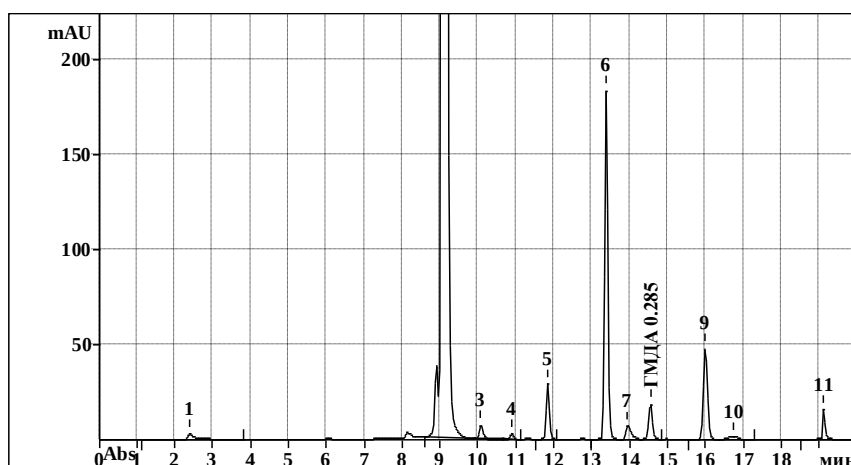


Рис.24. Хроматограмма испытуемого раствора ОГМГ-ГХ

Из представленных хроматограмм видно, что ГМДА имеет четко выраженный пик в области времени удерживания 14,0-15,0 минут, который не перекрывается с пиками, соответствующими другим компонентам системы. На хроматограмме используемого растворителя в этой области времен какие-либо пики также отсутствуют. Из хроматограммы испытуемого раствора установлено что разрешение между пиком ГМДА и соседний 7 пиком составляет 0,67, что менее установленных 1,5. Таким образом, хроматограммы удовлетворяют критерию специфичности методики.

Линейность методики оценивали путем установления линейной зависимости между концентрацией анализируемого вещества и площадью пика. Проводили анализ серии растворов, охватывающей исследуемый диапазон концентраций (в диапазоне 80-120% от предельного значения концентрации определяемой приме-

си в испытуемом растворе). В качестве критерия приемлимости определено, что величина коэффициента корреляции r^2 должна быть $\geq 0,99$. Результаты анализа приведены в табл.18.

Таблица 18. Валидация метода количественного определения содержания примеси ГМДА в разветвленном ОГМГ-ГХ по параметру линейность

Уровень концентрации раствора*	Концентрация ГМДА в растворе	Площадь пика	
%	мкг/мл		
80	1,245	583,29	
80	1,248	586,87	
90	1,4	655,72	
90	1,408	659,35	
100	1,56	727,45	
100	1,582	740,48	
110	1,72	803,03	
110	1,718	801,11	
120	1,875	874,40	
120	1,873	873,49	
Статистические характеристики		Результаты	Критерий приемлемости
Уравнение прямой		y=460,03x+11,542	-
Наклон а		460,03	-
Отрезок на оси ординат b		11,542	-
Коэффициент корреляции r		1,0	≥ 0,99

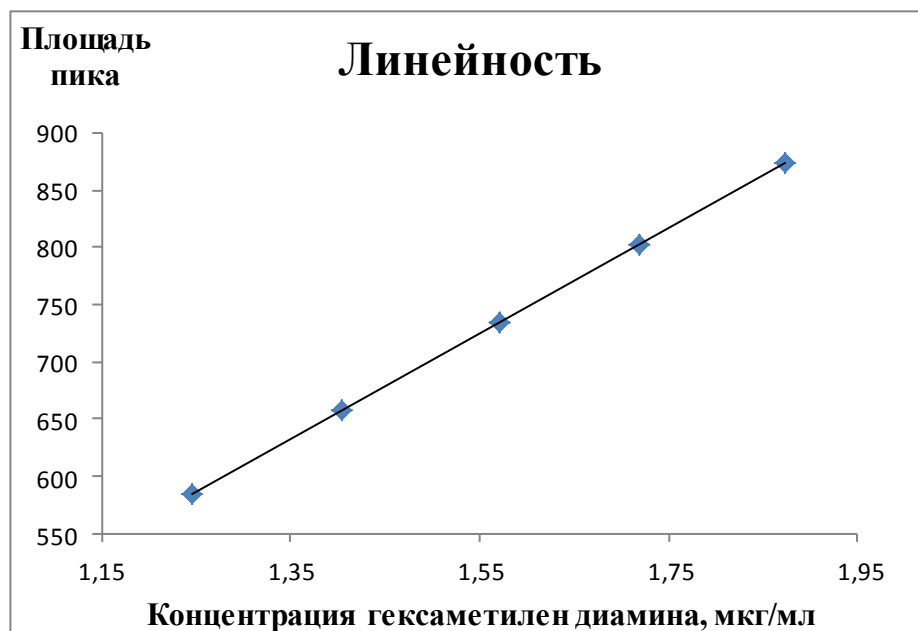


Рис.25. Графическое отображение линейности метода

Рассчитанное значение коэффициента корреляции удовлетворяет критерию приемлемости, что подтверждает о линейность метода.

Для определения точности, проводили девять испытаний (табл.19) с образцами в которых изначально содержалось 1,235 мкг/мл ГМДА, методом добавок [26] доводя концентрацию до требуемого уровня (принимая за 100% проговое значение испытуемого раствора 1,56 мкг/мл).

Таблица 19. Валидация метода количественного определения содержания примеси ГМДА в разветвленном ОГМГ-ГХ по параметру правильность

Уровень концен- трации раствора, %	Концен- трация ГМДА в пробе, мкг/мл	Добавленное количество ГМДА, мкг	Площадь пика	Определенная концентрация ГМДА в пробе, мкг/мл	Отклик
80	1,248	0,013	586,58	1,250	100,16
	1,248	0,013	586,12	1,249	100,08
	1,248	0,013	585,66	1,248	100,00
100	1,560	0,325	731,49	1,565	100,32
	1,560	0,325	730,57	1,563	100,19
	1,560	0,325	729,65	1,561	100,06
120	1,872	0,637	876,86	1,881	100,48
	1,872	0,637	872,72	1,872	100,00
	1,872	0,637	872,72	1,872	100,00
Статистические характеристики			Результаты %		Критерии приемлемости
Среднее значение			100,14		97,5-102,5
Стандартное отклонение			0,17		-
Относительное стандартное отклонение			0,17		≤ 5,0
Верхняя граница доверительного интервала (P=95%)			100,00		должен включать 100% значение
Нижняя граница доверительного интервала (P=95%)			100,30		

Полученные значения статистических характеристик соответствуют предъявленным требованиям, что удовлетворяет критерию правильности.

Прецизионность определяли по параметру сходимости (повторяемости), результаты представлены в табл.20.

Таблица 20. Валидация метода количественного определения содержания примеси ГМДА в разветвленном ОГМГ-ГХ по параметру прецизионность (сходимость)

Обозначение проб в анализе	Площадь пика	Концентрация ГМДА, мкг/мл
1	589,34	1,256
2	590,26	1,258
3	589,34	1,256
4	584,74	1,246
6	591,64	1,261
Статистические характеристики		Результаты
Наименьшая концентрация, мкг/мл		1,261
Наибольшая концентрация, мкг/мл		1,246
Средняя концентрация, мкг/мл		1,2554
Стандартное отклонение, мкг/мл		0,0056
Относительное стандартное отклонение, %		0,449
Доверительный интервал (P=95%), мкг/мл		$\pm 0,0041$

Относительное стандартное отклонение составляет 0,449%, для удовлетворения параметру повторяемости, его значение должно составлять $\leq 4,0\%$ (при $n \geq 6$), так что разработанная методика данному критерию удовлетворяет.

Так же прецизионность подтверждали по параметру промежуточной прецизионности, результаты приведены в табл.21.

Таблица 21. Валидация метода количественного определения содержания примеси ГМДА в разветвленном ОГМГ-ГХ по параметру прецизионность (промежуточная прецизионность)

Обозначение проб в анализе	Сотрудник А, день 1		Сотрудник В, день 2	
	Площадь пика	Концентрация ГМДА, мкг/мл	Площадь пика	Концентрация ГМДА, мкг/мл
1	589,34	1,256	586,58	1,250
2	590,26	1,258	583,36	1,243
3	589,34	1,256	589,34	1,256
4	584,74	1,246	589,34	1,256
6	591,64	1,261	597,16	1,273
Статистические характеристики			Результаты сотрудник А	Результаты сотрудник Б
Наименьшая концентрация, мкг/мл			1,261	1,243
Наибольшая концентрация, мкг/мл			1,246	1,273
Средняя концентрация, мкг/мл			1,2554	1,2556
Стандартное отклонение, мкг/мл			0,0056	0,0111
Относительное стандартное отклонение, %			0,449	0,884
Доверительный интервал (P=95%), мкг/мл			$\pm 0,0041$	+ 0,0089
F(5%; 5;5)=5,05			3,93	

Относительное стандартное отклонение у сотрудника А и сотрудника Б составляют 0,449% и 0,884% соответственно, что составляет менее установленных 4,0% (при $n \geq 6$); рассчитанное значение критерия Фишера, так же не превышает порогового, что подтверждает валидацию метода по параметру промежуточная прицезионность.

Соответствующим образом доказанные линейность, специфичность и прецизионность аналитической методики, подтверждают диапазон применения как параметр валидации.

Предел количественного определения, определяли, используя значения площадей пиков и тангенса угла наклона калибровочной прямой полученные при проведении валидации по параметрам прецизионность (сходимость) и линейность соответственно (табл.22).

Таблица 22. Валидация метода количественного определения содержания примеси ГМДА в разветвленном ОГМГ-ГХ по параметру предел количественного определения

Обозначение проб в анализе	Площадь пика	Тангенса угла наклона калибровочной прямой	
1	589,34	460,03	
2	590,26		
3	589,34		
4	584,74		
6	591,64		
Статистические характеристики		Результаты	Критерий приемлемости
Стандартное отклонение сигнала		2,60	
Предел количественного определения, мкг/мл		0,056	< 1,560

Полученное значение предела количественного определения меньше лимитирующего, что удовлетворяет критерию приемлимости.

Таким образом, проведена валидация количественного определения примеси ГМДА в разветвленном ОГМГ-ГХ по параметрам специфичность, линейность, правильность, прецизионность (сходимость и промежуточная прецизионность), диапазон применения и предел количественного определения. Полученные расчетные и экспериментальные значения, полностью удовлетворяют предъявленным критериям приемлимости, что подтверждает валидацию методики контроля содержания основного вещества в разветвленном ОГМГ-ГХ.

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

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

Для разработки метода контроля ГГХ в разветвленном ОГМГ-ГХ, изначально был снят УФ-спектр водного раствора стандарта вещества (рис.26).

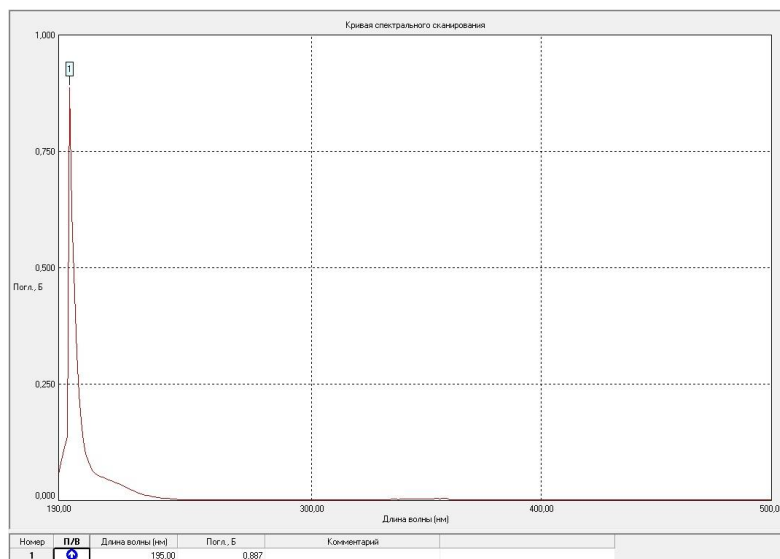
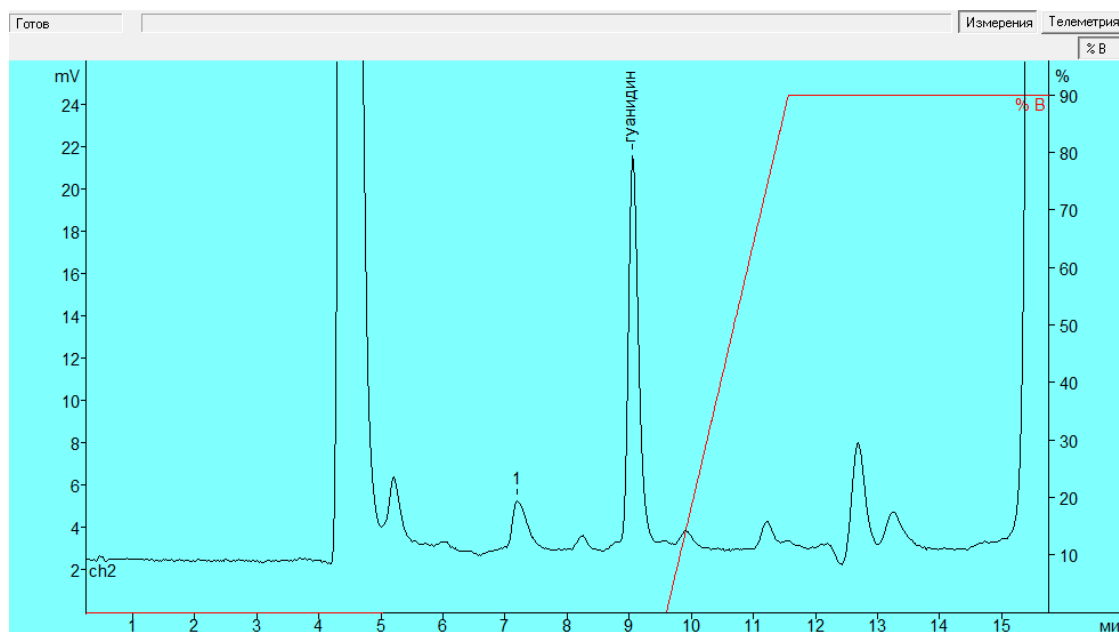


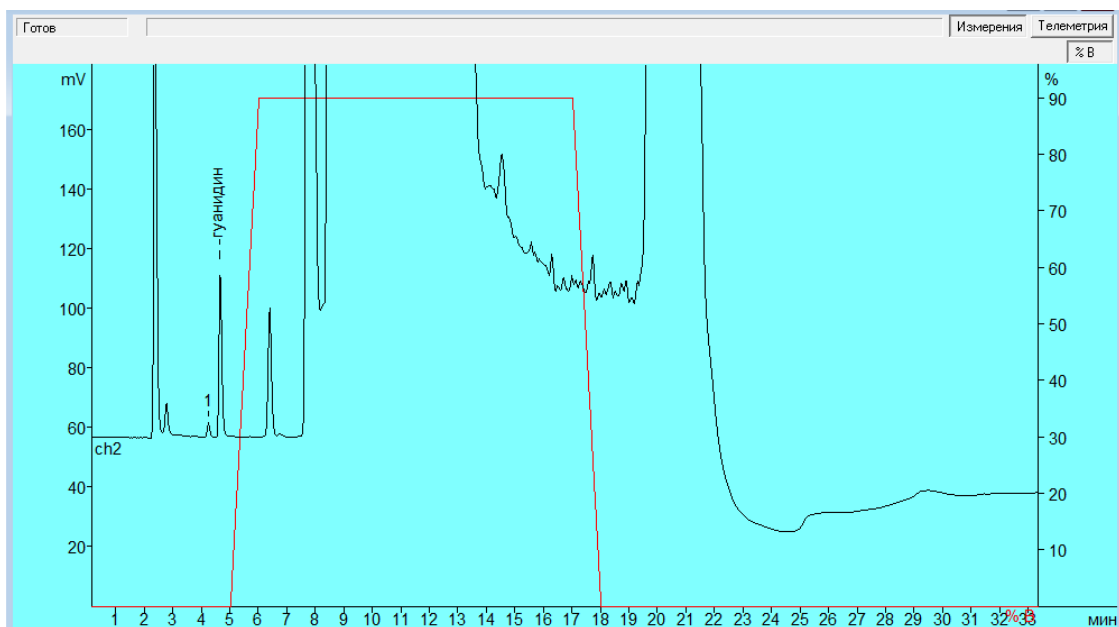
Рисунок 26. УФ-спектр раствора ГГХ

Максимум поглощения у раствора с концентрацией 17,5 мкг/мл наблюдается при длине волны 195 нм, что свидетельствует о возможности 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 использовалась 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 чем, были проведены эксперименты с использованием в качестве ион-парных реагентов пентадецилсульфоната натрия и октодецилсульфоната натрия. Типичные хроматограммы растворов приведены на рис.27.



