

# РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДА КОНТРОЛЯ МОНОМЕРНОЙ ПРИМЕСИ ГИДРОХЛОРИДА ГУАНИДИНА В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ «РАЗВЕТВЛЕННЫЙ ГИДРОХЛОРИД ОЛИГОГЕКСАМЕТИЛЕНГУАНИДИНА»

С.А. Кедик<sup>1,2</sup>, заведующий кафедрой, генеральный директор,  
Д.О. Шаталов<sup>1,2,\*</sup>, научный сотрудник, руководитель проекта,  
С.Г. Бексаев<sup>1,2</sup>, ведущий инженер, ведущий научный сотрудник,  
И.П. Седишев<sup>2</sup>, ведущий научный сотрудник, Е.С. Жаворонок<sup>2</sup>,  
ведущий научный сотрудник, В.В. Суслов<sup>2</sup>, заместитель директора  
по производству, А.В. Панов<sup>1,2</sup>, доцент, директор по науке

<sup>1</sup>кафедра Биомедицинских и фармацевтических технологий

МИТХТ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119571 Россия

<sup>2</sup>ЗАО «Институт фармацевтических технологий», Москва, 119571 Россия

\*Автор для переписки, e-mail: shat-05@mail.ru

Описаны существующие методы определения гидрохлорида гуанидина при анализе различных образцов, указаны их недостатки, препятствующие осуществлению контроля мономера в фармацевтической субстанции. Разработана методика количественного определения гидрохлорида гуанидина в фармацевтической субстанции «разветвленный гидрохлорид олигогексаметиленгуанидина» с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, проведена ее валидация с целью стандартизации субстанции по параметру «примесные соединения».

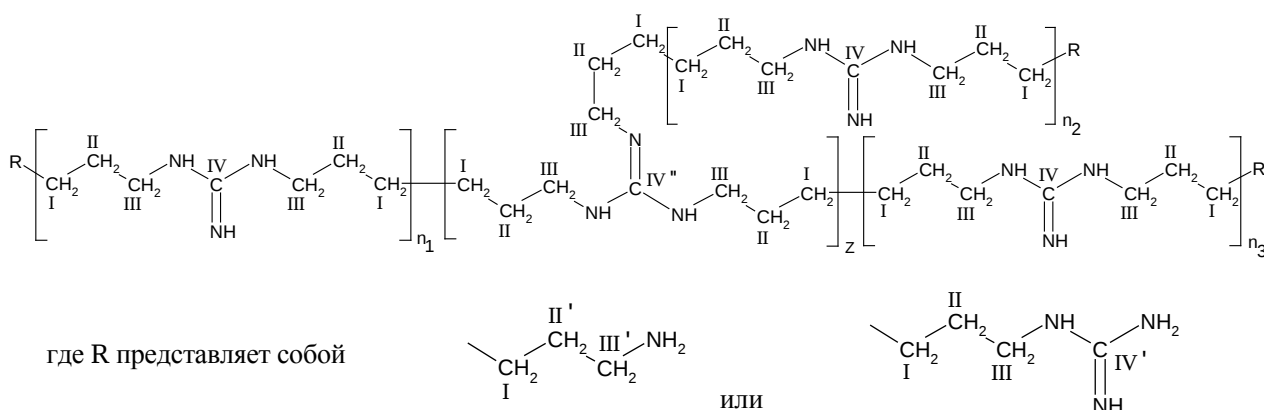
**Ключевые слова:** олигогексаметиленгуанидина гидрохлорид, гуанидина гидрохлорид, примесные соединения, высокоэффективная жидкостная хроматография.

## Введение

Олиго- и полимерные биоцидные материалы приобретают все более широкое распространение в различных областях человеческой жизнедеятельности (медицина, ветеринария, строительство, очистка и обеззараживание воды и т.п.) [1–3]. Среди таких материалов особый интерес вызывают полигуанидины – вещества, содержащие в своем составе гуанидиновые фрагменты [4].

Высокая эффективность действия, наряду с низкой токсичностью, позволяет использовать

полигуанидины в медицинской практике для лечения вирусных и инфекционных заболеваний. Специалистами ЗАО «Институт фармацевтических технологий» была разработана технология получения олигомерного биоцида – разветвленного гидрохлорида олигогексаметиленгуанидина (ОГМГ-ГХ) [5–7] с целью использования его в качестве субстанции для основы эффективных противомикробных препаратов. Химическая структура ОГМГ-ГХ описывается следующей формулой:



Применение ОГМГ-ГХ в качестве фармацевтической субстанции связано напрямую с обеспечением человеческой жизнедеятельности, поддержанием здоровья, поэтому очень важен строгий контроль за безопасностью препарата. Одним из параметров такого контроля

является достоверное определение гуанидина гидрохлорида (ГХ), являющегося мономером в синтезе ОГМГ-ГХ и входящего в состав остаточных примесей в конечном продукте.