(а)



(б)

Рис.27. ВЭЖХ-хроматограммы раствора ГГХ с использованием октодецилсульфоната натрия (а) и пентадецилсульфоната натрия (б)

Из хроматограмм видно, что при использовании пентадецилсульфоната натрия в качестве ион-парного агента время выхода пика ГГХ меньше, по сравнению с октодецилсульфонатом натрия. Так же 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.

Приведенные данные свидетельствуют о целесообразности применения пентадецилсульфоната натрия в качестве ион-парного агента, при определении примеси ГГХ в разветвленном ОГМГ-ГХ.

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

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

ВЭЖХ-хроматограммы растворителя образца, градуировочного раствора и испытуемого раствора ОГМГ-ГХ приведены на рисунках 28, 29 и 30 соответственно.

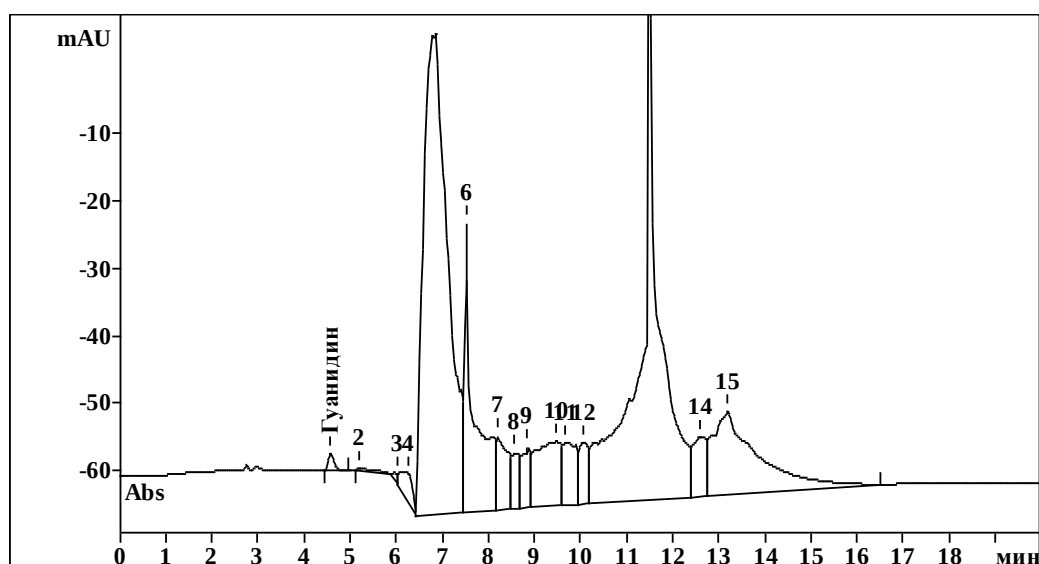


Рис.28. Хроматограмма растворителя образца

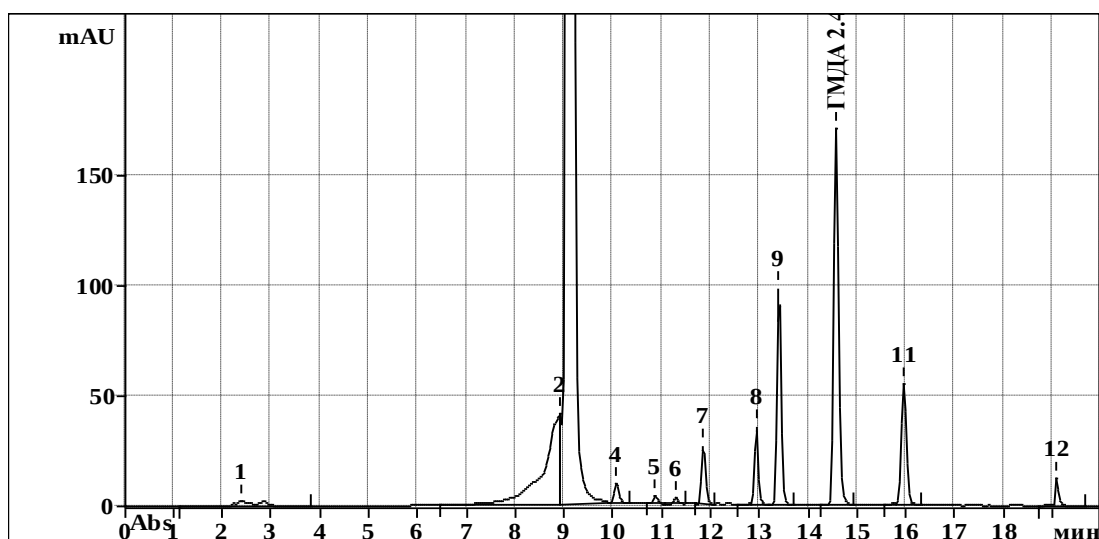


Рис.29. Хроматограмма стандартного раствора ГГХ

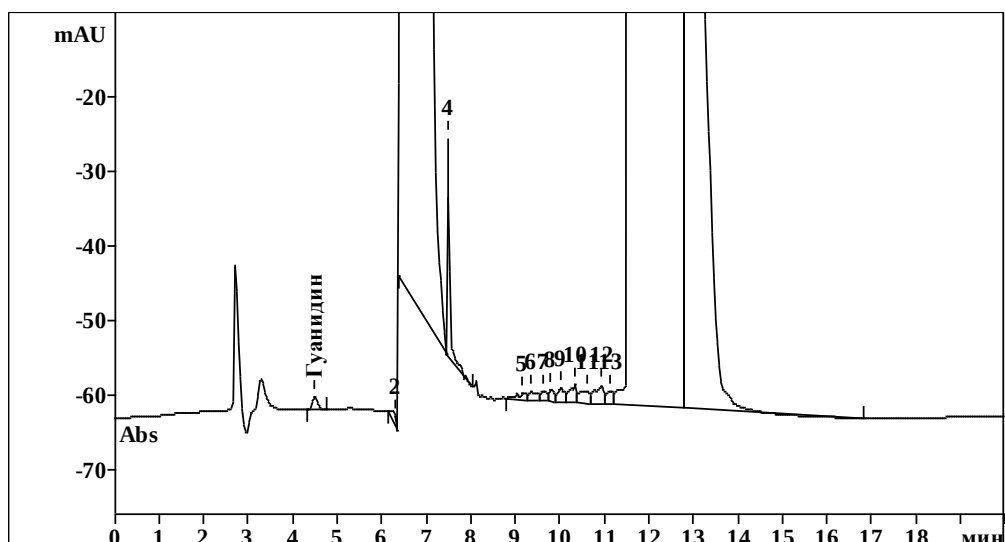


Рис.30. Хроматограмма испытуемого раствора ОГМГ-ГХ

Из представленных хроматограмм видно, что ГГХ имеет четко выраженный пик в области времени удерживания 4,0-4,5 минут, который не перекрывается с пиками, соответствующими другим компонентам системы, на хроматограмме используемого растворителя в этой области времен какие-либо пики также отсутствуют. Из хроматограммы испытуемого раствора установлено что разрешение между пиком ГГХ и соседним пиком составляет 1,0, что менее установленных 1,5. Таким образом, хроматограммы удовлетворяют критерию специфичности методики.

Линейность методики оценивали путем установления линейной зависимости между концентрацией анализируемого вещества и площадью пика. Проводили анализ серий растворов, охватывающей исследуемый диапазон концентраций (в диапазоне 80-120% от предельного значения концентрации определяемой примеси в испытуемом растворе). В качестве критерия приемлимости определено, что величина коэффициента корреляции r^2 должна быть $\geq 0,99$. Результаты анализа приведены в табл.23.

Таблица 23. Валидация метода количественного определения содержания примеси ГГХ в разветвленном ОГМГ-ГХ по параметру линейность

Уровень концентрации раствора*	Концентрация ГГХ в растворе	Площадь пика	
%	мкг/мл		
80	56,0	12,9	
80	56,7	13,2	
90	63,2	14,6	
90	63,0	14,5	
100	70,0	16,1	
100	69,8	16,1	
110	77,2	17,9	
110	77,1	17,8	
120	84,0	19,4	
120	84,0	19,5	
Статистические характеристики		Результаты	Критерий приемлемости
Уравнение прямой		$y = 0,2322x - 0,077$	-
Наклон а		0,2322	-
Отрезок на оси ординат b		0,077	-
Коэффициент корреляции r		0,9998	≥ 0,99

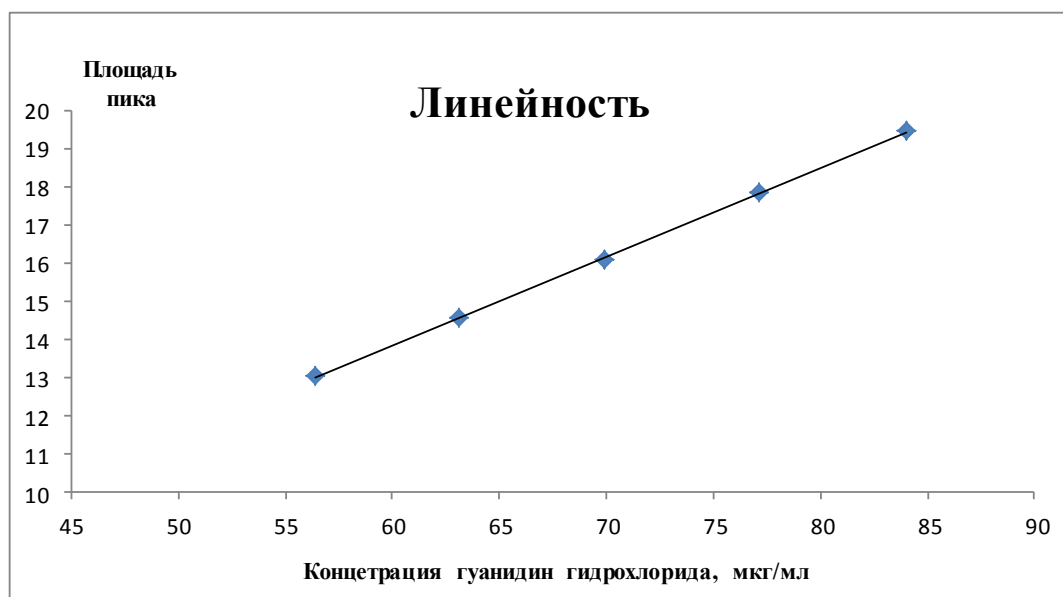


Рис.31. Графическое отображение линейности метода
Рассчитанное значение коэффициента корреляции удовлетворяет критерию приемлемости, что подтверждает о линейность метода.

Для определения точности, проводили девять испытаний (табл.24) с образцами в которых изначально содержалось 50 мкг/мл ГГХ, методом добавок [26]

доводя концентрацию до требуемого уровня (принимая за 100% пороговое значение испытуемого раствора 70 мкг/мл).

Таблица 24. Валидация метода количественного определения содержания примеси ГГХ в разветвленном ОГМГ-ГХ по параметру правильность

Уровень концентрации раствора, %	Концентрация ГГХ в пробе, мкг/мл	Добавленное количество ГГХ, мкг	Площадь пика	Определенная концентрация ГГХ в пробе, мкг/мл	Отклик
80	56,00	11,0	12,89	56,53	100,95
	56,00	11,0	13,08	56,66	100,28
	56,00	11,0	13,01	56,36	100,64
100	70,50	25,0	16,29	70,49	99,99
	70,00	25,0	16,19	70,06	100,08
	70,00	25,0	16,20	70,10	100,14
120	84,00	39,0	19,40	83,88	99,86
	84,00	39,0	19,44	84,05	100,06
	84,00	39,0	19,43	84,01	100,01
Статистические характеристики			Результаты %	Критерии приемлемости	
Среднее значение			100,2	97,5-102,5	
Стандартное отклонение			0,35	-	
Относительное стандартное отклонение			0,35	$\leq 5,0$	
Верхняя граница доверительного интервала (P=95%)			99,95	должен включать 100% значение	
Нижняя граница доверительного интервала (P=95%)			100,49		

Полученные значения статистических характеристик соответствуют предъявленным требованиям, что удовлетворяет критерию правильности.

Прецизионность определяли по параметру сходимости (повторяемости), результаты представлены в табл.25.

Таблица 25. Валидация метода количественного определения содержания примеси ГГХ в разветвленном ОГМГ-ГХ по параметру прецизионность (сходимость)

Обозначение проб в анализе	Площадь пика	Концентрация ГГХ, мкг/мл
1	11,58	50,2
2	12,00	52,0
3	12,30	53,0
4	11,53	50,0
6	11,53	50,0
Статистические характеристики		Результаты
Наименьшая концентрация, мкг/мл		50,2
Наибольшая концентрация, мкг/мл		53,3
Средняя концентрация, мкг/мл		51,1
Стандартное отклонение, мкг/мл		1,49
Относительное стандартное отклонение, %		2,91
Доверительный интервал (P=95%), мкг/мл		$\pm 1,19$

Относительное стандартное отклонение составляет 0,53%, для удовлетворения параметру повторяемости, его значение должно составлять $\leq 4,0\%$ (при $n \geq 6$), так что разработанная методика данному критерию удовлетворяет.

Так же прецизионность подтверждали по параметру промежуточной прецизионности, результаты приведены в табл.26.

Таблица 26. Валидация метода количественного определения содержания примеси ГГХ в разветвленном ОГМГ-ГХ по параметру прецизионность (промежуточная прецизионность)

Обозначение проб в анализе	Сотрудник А, день 1		Сотрудник В, день 2	
	Площадь пика	Концентрация ГГХ, мкг/мл	Площадь пика	Концентрация ГГХ, мкг/мл
1	11,58	50,2	11,42	49,5
2	12,00	52,0	11,53	50,0
3	12,30	53,3	11,88	51,5
4	11,53	50,0	12,11	52,5
6	11,53	50,0	11,95	51,8
Статистические характеристики			Результаты сотрудник А	Результаты сотрудник Б
Наименьшая концентрация, мкг/мл			50,0	49,5
Наибольшая концентрация, мкг/мл			53,3	52,5
Средняя концентрация, мкг/мл			51,1	51,1
Стандартное отклонение, мкг/мл			1,49	1,26
Относительное стандартное отклонение, %			2,91	2,47
Доверительный интервал (P=95%), мкг/мл			$\pm 1,19$	$\pm 1,00$
F(5%; 5;5)=5,05			1,37	

Относительное стандартное отклонение у сотрудника А и сотрудника Б составляют 2,91% и 2,47% соответственно, что составляет менее установленных 4,0% (при $n \geq 6$), рассчитанное значение критерия Фишера, так же не превышает порогового, что подтверждает валидацию метода по параметру промежуточная прецизионность.

Соответствующим образом доказанные линейность, специфичность и прецизионность аналитической методики, подтверждают диапазон применения как параметр валидации.

Предел количественного определения, определяли используя значения площадей пиков и тангенса угла наклона калибровочной прямой полученные при проведении валидации по параметрам прецизионность (сходимость) и линейность соответственно (табл.27).

Таблица 27. Валидация метода количественного определения содержания примеси ГГХ в разветвленном ОГМГ-ГХ по параметру предел количественного определения

Обозначение проб в анализе	Площадь пика	Тангенса угла наклона калибровочной прямой	
1	11,58	0,2322	
2	12,00		
3	12,30		
4	11,53		
6	11,53		
Статистические характеристики		Результаты	Критерий приемлемости
Стандартное отклонение сигнала		2,91	
Предел количественного определения, мкг/мл		14,97	< 70,0

Полученное значение предела количественного определения меньше лимитирующего, что удовлетворяет критерию приемлемости.

Проведена валидация количественного определения примеси ГГХ в разветвленном ОГМГ-ГХ по параметрам специфичность, линейность, правильность, прецизионность (сходимость и промежуточная прецизионность), диапазон применения и предел количественного определения. Полученные расчетные и экспериментальные значения, полностью удовлетворяют предъявленным критериям

приемлимости, что подтверждает валидацию методики контроля содержания основного вещества в разветвленном ОГМГ-ГХ.

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

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

Первоначально была проведена оценка возможности применения традиционных методик для количественного определения ОГМГ-ГХ. Тот факт, что данные методы не учитывают молекулярно-массовых характеристик анализируемых образцов, а так же отсутствие стандартов при построении градуировочных зависимостей могут являться причинами существенной погрешности в конечных результатах определения.

С помощью фотометрического анализа [83], были определены оптические плотности, соответствующие четырем значениям концентраций анализируемых серий разветвленного ОГМГ-ГХ, тем самым каждый образец отдельной серии, использовался в качестве стандарта, и была отражена градуировочная зависимость. Концентрационные зависимости оптической плотности синтезированных образцов ОГМГ-ГХ, полученные методом фотометрии с эозином Н, представлены на рис.32.

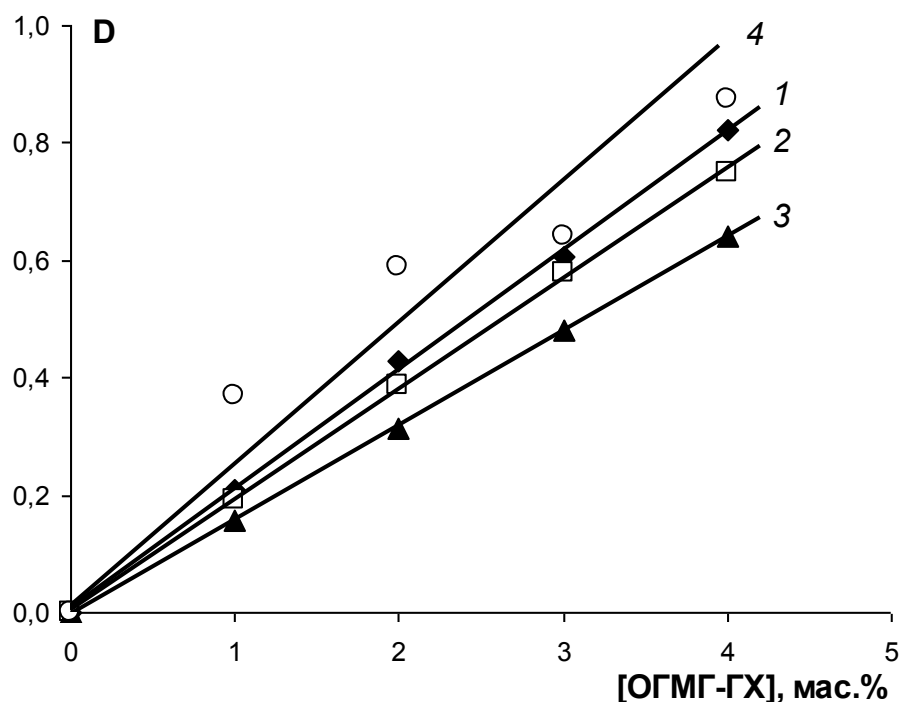


Рис.32. Концентрационные зависимости оптической плотности образцов ОГМГ-ГХ:

(1) Серия № 0313; (2) Серия № 0513; (3) Серия № 0613; (4) Серия № 0813.

Поглощение различных образцов ОГМГ-ГХ описывается прямыми с различным углом наклона. Это не позволяет использовать какой-либо из таких образцов (в том числе предварительно очищенные) в качестве стандарта для реализации фотометрической методики.

Причины такого поведения образцов может помочь понять метод ВЭЖХ. Типичные ВЭЖХ-хроматограммы образцов ОГМГ-ГХ представлены на рис.33.

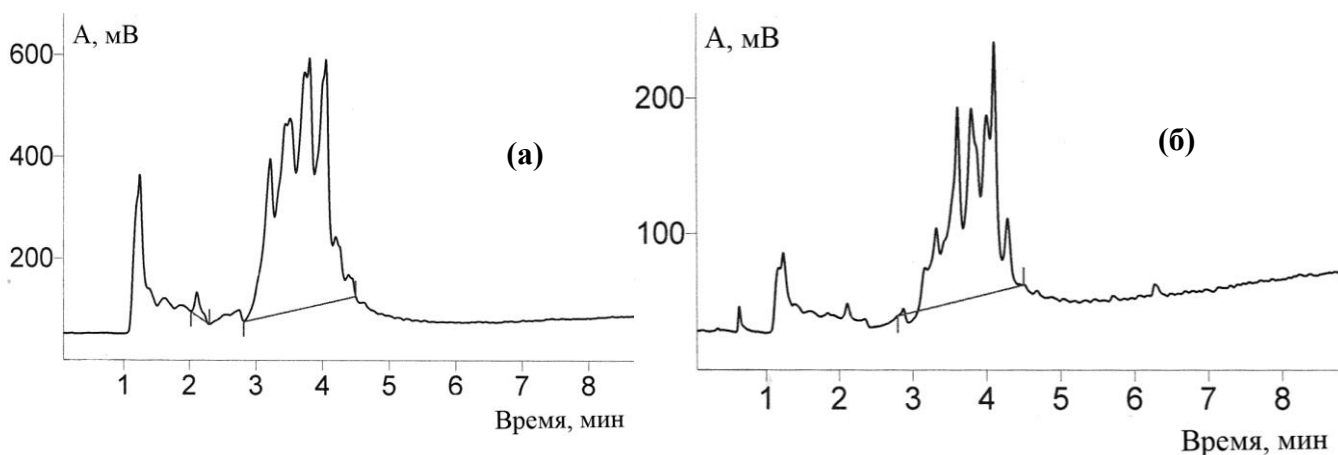


Рис.33. Типичные ВЭЖХ-хроматограммы образцов ОГМГ-Гх.

(а) серия 0313; (б) серия 0513.

На экспериментальных хроматограммах (рис.33) разветвленный ОГМГ-ГХ определяется в виде серии объединенных пиков. Очевидно, это обусловлено молекулярно-массовым распределением образцов ОГМГ-ГХ, представляющих собой олигомеры. Согласно [21], молекулярно-массовое распределение образцов ОГМГ-ГХ может быть довольно широким: M_w/M_n – до 9,3. Кроме молекулярной массы, определенную погрешность может вносить и степень разветвленности молекул ОГМГ-ГХ.

Учитывая, что в основе оценки содержания основного вещества методами и фотометрии и ВЭЖХ лежит закон Бугера-Ламберта-Бера [15], невозможность применения этих методов можно объяснить тем, что коэффициент экстинкции для набора олигомергомологов непостоянен и меняется с фракционным составом. Это обуславливает невысокую точность методов фотометрии и ВЭЖХ при оценке содержания основного вещества в синтезированных образцах ОГМГ-ГХ, что делает нецелесообразным их дальнейшее применение, в рамках проводимых исследований.

Невозможность применения используемых ранее методов для оценки содержания основного вещества в синтезированных образцах ОГМГ-ГХ вызывает необходимость разработки альтернативного метода определения этого показателя. Одним из простых и доступных методов, пригодных в данном случае, является рефрактометрия [11]. Рефрактометрическое определение содержания основного вещества основано на линейной зависимости разности показателей преломления раствора и растворителя от концентрации вещества в растворе. Экспериментальные зависимости показателя преломления растворов синтезированных образцов ОГМГ-ГХ от их концентрации приведены на рис.34.

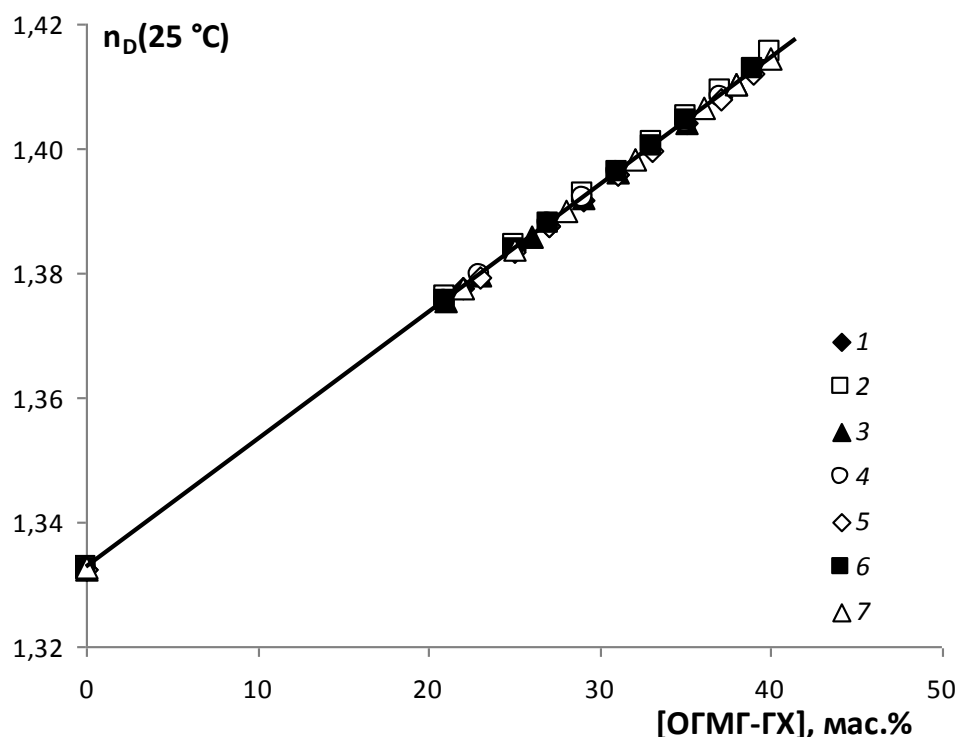


Рис.34. Концентрационные зависимости показателя преломления образцов ОГМГ-ГХ: (1) Серия № 0313; (2) Серия № 0513; (3) Серия № 0613; (4) Серия № 0813; (5) Серия № 1113; (6) Серия № 0114; (7) Серия № 0214.

Из него видно, что фракционный состав образцов ОГМГ-ГХ разных серий практически не влияет на концентрационную зависимость показателя преломления, что дает основание использовать ее в качестве калибровочной зависимости для количественного определения ОГМГ-ГХ в образцах. Статистическая обработка результатов рефрактометрии (табл.28) показывает, что между градуировочными коэффициентами анализируемых серий разница незначительна, точность аппроксимации близка к единице, а показатель преломления растворителя (воды) совпадает со справочной величиной $n_D(25\text{ °C})=1,33250\pm0,00005$ [8].

Таблица 28. Градуировочные коэффициенты промышленных серий ОГМГ-ГХ

№ серии	Коэффициент а	Доверительный интервал ($p=0.95, f=4$)	Коэффициент b	Величина достоверности аппроксимации R^2
0313	0,00205	$2,6 \cdot 10^{-6}$	1,3324	1,000
0513	0,00207	$1,4 \cdot 10^{-6}$	1,3326	0,998
0613	0,00205	$2,5 \cdot 10^{-6}$	1,3325	0,999
0813	0,00205	$1,9 \cdot 10^{-6}$	1,3325	0,998
1113	0,00204	$1,8 \cdot 10^{-6}$	1,3325	0,999
0114	0,00206	$1,3 \cdot 10^{-6}$	1,3324	1,000
0214	0,00205	$1,5 \cdot 10^{-6}$	1,3326	0,998
Общие значения для массива				
Коэффициент а			0,00205	
Доверительный интервал ($p=0,95, f=28$)			$2,2 \cdot 10^{-6}$	
Коэффициент b			1,3325	
Средняя величина достоверности аппроксимации R^2			0,99	

В соответствии с полученной калибровочной кривой, содержание основного вещества (Р) в образцах ОГМГ-ГХ следует определять по следующей формуле:

$$P = \frac{(n_D^{25} - n_{D0}^{25}) \cdot m}{F \cdot a} \quad (16)$$

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

n_{D0}^{25} – показатель преломления воды очищенной 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 $F=0,00205$.

В ходе анализа модельных смесей, в которых содержание примесей остаточных мономеров (ГГХ и ГМДА) превышает содержание максимального значения в несколько раз, определяли влияние мономеров на конечный результат проводимого анализа. Испытания проводились на контрольной (а – раствор олигомера серии

0414, не содержащей примесей) и испытуемой (b – контрольная проба с навеской мономера) пробах, всего 12 образцов (табл.29).

Таблица 29. Результаты анализа модельных смесей ОГМГ-ГХ серии 0414 со свободными мономерами ГМДА и ГГХ

№ п/п	Масса, г				ГГХ: ОГМГ-ГХ, %	ГМДА: ОГМГ-ГХ, %	n_D (25 °C)	P, %	$(P_b - P_a)^*$, %
	раствора	ОГМГ- ГХ	ГГХ	ГМДА					
1	a	6,8352	1,6473	–	–	–	1,3812	98,6	0,83
	b	5,8151	1,1300	0,0170	–	1,50	1,3721	99,4	
2	a	5,0092	1,0092	–	–	–	1,3731	98,3	1,51
	b	4,6836	1,4534	0,0409	–	2,80	1,3958	99,4	
3	a	5,2764	2,0507	–	–	–	1,4129	100,9	2,40
	b	4,6123	1,7900	0,0391	–	2,18	1,4140	102,4	
4	a	6,5540	1,3305	–	–	–	1,3745	100,9	1,70
	b	5,9800	1,2140	–	0,0150	–	1,3749	101,9	
5	a	5,4360	1,5764	–	–	–	1,3910	98,4	0,86
	b	4,8830	1,4161	–	0,0355	–	1,3915	99,2	
6	a	5,3670	2,1190	–	–	–	1,4149	101,8	1,91
	b	4,6123	1,9300	–	0,0350	–	1,4215	103,8	

* абсолютная ошибка измерения

Полученные результаты свидетельствуют о том, что относительная ошибка измерения, связанная с внесением примесей, очень близка к точности метода измерения основного вещества (максимальная относительная ошибка метода составляет 1,91% - таблица 29).

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

Валидацию и оценку результатов проводили по параметрам и критериям указанным в табл.7. В соответствии с [3,26] недостаток специфичности испытания можно компенсировать другим дополнительным испытанием, исходя из чего для осуществления валидации по параметру специфичность использовали метод ЯМР ^{13}C – спектроскопии. В качестве критерия приемлимости определено, что интенсивность сигналов спектра ЯМР ^{13}C анализируемого образца (рис.35) должна со-

ответствовать интенсивности сигналов типичного спектра ЯМР ^{13}C разветвленно-го ОГМГ-ГХ (рис.15).

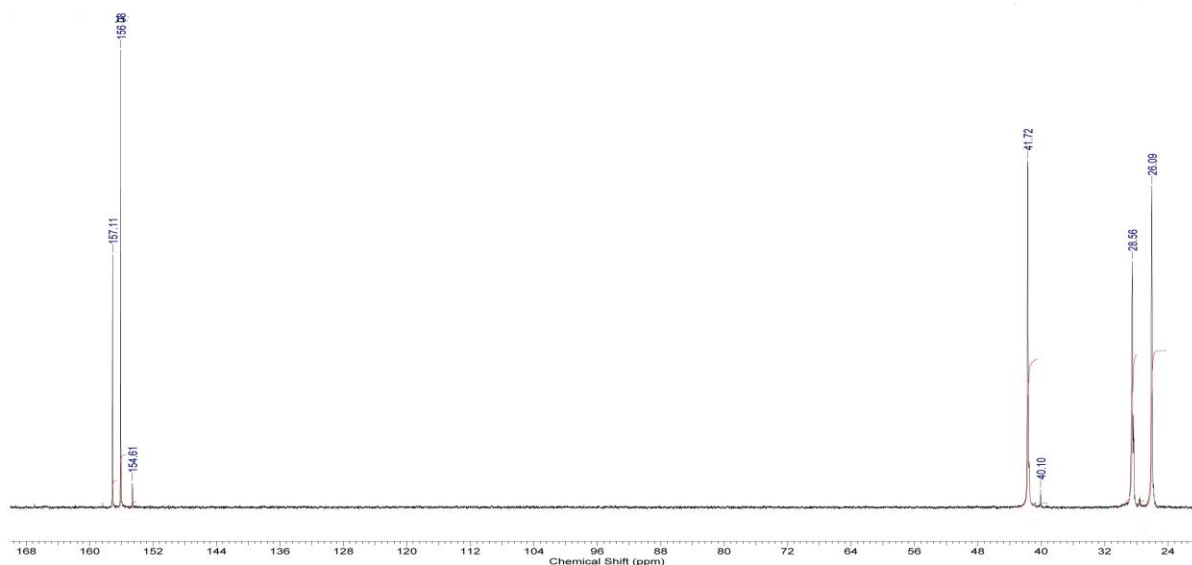


Рис.35. Спектр ЯМР ^{13}C раствора анализируемого образца в D_2O

На представленном выше рисунке наблюдается соответствие сигналов интенсивностей, что удовлетворяет критерию приемлимости.

Линейность методики оценивали путем установления линейной зависимости между концентрацией анализируемого вещества и показателем преломления раствора. Анализировали серии растворов, охватывающие исследуемый диапазон концентраций (в диапазоне 80-120% от концентрации действующего вещества в испытуемом растворе). В качестве критерия приемлимости определено, что величина коэффициента корреляции r^2 должна быть $\geq 0,99$. Результаты анализа приведены в табл.30.

Таблица 30. Валидация метода определения основного вещества
по параметру линейность

Уровень концентрации раствора, %	Концентрация ОГМГ-ГХ в растворе, %	n_D^{25} – показатель преломления раствора	
80	24,3	1,3820	
80	24,0	1,3820	
90	27,0	1,3876	
90	27,0	1,3878	
100	30,0	1,3935	
100	29,5	1,3933	
110	33,2	1,4005	
110	33,1	1,4004	
120	36,0	1,4063	
120	36,6	1,4075	
Статистические характеристики		Результаты	Критерий приемлемости
Уравнение прямой		$y = 0,002x + 1,3326$	-
Наклон а		0,002	-
Отрезок на оси ординат b		1,3325	-
Коэффициент корреляции r		0,9996	$\geq 0,99$

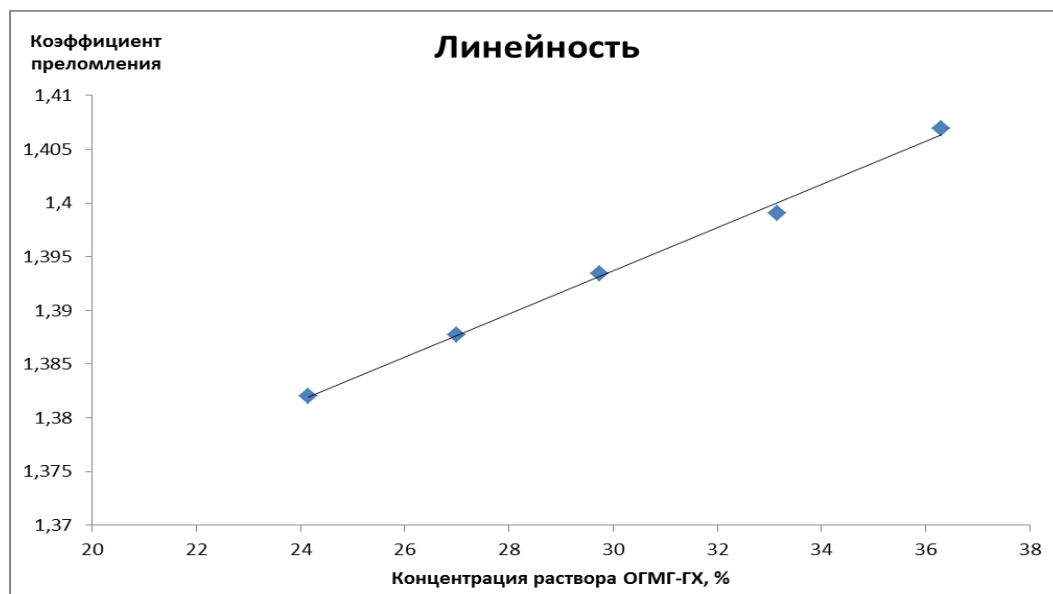


Рисунок 36 - Графическое отображение линейности метода

Рассчитанное значение коэффициента корреляции удовлетворяет критерию приемлемости, что подтверждает линейность метода.

Для определения точности проводили девять испытаний (табл.31) с образцами, содержащими ОГМГ-ГХ в соответствии с требуемым уровнем концентраций.

Таблица 31. Валидация метода определения содержания основного вещества по параметру правильность

Уровень концентрации раствора, %	Концентрация ОГМГ-ГХ в растворе	Навеска ОГМГ-ГХ, г	n_D^{25} – показатель преломления раствора	Определенное содержание ОГМГ-ГХ в растворе, г	Отклик
80	24,00	1,2000	1,3821	1,2097	100,8
	24,12	1,2060	1,3817	1,2000	99,5
	24,06	1,2030	1,3817	1,2000	99,8
100	30,08	1,5040	1,3948	1,5195	101,0
	29,98	1,4990	1,3933	1,4829	98,9
	30,02	1,5010	1,3940	1,5000	99,9
120	36,00	1,8000	1,4067	1,8097	100,5
	36,00	1,8000	1,4136	1,8085	100,5
	36,04	1,8020	1,4071	1,8195	101,0
Статистические характеристики				Результаты %	Критерии приемлемости
Среднее значение				101,2	97,5-102,5
Стандартное отклонение				3,3	-
Относительное стандартное отклонение				3,2	≤ 5,0
Верхняя граница доверительного интервала (P=95%)				99,2	должен включать 100% значение
Нижняя граница доверительного интервала (P=95%)				103,3	

Полученные значения статистических характеристик соответствуют предъявленным требованиям, что удовлетворяет критерию правильности.

Прецизионность определяли по параметру сходимости (повторяемости), результаты представлены в табл.32.

Таблица 32. Валидация метода определения содержания основного вещества по параметру прецизионность (сходимость)

Обозначение проб в анализе	Показатель преломления	Содержание основного вещества, %
1	1,3939	99,80
2	1,3925	99,70
3	1,3938	100,3
4	1,3953	101,0
6	1,3943	100,5
Статистические характеристики		Результаты
Наименьшая концентрация, %		99,70
Наибольшая концентрация, %		101,0
Средняя концентрация, %		100,26
Стандартное отклонение, %		0,53
Относительное стандартное отклонение, %		0,53
Доверительный интервал (P=95%), %		$\pm 0,42$

Относительное стандартное отклонение составляет 0,53%, для удовлетворения параметру повторяемости, его значение должно составлять $\leq 4,0\%$ (при $n \geq 6$), так что разработанная методика данному критерию удовлетворяет.

Так же прецизионность подтверждали по параметру промежуточной прецизионности, результаты приведены в таблице 33

Таблица 33. Валидация метода определения содержания основного вещества по параметру прецизионность (промежуточная прецизионность)

Обозначение проб в анализе	Сотрудник А, день 1		Сотрудник В, день 2	
	Показатель преломления	Содержание основного вещества, %	Показатель преломления	Содержание основного вещества, %
1	1,3939	99,80	1,3947	100,8
2	1,3925	99,70	1,3936	99,9
3	1,3938	100,3	1,3934	100,2
4	1,3953	101,0	1,3921	100,7
6	1,3943	100,5	1,3937	101,5
Статистические характеристики			Результаты сотрудник А	Результаты сотрудник Б
Наименьшая концентрация, %			99,70	99,9
Наибольшая концентрация, %			101,0	101,5
Средняя концентрация, %			100,26	100,62
Стандартное отклонение, %			0,53	0,62
Относительное стандартное отклонение, %			0,53	0,61
Доверительный интервал (P=95%), %			$\pm 0,42$	$\pm 0,49$
F(5%; 5;5)=5,05			0,75	

Относительное стандартное отклонение у сотрудника А и сотрудника Б составляют 0,53% и 0,61% соответственно, что составляет менее установленных 4,0% (при $n \geq 6$); рассчитанное значение критерия Фишера, так же не превышает порогового, что подтверждает валидацию метода по параметру промежуточная прецизионность.

Таким образом, проведена валидация количественного определения по параметрам специфичность, линейность, правильность и прецизионность (сходимость и промежуточная прецизионность). Полученные расчетные и экспериментальные значения, полностью удовлетворяют предъявленным критериям приемлимости, что подтверждает валидацию методики контроля содержания основного вещества в разветвленном ОГМГ-ГХ.

В ходе проведенных исследований выявлены связи и закономерности между молекулярной структурой (молекулярная масса и степень разветвления) и свойствами (показатель преломления, температура стеклования) разветвленного ОГМГ-ГХ. Разработан экспресс-метод оценки молекулярно-массовых характеристик олигомера по его температуре стеклования. Так же, разработаны методы контроля примесных соединений (ГГХ и ГМДА) и содержания основного вещества в разветвленном ОГМГ-ГХ, проведена их валидация, полученные экспериментальные и рассчитанные результаты, соответствуют предъявленным ранее критериям приемлимости. На основе описанных методов составлена нормативная документация (проект НД) для субстанции (Приложение 5) и технические условия для осуществления ее производства (Приложение 7).

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДА И УСТАНОВКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАЗВЕТВЛЕННОГО ОГМГ-ГХ В МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ПРЕПАРАТАХ НА ЕГО ОСНОВЕ

Представленные в табл.34. составы применялись в качестве моделей препаратов на основе разветвленного ОГМГ-ГХ (концентрация данного вещества, присутствующего в приготовленных составах, взята как наиболее эффективная, из определенных при проведении собственных доклинических исследований ЗАО «Институт Фармацевтических Технологий»).

Таблица 34. Составы модельных смесей

№ п/п	Вещество	Концентрация азотсодержащего соединения в смеси, мг/мл	Молекулярная масса азотсодер- жащего соедине- ния, г/моль	Молекулярная масса атомов N, г/моль
Состав 1				
1	Разветвленный ОГМГ-ГХ	1	177	42,021
2	Вспомогательные вещества: Вода			
Состав 2				
1	Разветвленный ОГМГ-ГХ	1	177	42,021
2	Бензалкония хлорид	0,5	357	14,007
3	Вспомогательные вещества: ГМПЦ ЕЗ ФБР Вода			
4				
5				
Состав 3				
1	Разветвленный ОГМГ-ГХ	1	177	42,021
2	Бензалкония хлорид	0,5	357	14,007
3	Лидокаина гидрохлорид	1,5	228,8	28,014
4	Вспомогательные вещества: Ментол Глицерин Этанол Вода			
5				
6				
7				

4.1 Разработка и валидация метода определения низких концентраций разветвленного ОГМГ-ГХ

Разработанный рефрактометрический метод определения основного вещества в разветвленном ОГМГ-ГХ позволяет анализировать его водные растворы в диапазоне концентрациях 20–40%, что делает этот метод неприменимым для анализа многокомпонентных смесей, содержащих низкие концентрации ОГМГ-ГХ ($\leq 20\%$). Наиболее оптимально в данной ситуации использовать метод Кьельдаля [8], так как он является одним из наиболее известных и распространенных методов количественного определения азота в органических соединениях, к которым относится и ОГМГ-ГХ. Данный способ позволяет с высокой точностью определять малые концентрации азота в органических веществах, где азот связан с углеродом или водородом. Поэтому была проведена экспериментальная работа по адаптации метода Кьельдаля для количественного определения сравнительно низких концентраций разветвленного ОГМГ-ГХ (1 мг/мл). В качестве анализируемого образца использовали *Состав 1*. Воспроизведение анализа до стадии титрования проводилось по стандартной методике [8]. При проведении титрования в первоначальных экспериментах использовали смешанный индикатор (метиленовый красный+метиленовый синий), что предполагает осуществление процесса титрования, до визуальной фиксации точки эквивалентности. Результаты проведенных определений представлены в табл.35.

Таблица 35. Результаты определения разветвленного ОГМГ-ГХ, при осуществлении титрования с использованием смешанного индикатора

№ определения	Объем пошедший на титрование, мл	Определенное количество азота, мг/мл	Содержание разветвленного ОГМГ-ГХ, мг/мл
1	1,98	0,2772	1,17
2	1,55	0,217	0,92
3	1,63	0,2282	0,96
4	1,33	0,1862	0,79
5	1,82	0,2548	1,07

При проведении нескольких определений разветвленного ОГМГ-ГХ в одной и той же пробе изменение окраски раствора отмечалось при разном расходе титранта (табл.35). Хотя разница в результатах и незначительна, однако при рас-

чете конечной концентрации разветвленного ОГМГ-ГХ она может внести ошибку $\pm 20\%$, от реального содержания вещества в пробе. Это может происходить из-за визуальной фиксации изменения окраски раствора: аналитик не всегда может четко уловить границу изменения окраски. Наличие данной погрешности может стать причиной несоответствия предлагаемого метода ряду валидационных параметров (линейность, правильность, прецизионность). Поэтому целесообразно проводить потенциометрическое титрование, которое, благодаря определяемой зависимости объема титранта от уровня pH анализируемого раствора, позволит выявить точку эквивалентности, позволяющую точно фиксировать объем израсходованного титранта.

Для проведения последующих экспериментов использовался автоматический весовой титратор-дозатор «Титрион-pH», который обеспечивает шаг дозирования титранта (10 мкл) меньше, чем для бюретки (0,05 мл = 50 мкл). Это позволяет существенно повысить точность определения по сравнению с титрованием, выполняемым аналитиком в присутствии индикатора. Применение в качестве сенсора стеклянного электрода исключает субъективный фактор индивидуальных особенностей цветовосприятия. Кроме того, автоматический режим работы устройства повышает экспрессность анализа и исключает ошибки, связанные с «человеческим фактором» (квалификация аналитика, степень утомления и т.д.).

После подбора оптимального шага дозирования титранта, при анализе *Состава №1*, были зарегистрированы кривые титрования. Регистрация осуществлялась как на самом приборе (рис.37), так и при последующей обработке полученных данных при синхронизации прибора с ПК (рис.38).

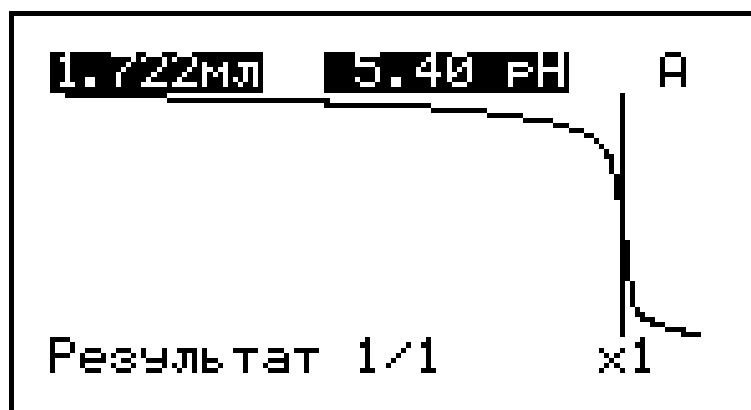
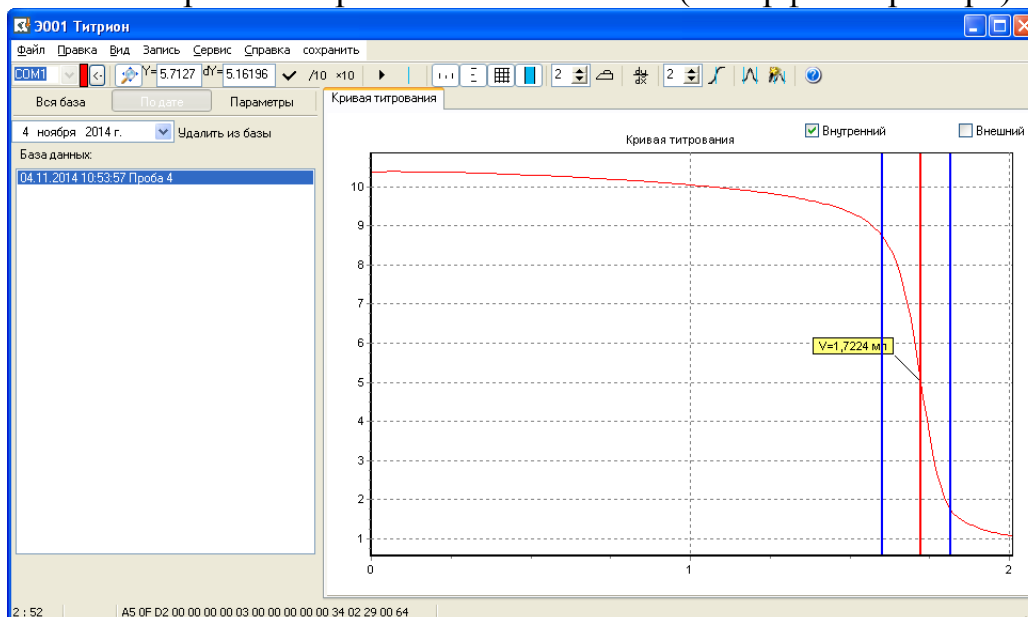


Рис.37. Кривая титрования *Состав № 1* (интерфейс прибора)Рис.38. Кривая титрования *Состав № 1* (при синхронизации с ПК)

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

Используя полученные данные, был осуществлен анализ пяти проб *Состава № 1*, результаты проведенных определений представлены в табл.36.

Таблица 36. Результаты определения разветвленного ОГМГ-ГХ
путем потенциометрического титрования

№ определения	Объем пошедший на титрование, мл	Определенное количество азота, мг/мл	Содержание разветвленного ОГМГ-ГХ, мг/мл
1	1,74	0,2436	1,03
2	1,72	0,2408	1,02
3	1,75	0,245	1,03
4	1,76	0,2464	1,04
5	1,74	0,2436	1,03

Полученные результаты достаточно воспроизводимы, и в основном соответствуют реальному содержанию разветвленного ОГМГ-ГХ в препарате, что свидетельствует о целесообразности реализации экспериментально полученных подходов в разрабатываемой методике определения.

Валидацию метода контроля низких концентраций разветвленного ОГМГ-ГХ проводили с использованием в качестве анализируемого образца *Состав № 1*. Параметры и критерии валидации указаны в табл.7.

При проведении специфичности методом ЯМР, был получен спектр, идентичный рис.35 (который удовлетворял критерию специфичности), так как для приготовления *Состава 1* использовалась та же серия ОГМГ-ГХ, что и в валидации метода определения основного вещества.

Линейность методики оценивали путем установления зависимости между концентрацией анализируемого вещества и объемом титранта, израсходованным при определении азота методом Къельдаля. Проводи анализ серии растворов, охватывающей исследуемый диапазон концентраций (в диапазоне 80-120% от концентрации действующего вещества в испытуемом растворе). Результаты соответствующего исследования представлены в табл.37.

Табл.37. Валидация метода определения содержания разветвленного ОГМГ-ГХ по параметру линейность

Уровень концентрации раствора, %	Концентрация ОГМГ-ГХ в модельной смеси, мг/мл	Объем 0,05 М раствора H_2SO_4 , мл
80	0,80	1,39
80	0,81	1,41
90	0,89	1,55
90	0,90	1,57
100	1,00	1,74
100	1,01	1,76
110	1,11	1,90
110	1,10	1,85
120	1,20	2,05
120	1,21	2,00
Статистические характеристики		Результаты
Уравнение прямой		$y=1,549x+0,1684$
Наклон a		1,549
Отрезок на оси ординат b		0,1684
Коэффициент корреляции r		0,995

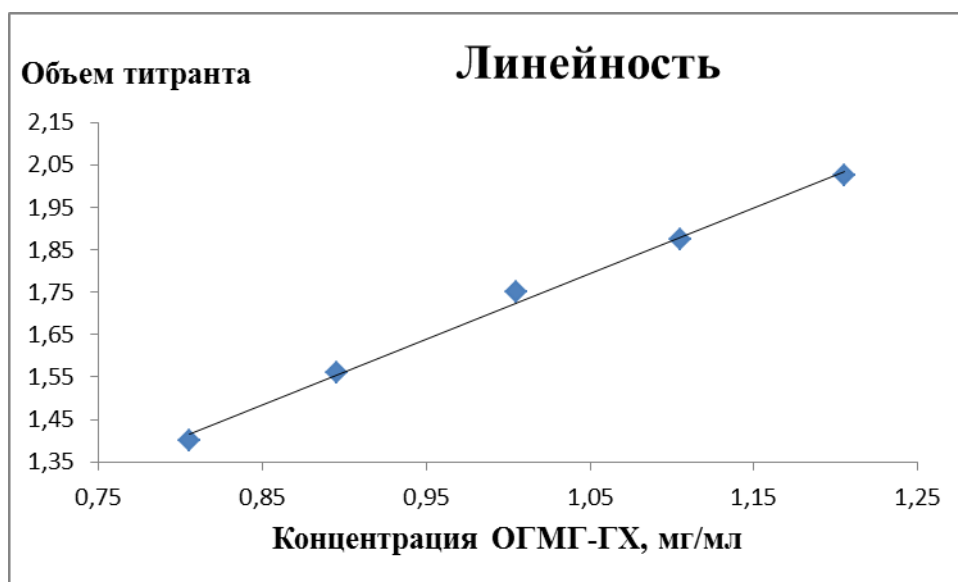


Рис.39. Графическое отображение линейности метода

Рассчитанное значение коэффициента корреляции удовлетворяет критерию приемлемости, что подтверждает линейность метода.

Для определения точности проводили девять испытаний (табл.38) с образцами содержащими ОГМГ-ГХ в соответствии с требуемым уровнем концентраций.

Таблица 38. Валидация метода определения содержания разветвленного ОГМГ-ГХ по параметру правильность

Уровень концентрации раствора, %	Объем 0,05 М раствора H_2SO_4 , мл	Содержание ОГМГ-ГХ, мг/мл		От-клик, %
		определенное	заданное	
80	1,39	0,79	0,82	98,5
	1,39	0,79	0,80	99,0
	1,40	0,80	0,81	98,0
100	1,69	0,98	0,99	99,6
	1,72	1,00	1,00	99,8
	1,72	1,00	1,02	98,8
120	2,01	1,19	1,19	100,3
	2,04	1,203	1,20	100,0
	1,98	1,17	1,20	97,5
Статистические характеристики			Результаты, %	Критерии приемлемости
Среднее значение			101,2	97,5-102,5
Стандартное отклонение			1,43	-
Относительное стандартное отклонение			1,42	$\leq 5,0$
Верхняя граница доверительного интервала (P=95%)			102,2	должен включать 100% значение
Нижняя граница доверительного интервала (P=95%)			100,0	

Полученные значения статистических характеристик соответствуют предъявленным требованиям, что удовлетворяет критерию правильности.

Прецизионность определяли по параметру сходимости (повторяемости), результаты представлены в табл.39.

Таблица 39. Валидация метода определения содержания разветвленного ОГМГ-ГХ по параметру прецизионность (сходимость)

Обозначение проб в анализе	Объем 0,05 М раствора H_2SO_4 , мл	Содержание ОГМГ-ГХ в препарате мг/мл
1	1,71	0,995
2	1,70	0,989
3	1,71	0,995
4	1,73	1,008
6	1,70	0,989
Статистические характеристики		Результаты
Наименьшая концентрация, мг/мл		0,995
Наибольшая концентрация, мг/мл		1,008
Средняя концентрация, мг/мл		0,9952
Стандартное отклонение, мг/мл		0,008
Относительное стандартное отклонение, %		0,77%
Доверительный интервал (P=95%), мг/мл		$\pm 0,006$

Относительное стандартное отклонение составляет 1,0%; поскольку для удовлетворения параметру повторяемости его значение должно составлять $\leq 4,0\%$ (при $n \geq 6$), разработанная методика данному критерию удовлетворяет.

Также прецизионность подтверждали по параметру промежуточной прецизионности, результаты приведены в табл.40. Относительное стандартное отклонение у сотрудника А и сотрудника Б составляют 0,77% и 0,55% соответственно, что составляет менее установленных 4,0% (при $n \geq 6$), рассчитанное значение критерия Фишера, так же не превышает порогового, что подтверждает валидацию метода по параметру промежуточная прецизионность.

Таблица 40. Валидация метода определения содержания разветвленного ОГМГ-ГХ по параметру Прецизионность (промежуточная прецизионность)

Обозначение проб в анализе	Сотрудник А, день 1		Сотрудник В, день 2	
	Объем 0,05 М раствора H ₂ SO ₄ , мл	Содержание ОГМГ-ГХ в препарате мг/мл	Объем 0,05 М раство- ра H ₂ SO ₄ , мл	Содержание ОГМГ-ГХ в препарате мг/мл
1	1,71	0,995	1,72	1,002
2	1,70	0,989	1,72	1,002
3	1,71	0,995	1,71	0,995
4	1,73	1,008	1,7	0,989
6	1,70	0,989	1,71	0,995
Статистические характеристики			Результаты сотрудник А	Результаты сотрудник Б
Наименьшая концентрация, %			0,995	0,989
Наибольшая концентрация, %			1,008	1,002
Средняя концентрация, %			0,9952	0,997
Стандартное отклонение, %			0,008	0,006
Относительное стандартное отклонение, %			0,77%	0,55
Доверительный интервал (P=95%), %			± 0,006	± 0,004
F(5%; 5;5)=5,05			1,78	

Проведена валидация количественного определения содержания разветвленного ОГМГ-ГХ по параметрам линейность, правильность и прецизионность (сходимость и промежуточная прецизионность). Полученные расчетные и экспериментальные значения, полностью удовлетворяют предъявленным критериям приемлемости, что подтверждает валидацию методики.

4.2. Разработка установки определения разветвленного ОГМГ-ГХ в 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 следующей формулы расчета:

$$C = (W - (\sum_{i=1}^n \frac{14 \cdot z_i}{Mr_i} \cdot c_i)) \cdot K \quad (17)$$

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-рН» [22] (рис.39). Предложенное техническое решение позволяет автоматизировать ряд процессов осуществляющихся на последней стадии анализа – титровании, а так же автоматически производить расчеты, определяя содержание разветвленного ОГМГ-ГХ в анализируемом образце.



Рис.39. Установка для титрования (автоматическая) «Титрион-рН»

Алгоритм работы установки при определении концентрации разветвленного ОГМГ-ГХ в модельной смеси *Состав № 3* показан на рис.40.

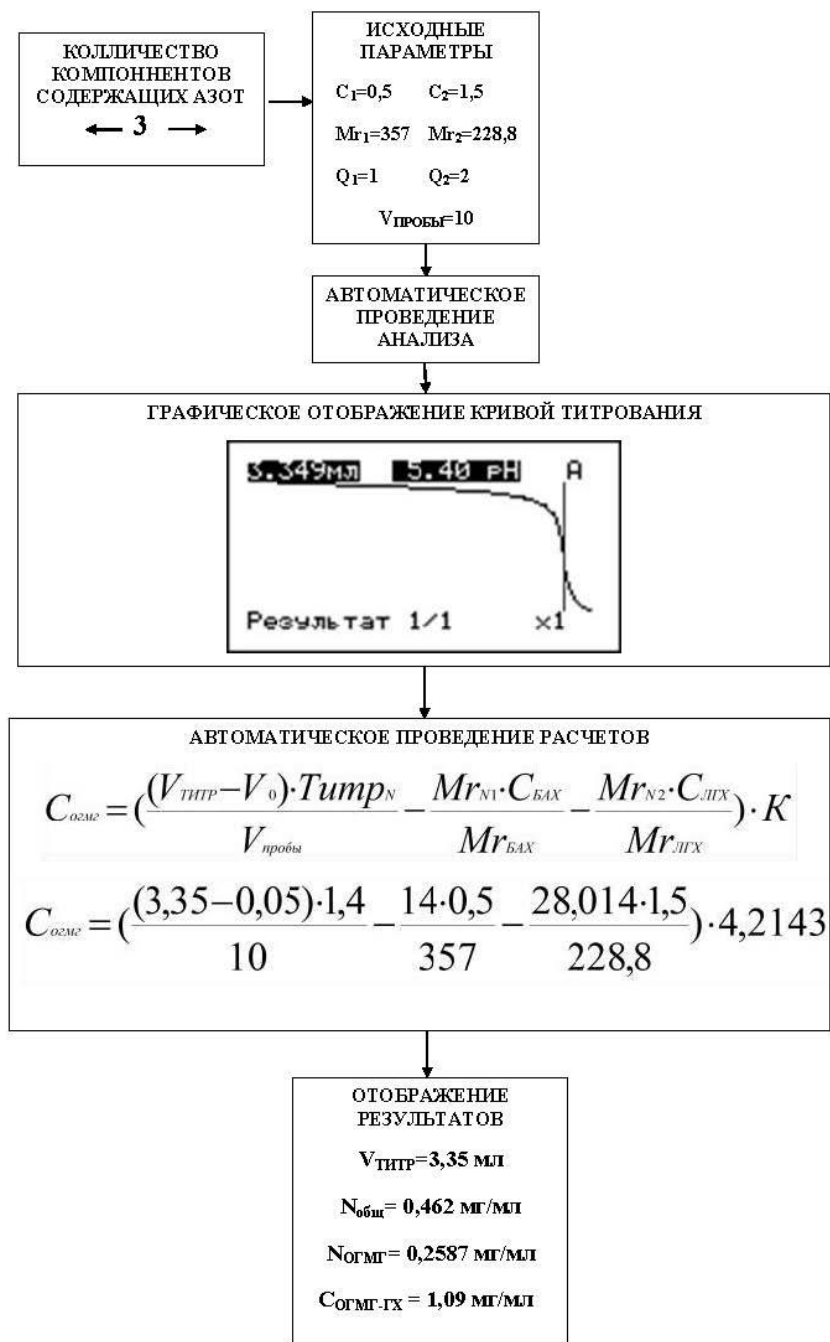


Рис.40. Алгоритм работы установки для титрования (автоматической) «Титрион-рН» при определении разветвленного ОГМГ-ГХ

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

Валидацию определения разветвленного ОГМГ-ГХ осуществляли в модельной смеси *Состав 2* с двумя азотсодержащими компонентами (разветвленный ОГМГ-ГХ и бензалкония хлорид), по параметру прецизионность (сходимость).

Для оценки прецизионности использовали шесть проб модельной, объемом 10 мл каждая. Результаты анализа представлены в табл.41.

Таблица 41. Валидация метода определения содержания содержания разветвленного ОГМГ-ГХ ,в модельной смеси *Состав 2*, по параметру прецизионность (сходимость)

Обозначение проб в анализе	Содержание ОГМГ-ГХ, в препарате мг/мл
1	0,98
2	1,03
3	1,07
4	1,11
6	1,03
Статистические характеристики	
Наименьшая концентрация, мг/мл	0,98
Наибольшая концентрация, мг/мл	1,11
Средняя концентрация, мг/мл	1,04
Стандартное отклонение, мг/мл	0,05
Относительное стандартное отклонение	0,05
Доверительный интервал (P=95%), мг/мл	$\pm 0,0012$

Прецизионность определяли по параметру повторяемости, результаты представлены в табл.41. Относительное стандартное отклонение составляет 0,05; поскольку для удовлетворения параметру повторяемости его значение должно составлять $\leq 4,0$ (при $n \geq 6$), разработанная методика данному критерию удовлетворяет.

Прецизионность подтверждали по параметру промежуточной прецизионности, результаты приведены в табл.42.

Таблица 42 - Валидация метода определения содержания содержания разветвленного ОГМГ-ГХ, в модельной смеси *Состав 2*, по параметру прецизионность (промежуточная прецизионность)

Обозначение проб в анализе	Сотрудник А, день 1	Сотрудник В, день 2
	Содержание ОГМГ-ГХ, в препарате мг/мл	Содержание ОГМГ-ГХ, в препарате мг/мл
1	0,98	1,05
2	1,03	1,00
3	1,07	0,96
4	1,11	1,10
6	1,03	1,10
Статистические характеристики		Результаты сотрудник А
		Результаты сотрудник Б
Наименьшая концентрация, %		0,98
Наибольшая концентрация, %		1,11
Средняя концентрация, %		1,04
Стандартное отклонение, %		0,05
Относительное стандартное отклонение		0,05
Доверительный интервал (P=95%), %		$\pm 0,039$
F(5%; 5;5)=5,05		1,61

Относительное стандартное отклонение у сотрудника А и сотрудника Б составляют 0,05 и 0,06 соответственно, что составляет менее установленных 4,0 (при $n \geq 6$), рассчитанное значение критерия Фишера, так же не превышает порогового, что подтверждает валидацию метода по параметру промежуточная прецизионность.

Так же проводили валидацию определения разветвленного ОГМГ-ГХ в модельной смеси *Состав 3*, с тремя азотсодержащими компонентами, по параметру правильность. В качестве критериев приемлемости определены: среднее значение фактора отклика должно находиться в пределе 97,5-102,5%, относительное стандартное отклонение $\leq 5,0\%$, доверительный интервал должен включать 100% значение. Результаты анализа представлены в таблице 43.

Таблица 43. Валидация метода определения содержания разветвленного ОГМГ-ГХ, в модельной смеси *Состав 3*, по параметру правильность

Уровень концентрации ОГМГ-Гх в образце, %	Содержание ОГМГ-ГХ, мг/мл		Отклик
	определенное	заданное	
80	0,80	0,81	103,8
	0,80	0,80	101,3
	0,81	0,82	101,3
100	0,98	0,99	101,0
	1,05	1,00	100,0
	1,00	1,00	102,0
120	1,20	1,20	100,0
	1,20	1,21	99,2
	1,19	1,20	102,7
Статистические характеристики			Результаты
Среднее значение, %			100,04
Стандартное отклонение, %			1,88
Относительное стандартное отклонение, %			1,88
Верхняя граница доверительного интервала (P=95%)			100,00
Нижняя граница доверительного интервала (P=95%)			100,10

Полученные значения статистических характеристик соответствуют предъявленным требованиям, что удовлетворяет критерию правильности.

Представленные 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.

Проведенные исследования позволили разработать методику количественного определения низких концентраций разветвленного ОГМГ-ГХ, положенную в основу алгоритма работы программно-аппаратного комплекса, что делает возможным проводить количественное определение низких концентраций ОГМГ-ГХ в многокомпонентных препаратах на его основе. Указанные достижения являются существенным заделом для проведения дальнейших исследований в области разработки эффективных препаратов на основе разветвленного ОГМГ-ГХ.

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 СОКРАЩЕНИЙ

D₂O – дейтерия оксид

FMOC-9 – Флуоренилметилхлорформиат

GMP (Good Manufacturing Practice) – Надлежащая производственная практика

IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) – международная неправительственная организация в области химии

АТФазы – аденозинтрифосфатазы

БАХ – бензалкония хлорид

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГГХ – гуанидиногидрохлорид

ГМДА – гексаметилендиамин

ГМПЦ ЕЗ – гидроксиметилпропилцеллюлоза марки ЕЗ

ГФ – государственная фармакопея

ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота

ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия

ЕД – единица действия

ЗППП – заболевания, передаваемые половым путем

ЛГХ – лидокаина гидрохлорид

ЛД₅₀ – полулетальная доза вещества

ЛС – лекарственное средство

МЗК – минимальная задерживающая концентрация

ММ – молекулярная масса

НД – нормативный документ

ОГМГ-ГХ – олигогексаметиленгуанидина гидрохлорид

ОГМГ – олигогексаметиленгуанидин

ОГМГсукц – олигогексаметиленгуанидина сукцинат

ПАВ – поверхностно-активное вещество

ПГМГ – Полигексаметиленгуанидин гидрохлорид

ПГМГ-гл – глюконат полигексаметиленгуанидина

ПГМГ-ГХ – полигексаметиленгуанидина гидрохлорид

ПГМГ-ф – фосфат полигексаметиленгуанидина

ПДК – Предельно допустимая концентрация

ПДУ – Предельно допустимый уровень

ТСХ – тонкослойная хроматография

УФ-спектроскопия – спектроскопия в ультрафиолетовой области

ФБР – фосфатный буферный раствор

ФЭК – фотоэлектроколориметр

ЧАС – Четвертичные аммонийные соединения

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. А.С. СССР 247463, 1969. Бактерицидное средство / Жук Д.С., Гембицкий П.А., Скворцова Е.К., Лиманов В.Е., Нехорошева А.Г., Волкова А.П.
2. Базарон, Л.У. Строение и свойства водорастворимых поликатионов: автореф. дис. канд. хим. наук : 02.00.06/ Базарон Лариса Улзытовна. – М., 1992. – 27 с.
3. Береговых, В.В. Валидация аналитических методик для производителей лекарств / В.В. Береговых. – М.: Литтерра, 2008. – 132 с.
4. Воинцева, И.И., Полигуанидины – дезинфекционные средства и полифункциональные добавки / И.И. Воинцева, П.А. Гембицкий – М.: ЛКМ-пресс, - 2009. - 304 с.
5. Гембицкий, П.А. О синтезе поли(алкиленгуанидинов) и поли(алкиленбигуанидинов) / Гембицкий П.А., Корявов Я.И., Ерусалимский Н.М., Лиманов В.Е., Жук Д.С. // ЖПХ – 1975. – Т. 48(8). – С. 1833.
6. Гембицкий, П.А. Полимерный биоцидный препарат полигексаметиленгуанидин / П.А. Гембицкий, И.И. Воинцева – Запорожье: Полиграф, 1998. - 42 с.
7. ГОСТ 32533-2013 Гексаметилендиамин. Определение содержания в воздушной среде. – М: Стандартинформ, 2013. – 16 с.
8. Государственная фармакопея Российской Федерации. Ч.1. / РФ. - 12-е изд. - М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2008. – 704 с.
9. Жолдакова, З.И. Новые сведения о токсичности и опасности химических и биологических веществ: гуанидин гидрохлорид / З.И. Жолдакова, Е.Е. Одинцов, Н.В. Харчевникова и соавт. // Токсикологический вестник. – 2004. - №6. – С. 34-35.
10. Инструкция №4/10 «Препарата антимикробного БИОПАГ» для дезинфекции поверхностей и воды» [Электронный ресурс] / URL: http://www.biopag.ru/index.php?option=com_content&view=article&id=71&Itemid=16 (дата обращения 01.10.2014).
11. Иоффе, Б.В. Рефрактометрические методы химии / Б.В. Иоффе. – Л.: Химия – 1983. - С. 8-10.
12. Кедик, С.А. Структура и молекулярно-массовые характеристики гидрохлоридов олигогексаметиленгуанидинов / С.А. Кедик, О.А. Бочарова, Ха Кам Ань,

- А.В. Панов, И.П. Седишев, Е.С. Жаворонок, Т.И. Тимофеева, В.В. Суслов, С.Г. Бексаев // Химико-фармацевтический журнал. – 2010. – Т. 44(10). – С. 40-45.
13. Кондрашов, С.А. Гигиеническая оценка нового полимерного флокулянта ПГМГ / С.А. Кондрашов // Гигиена и санитария. – 1992. - №3. - С. 11-13.
14. Кузнецова, Л.С. «Полисепт» – полимерный биоцид пролонгированного действия. / Л.С Кузнецова – М.: - МГУПБ, 2001. - С.68-153.
15. Лебедева, М.И. Аналитическая химия и физико-химические методы анализа / Лебедева М.И. – Тамбов: Издательство ТГТУ, 2005. - С.96-99.
16. Массовая концентрация полигексаметиленгуанидин-гидрохлорида в питьевой воде. Измерение фотометрическим методом: свидетельство о аттестации методики измерений № 08-47/301-01.00143.2011.
17. Матюшина, Г.П. Создание новых дезинфицирующих салфеток / Г.П. Матюшина // Фармация. - 2004. - №6. - С. 32-35.
18. Методика выполнения измерений массовой концентрации полигексаметиленгуанидин-гидрохлорида в питьевых природных и сточных водах фотометрическим методом: свидетельство об аттестации методики выполнения измерений № 242/99-09 30.12.2009.
19. ОСТ 91500.05.001-00 Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения. – М.: Минздрав РФ, 2000. – 47 с.
20. Патент RU 2143905 C1, 2000, МПК А61К31/785. Применение солей полигексаметиленгуанидиния в качестве препаратов, обладающих антимикробной активностью по отношению к анаэробной и смешанной инфекции / Л.М.Антоник, М.Г.Воронков, А.С.Коган, Р.В.Ушаков, Т.В.Фадеева, А.Т.Карнаухов, Б.Н.Соколов, О.Н.Белых, Н.П.Баркова, В.Н.Царев, А.Ю.Шамеев, В.П.Юревич, П.А.Гембицкий, Д.А.Топчиев.
21. Патент RU 2443684 C1, 2012, МПК C07C279/00, C08G73/00, A61L2/16. Разветвленные олигомеры на основе производного гуанидина и содержащее их дезинфицирующее средство / Кедик С.А., Седишев И.П., Панов А.В., Жаворонок Е.С., Ха Кам Ань.

- 22.Патент RU 126467 U1, 2013, МПК G01N27/00 Автоматический весовой титратор-дозатор / С. В.Шорин, Н. К.Зайцев, В. В.Юрицын.
- 23.Покровский, В.И. Инфекционные болезни в России: оценка ситуации / В.И. Покровский // РМЖ. - 2000. - Т. 8, № 17. - С. 666-667.
- 24.Постановление Правительства РФ от 15.10.2012 № 1043 «Об утверждении положения о Федеральном государственном надзоре в сфере обращения лекарственных средств». Правительство Российской Федерации, 2012.
- 25.Приказ Минздравсоцразвития РФ от 26 августа 2010 г. № 757н «Об утверждении порядка осуществления мониторинга безопасности лекарственных препаратов для медицинского применения, регистрации побочных действий, серьезных нежелательных реакций, непредвиденных нежелательных реакций при применении лекарственных препаратов для медицинского применения». Минздравсоцразвития РФ, 2010.
- 26.Руководство для предприятий фармацевтической промышленности/ методические рекомендации. – М.: Спорт и Культура – 2000, 2007. - 192 с.
- 27.Санитарно-эпидемиологическая оценка безопасности и эффективности препарата «Дезавид», применяемого для дезинфекции воды плавательных бассейнов: отчет о НИР / Сысина А.Н. – М.: НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. РАМН, 2005. – 53 с.
- 28.Скворцова, К.Е. Бактерицидная активность и остаточное действие некоторых катионных соединений / К.Е. Скворцова, Нехорошева А.Г // Сб. науч. тр. «Проблемы дезинфекции и стерилизации» - 1974. – В. 23. - С. 92.
- 29.Скворцова, К.Е. Бактерицидные свойства производных гуанидина / К.Е. Скворцова, Нехорошева А.Г., П.А. Гембицкий // Сб. науч. тр. «Проблемы дезинфекции и стерилизации». - 1975. – В. 24. - С. 58.
- 30.Скороходов, В.Д. Защита неметаллических строительных материалов от биокоррозии / В.Д. Скороходов, С.И. Шестакова - М.: - Высшая школа, 2004. - С. 150-183

- 31.Стельмах, С.А. Гидрогели на основе полигексаметиленгуанидин гидрохлорида / С.А. Стельмах, Л.У. Базарон, М.Н. Григорьева // Вестник БГУ. – 2010. – В. 3. – С. 80-82.
- 32.Стельмах, С.А. Токсичность гидрогеля полигексаметиленгуанидин гидрохлорида по отношению к гидробионтам / С.А. Стельмах, М.Н. Григорьева, Л.У. Базарон // Вестник БГУ. – 2011. – В. 3. – С. 56-57.
- 33.Федеральный закон от 12.04.2010 N 61-ФЗ (ред. от 08.03.2015) «Об обращении лекарственных средств» (12 апреля 2010 г.). Совет Федерации, 2010.
- 34.Ха, К. А. Разработка технологии получения субстанции гидросукцината олигогексаметиленгуанидина и глазных капель на её основе: автореф. дис. ...канд. фарм. наук: 14.04.01 / Ха Кам Ань. – М., 2012. – 26 с.
35. Akimitsu, N. Increase in resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to beta-lactams caused by mutations conferring resistance to benzalkonium chloride, a disinfectant widely used in hospitals / N. Akimitsu, H. Hamamoto, R. Inoue, M. Shoji et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1999. – V.43. - P. 3042–3043.
36. Bean, HS Studies on bacterial populations of solutions of phenols. Part II. The influence of cell exudate upon the shape of the survivor-time curve / H.S. Bean, V. Walters // *J. Pharm Pharmacol*. – 1961. – V. 13. – P. 183 - 194.
- 37.Bloomfield, S. F. Mechanisms of inactivation and resistance of spores to chemical biocides / S. F. Bloomfield and M. J. Arthur // *Appl. Bacterial. Symp. Suppl.* – 1994. – V. 76. – P. 91-104.
- 38.Brocato, R. L. A lethal disease model for hantavirus pulmonary syndrome in immunosuppressed syrian hamsters infected with sin nombre virus / L.Rebecca Brocato, Christopher D. Hammerbeck, Todd M. Bell, Jay B. Wells, Laurie A. Queen and Jay W. Hooper // *Journal of Virology* – 2014. – V. 88 (2). - P. 811– 819.
- 39.Chaplin C.E. Bacterial resistance to quaternary ammonium disinfectants / C.E. Chaplin // *J. Bacteriol.* – 1952. – V. 63. – P. 453—458.
- 40.Chaplin, C.E. Observations on quaternary ammonium disinfectants / C.E. Chaplin // *Canadian journal of botany*. – 1951. - V. 29. – P. 372—382.

- 41.Chawner, J. A. Interaction of the bisbiguanides chlorhexidine and alexidine with phospholipid vesicles: evidence for separate modes of action / J.A. Chawner and P. Gilbert // J. Appl. Bacteriol. – 1989. - V. 66. – P. 253–258.
- 42.Chawner, J.A. A comparative study of the bactericidal and growth inhibitory activities of the bisbiguanides alexidine and chlorhexidine / J.A. Chawner and P. Gilbert // J. Appl. Bacteriol. – 1989. – V. 66. – P. 243–252.
- 43.Coates, A.R. Novel classes of antibiotics or more of the same? / A.R. Coates, et al. // Br. J. Pharmacol. – 2011. – V. 163. - P. 184–194.
- 44.Cooper, E.A. On the Relations of the Phenols and their Derivatives to Proteins. A Contribution to our Knowledge of the Mechanism of Disinfection: Part IV. The Halogen Phenols / E.A. Cooper and D.L. Woodhouse // Biochem J. – 1923. – V. 17. – P. 600–612.
- 45.CPMP/QWP/848/99 and EMEA/CVMP/598/99. Note for Guidance on Process Validation. — London, 2001.
- 46.Crocker, C.K. Variations in characteristics of E. coli induced by quaternary ammonium compounds / C.K. Crocker // J. Milk Food Technol. – 1951. – V. 14. – P. 138—140.
- 47.Davies, A. Action of biguanides, phenol and detergents on Escherichia coli and its spheroplasts / A. Davies and B.S. Field // J. Appl. Bacterial. – 1969. - V. 32. - P. 233-243.
- 48.Davies, D. S. The adaptation of Bact. lactis aerogenes to growth in the presence of sulphonamides / D. S. Davies and C.N. Hinshelwood // Trans. Faraday Soc. – 1943. - V. 39. – P. 431-444.
- 49.Denyer, S. P. Mechanisms of action of antibacterial biocides / S.P. Denyer // Int. Biodeterior. Biodegrad. – 1995. – V. 36. - P. 227–245.
- 50.Denyer, S. P. The antibacterial action of a series of 4-n-alkylphenols /S. P. Denyer, W. B. Hugo and R. F. Witham // J. Pharm. Pharmac. – 1980. – V. 32. - P. 27.
- 51.Denyer, S. P. The biochemical basis of synergy between the antibacterial agents chlorocresol and 2-phenylethanol / S. P. Denyer, W. B. Hugo, and V. D. Harding // Int. J. Pharmaceutics. – 1986. – V. 29. – P. 29-36.

52. Devasahayam, G. Newer antibacterial drugs for a new century / G. Devasahayam, W. M. Scheld, and P. S. Hoffman // *Expert Opin Investig Drugs* – 2010. – V. 19(2). – P. 215–234.
53. Dixon, R.E. Aqueous quaternary ammonium antiseptics and disinfectants / R.E. Dixon, R.A. Kaslow, D.C. Mackel, C.C. Fulkerson and G.F. Mallison // *Journal of the American Medical Association*. – 1976. – V.236. – P. 2415–2417.
54. Dubos, R. J. Antimicrobial agents of biological origin / R. J. Dubos // *J. Am. Med. Assoc.* – 1944. – V. 124. – P. 633-636.
55. Fischbach, M.A. Antibiotics for emerging pathogens / M.A Fischbach, C.T. Walsh // *Science*. – 2009. – V (325). - P.1089–1093.
56. Fischbach, M.A. Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms/ M.A. Fischbach, C.T. Walsh // *Chem. Rev.* – 2006. - V.106. – P. 3468–3496.
57. Fitzgerald, K. A. Uptake of ¹⁴C-chlorhexidine diacetate to *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* and its release by azolectin / K. A. Fitzgerald, A. Davies and A. D. Russell // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1989. – V. 60. – P. 327–332.
58. Gilbert P. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet / P. Gilbert, L.E. Moore // *J. Appl. Microbiol.* – 2005. – V.99. – P.703–715.
59. Hamilton, W.A. The mechanism of the bacteriostatic action of tetrachlorosalicylanilide / W.A. Hamilton // *J. Gen. Microbiol.* – 1968. – V. 50. – P. 441-458.
60. Harold, F. M. Dio 9 and chlorhexidine. Inhibition of membrane bound ATPase and of cation transport in *Streptococcus faecalis* / F. M. Harold, J. R. Baarda, C. Baron, and A. Abrams // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1969. – V. 183. – P. 129–136.
61. Hiom, S. J. Effects of chlorhexidine diacetate on *Candida albicans*, *C. glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae* / S. J. Hiom, J. R. Furr, A. D. Russell, and J. R. Dickinson // *J. Appl. Bacteriol.* – 1992. – V. 72. - P. 335–340.
62. Hoffman, H.P. Structural alterations in the growth of resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of benzalkonium chloride / H.P. Hoffman, S.G. Geftic, J. Gelzer, H. Herman and F.W. Adair // *Journal of Bacteriology*. – 1973. – V.113. - P. 409–416.

63. Hugo, W.B. Cellular lipid and the antistaphylococcal action of phenols / W.B. Hugo, I.J. Franklin // *Gen. Microbiol.* – 1966. – V. 52. – P. 365-373.
64. Hugo, W.B. Inhibition and destruction of the microbial cell / W.B. Hugo, W.A. Hamilton - London: Academic Press, 1971. – P. 77-93.
65. Kenaway, E.R. et al. The chemistry and applications of antimicrobial polymers: a state-of-the-art review / E.R. Kenaway, et al. // *Biomacromolecules.* – 2007. – V. 8. – P. 1359–1384.
66. Lambert, P. A. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. / P. A. Lambert // *J R Soc Med.*; (Suppl 41):– 2002 V. 95. – P. 22–26.
67. Lambert, P. A. Potassium fluxes. First indications of membrane damage in microorganisms / P. A. Lambert and S. M. Hammond // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1973. - V. 54. – P. 796–799.
68. Leekha, S. General principles of antimicrobial therapy / S. Leekha et al. // *Mayo Clin Proc.* – 2011. – V. 86. – P. 156–67.
69. Levy, S. B. Multidrug resistance—a sign of the times / S. B. Levy // *N. Engl. J. Med.* – 1998. – P. 1376–1378.
70. Levy, S. B. The challenge of antibiotic resistance / S. B. Levy // *Sci. Am.* – 1998 – V. 275. – P. 46–53.
71. Maillard, J.Y. Effect of biocides on MS2 and K coliphages / J.Y. Maillard, T. S. Beggs, M. J. Day, R. A. Hudson, and A. D. Russell // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1994. – V. 60. - P. 2205–2206.
72. Maillard, J.Y. Effects of biocides on the transduction of *Pseudomonas aeruginosa* PAO by F116 bacteriophage / J.Y. Maillard, T. S. Beggs, M.J. Day, R. A. Hudson, and A.D. Russell // *Lett. Appl. Microbiol.* – 1995. - V. 21. – P. 215–218.
73. Mathias, K. O. Polyhexamethylene guanidine hydrochloride-based disinfectant: a novel tool to fight meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* and nosocomial infections / K. Oule Mathias, R. Azinwi, Anne-Marie Bernier, T. Kablan, Anne-Marie Maupertuis, S. Mauler, Rose K. Nevry, K. Dembe'le', L. Forbes and L. Diop // *Journal of Medical Microbiology.* – 2008. – V. 57. – P. 1523–1528.

74. McCulloch, E. C. False disinfection velocity curves produced by quaternary ammonium compounds / E. C. McCulloch, // *Science*. – 1947. – V. 105. – P. 480-481.
75. McDonnell, G. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance / G. McDonnell and A.D. Russell // *Clin. Microbiol. Rev.* – 1999. – V. 12(1). - P. 147–179.
76. Moore, L.E. In vitro study of the effect of cationic biocides on bacterial population dynamics and susceptibility / L.E. Moore et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2008. – V. 74. – P. 4825–4834.
77. Park, J. B. Effect of chlorhexidine on the in vitro and in vivo herpes simplex virus infection / J. B. Park and N. H. Park // *Oral Surg.* – 1989. - V. 67. – P. 149–153.
78. Park, N. H. Combined synergistic antiherpetic effect of acyclovir and chlorhexidine in vitro/ N. H. Park, J. B. Park, B.M. Min and H.M. Cherrick// *Oral surg. oral med oral pathol.* – 1991.- V.71 – P. 193-196.
79. Pasberg-Gauhl, C. A need for new generation antibiotics against MRSA resistant bacteria / Cornelia Pasberg-Gauhl // *Drug Discovery Today: Technologies* – 2014. – V. 11. - P. 109-116.
80. Russell, A. D. Bacterial spores and chemical sporicidal agents / A. D. Russell // *Clin. Microbiol. Rev.* – 1990. – V. 3. - P. 99–119.
81. Russell, A. D. Mechanisms of bacterial resistance to biocides / A. D. Russell // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* – 1995. – V. 36. – P. 247–265.
82. Russell, A. D. Reversal of the inhibition of bacterial spore germination and outgrowth by antibacterial agents / A.D. Russell, B.D. Jones and P.Milburn // *Int. J. Pharm.* – 1985. – V. 25. – P. 105–112.
83. Russell, A. D. The antibacterial activity of a new chloroxylenol formulation containing ethylenediamine tetraacetic acid / A.D. Russell and J. R. Furr // *J. Appl. Bacteriol.* – 1977. - V. 43. – P. 253–260.
84. Russell, A.D. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon /A.D. Russell // *Journal of Hospital Infection.* – 2004. – V. 57. – P. 97–104.
85. Russell, A.D. Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic resistance / A.D. Russell // *J Appl Microbiol.* – 2002. - V. 92. – P. 121—135.

- 86.Scharlau product catalogue (p.137) [Электронный ресурс]. URL: <https://www.labtek.com.au/SuppliersData/Scharlau/Product%20Catalogue.pdf> (дата обращения 01.10.2014).
- 87.Shaker, L.A. Mechanism of resistance of *Bacillus subtilis* spores to chlorhexidine / L. A.Shaker, J. R. Furr, and A. D. Russell // *J. Appl. Bacteriol.* – 1988. - V. 64. - P. 531–539.
88. Siedenbichel, F. Antimicrobial polymers in solution and on surfaces: overview and functional principles / F. Siedenbichel, J.C. Tiller // *Polymers.* – 2012. – V. 4. – P. 46–71.
89. Skold, O. Antibiotics and antibiotic resistance./ O. Skold editor// John Wiley and Sons Inc. – 2011. – 224p.
- 90.Specification of 1,6-Hexanediamine, 99.5+%, ACROS Organics™ [Электронный ресурс]. URL: http://www.fishersci.com/ecommerce/servlet/fsproductdetail_10652_16431682__-1_0 (дата обращения 01.10.2014).
- 91.Specification of 1-Octanesulfonic acid sodium salt [Электронный ресурс]. URL: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=O0133&interface=All&N=0&mode=match%20partialmax&lang=en®ion=RU&focus=product> (дата обращения 01.10.2014).
- 92.Specification of 1-Pentanesulfonic acid sodium salt [Электронный ресурс]. URL: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=221538&interface=All&N=0&mode=match%20partialmax&lang=en®ion=RU&focus=product> (дата обращения 01.10.2014).
- 93.Specification of Benzalkonium chloride [Электронный ресурс]. URL: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/234427?lang=en®ion=RU> (дата обращения 01.10.2014).
- 94.Specification of Fmoc chloride [Электронный ресурс]. URL: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/23186?lang=en®ion=RU&cm_sp=abstract-_22173006-_23186 (дата обращения 01.10.2014).

95. Specification of Lidocaine hydrochloride [Электронный ресурс]. URL: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=lidocaine+hydrochloride&interface=All&N=0&mode=match%20partialmax&lang=en®ion=RU&focus=product> (дата обращения 01.10.2014).
96. Specification of Phthaldialdehyde [Электронный ресурс]. URL: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/p0657?lang=en®ion=RU> (дата обращения 01.10.2014).
97. Srivastava, O. P. An interrelationship among peroxidase, IAA oxidase, and polyphenol oxidase from peanut cells / O. P. Srivastava and R. B. van Huyste // *Can. J. Bot.* – 1977. – V. 55. – P. 2630-2635.
98. Srivastava, R. B. Influence of bacterial cell age on phenol action / R. B. Srivastava and R. E. M. Thompson // *Nature (London)* – 1965. – V. 206. – P. 216.
99. Srivastava, R. B. Studies in the mechanism of action of phenol on *Escherichia coli* cells / R. B. Srivastava and R. E. M. Thompson // *Br. J. Exp. Pathol.* – 1966. – V. 67. – P. 315–323.
100. Tew, G.N. De novo design of antimicrobial polymers, foldamers and small molecules: from discovery to practical applications / G.N. Tew, et al. // *Acc. Chem. Res.* – 2010. – V. 43. – P. 30–39.
101. The rules governing medicinal products in the European Union. V. 2C. Regulatory Guidelines. Guideline on the Categorization of new Applications (NA) versus Variations Applications (V). — European Commission. — 2002.
102. Victor, L. Legionnaires' Disease: Importance of High Index of Suspicion in Patients in the ICU With Community-Acquired Pneumonia / L. Victor, Yu MD // *Chest Journal* - 2014. – V. 145(2). – P. 202-205.
103. Waldvogel, F. A. New resistance in *Staphylococcus aureus* / F.A. Waldvogel // *N. Engl. J. Med.* – 1999. – V. 340. – P. 556–557.
104. Walkey, A.J. Linezolid versus glycopeptide antibiotics for the treatment of suspected methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial pneumonia: a meta-analysis of randomized controlled trials / A.J. Walkey, M.R. O'Donnell, R.S. Wiener // *Chest.* – 2011. – V. 139(5) – P. 1148–1155.

105. Walsh, C.T. Antibiotics: actions, origins, resistance / C.T. Walsh, editor // ASM Press. – 2003. - P. 345.
106. Walsh, C.T. Molecular mechanisms that confer antimicrobial drug resistance / C.T. Walsh // Nature. – 2000. – V. 406. - P. 775 -780.
107. Weber, G. R. Laboratory procedure for evaluating practical performance of quaternary ammonium and other germicides proposed for sanitizing food utensils / G. R. Weber and L. A. Black // Am. J. Pub. Health. – 1948. – V. 38. – P. 1405-1417.
108. Weijia, X. Hand, foot, and mouth disease in China, 2008. –12: an epidemiological study / X. Weijia, et al. // The Lancet Infectious Diseases. – 2014. – V. 14(4). - P. 262-263.
109. WO/2012/082009 PCT/RU2011/000536. Branched oligomers on the basis of a guanidine derivative and disinfecting agent containing said oligomers (alternatives)/ Kedik, Stanislav Anatol'evich; (RU), Sedishev, Igor' Pavlovich; (RU) Panov, Aleksey Valer'evich; (RU).
110. Woodroffe, R.C. The antibacterial action of tetrachlorsalicylanilide // R.C. Woodroffe, B.E. Wilkinson // J. Gen. Microbiol. – 1966 – V. 44(3) – P. 343–352.
111. Zhou, Z. Interactions of biocidal guanidine hydrochloride polymer analogs with model membranes: a comparative biophysical study / Zhongxin Zhou, Anna Zheng and Jianjiang Zhong // Acta Biochim Biophys Sin. – 2011. – V. 43 (9). – P. 729-737.
112. Zhou, Z. X. Damage of Escherichia coli membrane by bactericidal agent poly-hexamethylene guanidine hydrochloride: micrographic evidences / Z. X. Zhou, D.F. Wei , Y. Guan , A.N. Zheng and J.J. Zhong // Journal of Applied Microbiology – 2010. - V.108. – P. 898–907.

ПРИЛОЖЕНИЯ*Приложение 1. Акт внедрения МИТХТ им. М.В. Ломоносова***УТВЕРЖДАЮ**

Проректор по науке и
инновационной деятельности
федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения
высшего профессионального образования
«Московский государственный
университет тонких химических технологий
имени М.В. Ломоносова»
Министерства образования и науки
Российской Федерации
доктор химических наук
профессор
Флид В.Р.



«13» мая 2015 г.

АКТ

**внедрения в учебный процесс основных положений диссертации
старшего преподавателя кафедры биомедицинских и фармацевтических
технологий, федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего профессионального образования
«Московский государственный университет тонких химических
технологий имени М.В. Ломоносова» Министерства образования и
науки Российской Федерации, Шаталова Дениса Олеговича**

Шаталовым Д.О. были разработаны и стандартизованы методы контроля качества синтетического биоцида – разветвленного олигогексаметиленгуанидин гидрохлорида. В целом, данные, представленные в диссертации «Разработка и стандартизация методов контроля качества разветвленного олигогексаметиленгуанидин гидрохлорида» позволяют расширить представления студентов о современных достижениях в области контроля качества лекарственных средств.

Основные положения диссертации используются при чтении лекций и проведении лабораторного практикума, у студентов кафедры биомедицинской и фармацевтической технологии, государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет тонких химических

технологий имени М.В. Ломоносова» Министерства образования и науки Российской Федерации, по предметам «Стандартизация, сертификация и методы контроля качества фармацевтической продукции и БАД» и «Физико-химические методы исследования в биотехнологии».

Ответственный за внедрение:

Заведующий кафедрой биомедицинских
и фармацевтических технологий
федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения
высшего профессионального образования
«Московский государственный
университет тонких химических технологий
имени М.В. Ломоносова»
Министерства образования и науки
Российской Федерации,
доктор технических наук,
профессор

«13» мая 2015 г



Кедик Станислав Анатольевич

Приложение 2. Акт внедрения ЗАО «ИФТ»



**Институт
Фармацевтических
Технологий**



УТВЕРЖДАЮ
Директор по науке
ЗАО «Институт
Фармацевтических
Технологий»,
к.х.н. Панов А.В.
2015

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Шаталова Дениса Олеговича «Разработка и стандартизация методов контроля качества разветвленного олигогексаметиленгуанидин гидрохлорида» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) в ЗАО «Институт Фармацевтических Технологий»

Комиссия в составе сотрудников ЗАО «Институт Фармацевтических Технологий» заместителя директора по производству, к.х.н. Суслова В.В., исполнительного директора, к.фарм. н., Кочкиной Ю.В., руководителя проекта, д.х.н. Жаченкова С.В. подтверждает использование материалов диссертационного исследования Шаталова Д.О., посвященного разработке и стандартизации методов контроля качества разветвленного олигогексаметиленгуанидин гидрохлорида.

На основе результатов проведенной работы, составлены: проект фармакопейной статьи предприятия на субстанцию «ДЕЗАПОЛ», четыре протокола валидации методов контроля. Указанные документы входят в состав досье на фармацевтическую субстанцию, в отношении которого в настоящее время осуществляются регистрационные мероприятия.

Члены комиссии:

Заместитель директора по производству

к.х.н. В.В. СУСЛОВ

Исполнительный директор

к.фарм. н. Ю.В. КОЧКИНА

Руководитель проекта

д.х.н. С.В. ЖАЧЕНКОВ

Приложение 3. Учебно-методическое пособие

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего профессионального образования
Московский государственный университет тонких химических
технологий имени М.В. Ломоносова

Кафедра биомедицинских и фармацевтических технологий

С.А. Кедик, И.П. Седишев, Д.О. Шаталов

**Практикум по физико-химическим методам в
биотехнологии**

Учебно-методическое пособие

Утверждено Библиотечно-издательской комиссией
МИТХТ им. М.В. Ломоносова в качестве учебно-
методического пособия по дисциплине «Физико-
химические методы исследования в биотехнологии» для
бакалавров, обучающихся по направлению 19.03.01
«Биотехнология»

Москва
МИХТ им. М.В. Ломоносова
2015

Приложение 4. Уведомление о поступлении заявки на Патент РФ

Форма № 94 ИЗ, ПМ, ПО-2011

Федеральная служба по интеллектуальной собственности
Федеральное государственное бюджетное учреждение«Федеральный институт промышленной собственности»
(ФИПС)

Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-3, 125993

Телефон (8-499) 240-60-15 Факс (8-495) 531-63-18

УВЕДОМЛЕНИЕ О ПОСТУПЛЕНИИ ЗАЯВКИ

20.03.2015	015573	2015109857
Дата поступления	Входящий №	Регистрационный №

ДАТА ПОСТУПЛЕНИЯ оригинала заявки 20 МАР 2015 ФИПС ОТД.17		(21) РЕГИСТРАЦИОННЫЙ № (85) ДАТА ПЕРЕВОДА международной заявки на национальную фазу	ВХОДЯЩИЙ №
☐ (86) (регистрационный номер международной заявки и дата международной подачи, установленные получателем изобретения) ☐ (87) (номер и дата международной публикации международной заявки)		АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ (полный почтовый адрес, или в нем исключительный адрес) 119571, Москва, пр. Вернадского, 86, БИМФТ, Кедик С.А. Телефон/Факс: (495) 936-88-01 E-mail: doctorkedik@ya.ru	
ЗАЯВЛЕНИЕ о выдаче патента Российской Федерации		В Федеральную службу по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам Бережковская наб., 30, корп.1, Москва, Г-59, ГСП-5, 123995	
(54) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ УСТАНОВКА ДЛЯ АВТОМАТИЗИРОВАННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАЗВЕТВЛЕННОГО ОЛИГОГЕКСАМЕТИЛЕНУАНИДИН ГИДРОХЛОРИДА В МАТРИЦЕ ИЗ НЕСКОЛЬКИХ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ КОМПОНЕНТОВ			
(71) ЗАЯВИТЕЛЬ (Указывается полное имя или наименование (согласно удостоверяющему документу), место жительства или место нахождения, включая название страны и полный почтовый адрес) Кедик Станислав Анатольевич Укажите лицо является ☐ государственным заказчиком ☐ муниципальным заказчиком, исполнитель работ _____ (укажите наименование) ☐ исполнителем работ по ☐ государственному ☐ муниципальному контракту, заказчик работ _____ (укажите наименование) Контракт от _____ № _____		КОД страны по стандарту ВОИС ST.3 (если он установлен) RU	
(74) ПРЕДСТАВИТЕЛЬ(И) ЗАЯВИТЕЛЯ Указание(ие) ниже лицо(а) назначен(а) заявителем(заявителями) для ведения дел по получению патента от его(их) имени в Федеральной службе по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам Фамилия, имя, отчество (если оно имеется) Адрес: Срок представительства (указывается в случае назначения иного представителя без предоставления доверенности)		Является ☐ Патентным(ми) поверенным(ми) ☐ Иным представителем Телефон: Регистрационный (е) номер (а) патентного(ых) поверенного(ых)	

Количество листов	26	Фамилия лица, принявшего документы
Количество документов, подтверждающих уплату пошлины	1	Киселева Е.А.
Количество изображений	0	

*Приложение 5. Проект НД на субстанцию***МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ**

Регистрационное удостоверение № _____

Дата регистрации « ____ » _____ 20 ____ г.

Закрытое акционерное общество
«Институт фармацевтических технологий»,
Россия, 121353, г. Москва, Сколковское шоссе, д.21\32, стр.1

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ

_____ (номер)

ДЕЗАПОЛ®

торговое наименование лекарственного препарата

олигогексаметиленгуанидина гидрохлорид
международное непатентованное или химическое наименование

субстанция

лекарственная форма, дозировка

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ: ООО «АК Синтвита»

ФАСОВЩИК (ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА): ООО «АК Синтвита»

УПАКОВЩИК (ВТОРИЧНАЯ (ПОТРЕБИТЕЛЬСКАЯ) УПАКОВКА):
ООО «АК Синтвита»

ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА: ООО «АК Синтвита»

СПЕЦИФИКАЦИЯ

«Дезапол®»

Субстанция

ООО «АК Синтвита»

Показатели	Методы	Нормы
Описание	Визуально	Белый или желтоватый аморфный порошок, гигроскопичен.
Растворимость	ГФ XII	Очень легко растворим в воде. Очень мало растворим в уксусной кислоте, медленно набухает. Практически не растворим в циклогексане.
Подлинность	Качественные реакции: 1. Полигексаметиленгуанидин 2. Хлориды 3. ЯМР ^{13}C спектр	1. С пикриновой кислотой – желтый творожистый осадок 2. С нитратом серебра – белый осадок 3. Интенсивность сигналов спектра ЯМР ^{13}C испытуемого образца, полученном при анализе степени разветвления, должна соответствовать интенсивности сигналов типичного спектра ЯМР ^{13}C
Прозрачность	ГФ XII	1 % раствор субстанции в

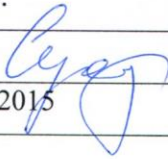
		воде должен быть прозрачным
Цветность	ГФ XII	Окраска 1 % раствора субстанции в воде не должна быть интенсивнее эталона ВУ ₅
рН	Потенциометрический	От 6,5 до 8,5 (1 % раствор)
Степень разветвления	ЯМР ¹³ С-спектроскопия	от 0,2 до 0,6
Среднечисловая молекулярная масса	ЯМР ¹³ С-спектроскопия	от 600 до 1000 Да
Посторонние примеси:		
Гексаметилендиамин (1,6-диамногексан)	ВЭЖХ	Не более 0,3 %
Гуанидин гидрохлорид	ВЭЖХ	Не более 0,7 %
Хлориды	Титриметрия	От 20,0 до 23,0 %
Сульфатная зола	ГФ XII	Не более 0,2 %
Тяжелые металлы	ГФ XII	Не более 0,001 %
Потеря в массе при высушивании	ГФ XI	Не более 5 %
Микробиологическая чистота	ГФ XII	Категория 1.2.Б
Количественное определение	Рефрактометрия	Не менее 97,5 % и не более 102,5 % в пересчёте на сухое вещество.
Упаковка	По 1, 2, 5 или 10 кг в двойные пакеты из плёнки полиэтиленовой. По 1, 2 или 10 пакетов в коробки из картона или в ящики из гофрированного картона	
Маркировка	В соответствии с ФСП	

Приложение 6. Протоколы валидации

ЗАО «Институт фармацевтических технологий»	Стр. 1 из 17
Протокол валидации метода количественного определения примеси гуанидин гидрохлорида (ГГХ) в субстанции «ДЕЗАПОЛ®»	Копия № 01
	Валидация аналитических методик

ПРОТОКОЛ

валидации метода количественного определения примеси гуанидин гидрохлорида (ГГХ) в субстанции «ДЕЗАПОЛ®»

Утверждение протокола		
Составил	Проверил	Утвердил
Рук. проекта ЗАО «ИФТ»	Зам. Директора по производству	Генеральный директор ЗАО «ИФТ»
Шаталов Д.О.	Суслов В.В.	Кедик С.А.
Подпись: 	Подпись: 	Подпись: 
Дата: 14.03.2015	Дата: 14.03.2015	Дата: 14.03.2015



ЗАО «Институт фармацевтических технологий»	Стр. 1 из 16
Протокол валидации метода количественного определения гексаметилендиамина в субстанции «ДЕЗАПОЛ®»	Копия № 01
	Валидация аналитических методик

ПРОТОКОЛ

валидации метода количественного определения гексаметилендиамина в субстанции «ДЕЗАПОЛ®»

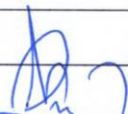
Утверждение протокола		
Составил	Проверил	Утвердил
Рук. проекта ЗАО «ИФТ»	Зам. Директора по производству	Генеральный директор ЗАО «ИФТ»
Шаталов Д.О.	Суслов В.В.	Кедик С.А.
Подпись: 	Подпись: 	Подпись: 
Дата: 14.03.2015	Дата: 14.03.2015	Дата: 14.03.2015



ЗАО «Институт фармацевтических технологий»	Стр. 1 из 19
Протокол валидации метода количественного определения основного вещества в субстанции ДЕЗАПОЛ®	Копия № 01
	Валидация аналитических методик

ПРОТОКОЛ

валидации метода количественного определения основного вещества в
субстанции ДЕЗАПОЛ®

Утверждение протокола		
Рук. проекта ЗАО «ИФТ»	Зам. Директора по производству	Генеральный директор ЗАО «ИФТ»
Шаталов Д.О.	Суслов В.В.	Кедик С.А.
Подпись: 	Подпись: 	Подпись: 
Дата: 14.03.2015	Дата: 14.03.2015	Дата: 14.03.2015



Приложение 7. Технические условия

**ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ИНСТИТУТ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ»
(ЗАО «Институт фармацевтических технологий»)**

ОКП 930000

группа Л21
(ОКС 11.120)

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ЗАО «ИФТ»



С. А. Кедик

16 октября 2013г.

**Сополимер гексаметилендиамина и гуанидин гидрохлорида
(разветвленный олигогексаметиленгуанидин гидрохлорид)**

ДЕЗАПОЛ® ГХ

**ТУ 9300-006-83188314-2013
(Вводятся впервые)**

Разработано ЗАО «Институт
фармацевтических технологий»

Дата введения в действие
с «16» октября 2013 г

Без ограничения срока действия

Составил
Руководитель проекта  Д.О. Шаталов

Москва
2013 г