Известно, что в полимерном аналоге ОГМГ-ГХ – полигексаметиленгуанидина гидрохлориде

(торговое название «БИОПАГ») остаточные мономеры определяют методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) [8]. Однако данный метод имеет определенные недостатки: является полуквантитативным, имеет высокий предел обнаружения, недостаточную точность и плохую воспроизводимость. Существуют и другие методы количественного определения ГТХ в различных образцах [9], однако применение их для контроля данного мономера в субстанции невозможно ввиду того, что наличие в образце олигомерного продукта на основе ГТХ (ОГМГ-ГХ) вносит существенную ошибку. В связи с этим целью данной работы была разработка высокоточного, аппаратно-доступного и селективного метода количественного контроля гидрохлорида гуанидина для стандартизации фармацевтической субстанции ОГМГ-ГХ. Наиболее удовлетворяющим данным требованиям является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

### Экспериментальная часть

Основным объектом исследования была синтезированная нами субстанция ОГМГ-ГХ ( $M_n = 708$  Да, степень разветвления 0.31), получаемая поликонденсацией гидрохлорида гуанидина с гексаметилендиаминном [10]. Разработка методики ВЭЖХ для количественного определения гидрохлорида гуанидина в ОГМГ-ГХ проводилась с использованием жидкостного градиентного хроматографа «Стайер» с колонкой Luna C18(2) размером  $4.6 \times 250$  мм, заполненной сорбентом с размером частиц 5 мкм, с УФ-детектированием (длина волны 205 нм). В качестве стандарта применяли гидрохлорид гуанидина по [11]. В качестве подвижной фазы А

использовали фосфатный буферный раствор [12], а в качестве подвижной фазы В – ацетонитрил для хроматографии [13]. Для проведения экспериментов готовили растворы субстанции ОГМГ-ГХ и стандартного гидрохлорида гуанидина концентраций 10 мг/мл и  $1.000 \pm 0.0005$  мг/мл, соответственно, а также градуировочные растворы гидрохлорида гуанидина с концентрациями 6.18, 12.36 и 100 мкг/мл. Эксперименты проводили при  $18-23^\circ\text{C}$  в градиентном режиме (программа градиента приведена в табл. 1); объем вводимой пробы составлял 20.0 мкл, время анализа – 20 мин.

Таблица 1. Программа градиента

| Время, мин | Фаза А, % | Фаза В, % | Поток, мл/мин |
|------------|-----------|-----------|---------------|
| 0          | 100       | 0         | 1             |
| 4          | 100       | 0         | 1             |
| 5          | 5         | 95        | 1             |
| 6          | 5         | 95        | 2             |
| 9          | 5         | 95        | 2             |
| 10         | 100       | 0         | 1             |
| 20         | 100       | 0         | 1             |

Для валидации разработанной методики количественного определения гидрохлорида гуанидина оценивали такие показатели как специфичность [14], точность по параметру открываемости [15, 16], достоверность по параметрам повторяемости [17] и воспроизводимости [17], предел количественного определения [18] и стабильность раствора пробы [19, 20].

### Результаты и их обсуждение

ВЭЖХ-хроматограммы градуировочного раствора и раствора субстанции ОГМГ-ГХ в одном и том же растворителе приведены на рис. 1.

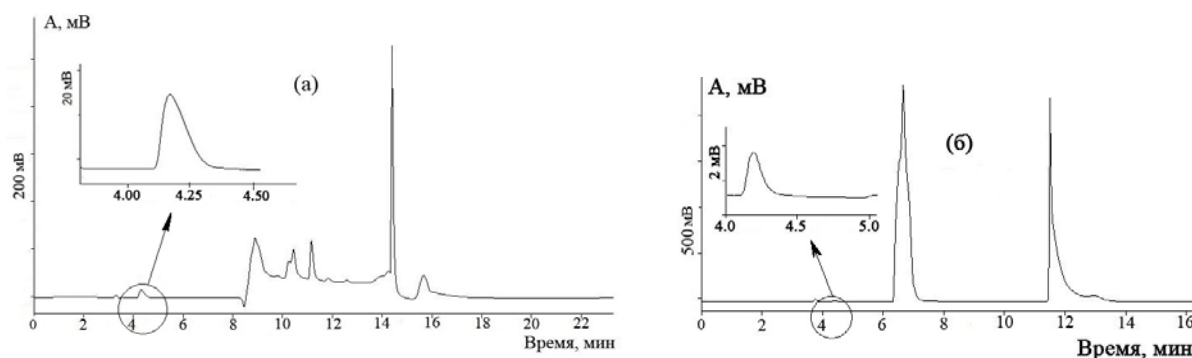


Рис. 1. Типичные ВЭЖХ-хроматограммы градуировочного раствора (а) и раствора субстанции ОГМГ-ГХ (б).

Из них видно, что гидрохлорид гуанидина имеет четко выраженный пик в области времени удерживания 4.0–4.5 мин, который не перекрывается с пиками, соответствующими другим компонентам системы. Предварительные эксперименты показали, что для используемого растворителя в этой области времен какие-либо пики также отсутствуют. Таким образом, хроматограммы удовлетворяют крите-

рию специфичности методики.

Для количественного определения гидрохлорида гуанидина с использованием стандартных растворов была построена градуировочная зависимость (рис. 2). Экспериментально полученные точки описываются уравнением прямой  $y = 0.2325x - 0.1054$  с коэффициентом корреляции 1.00. Расчет содержания гуанидина гидрохлорида ([ГТХ]) в

субстанции проводили по формуле:

$$[\text{ГТХ}] = \frac{C_{\text{исп}} \cdot V \cdot P}{a} \cdot 100\%$$

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

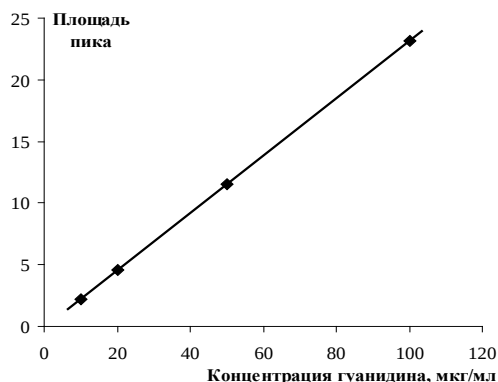


Рис. 2. Градуировочная зависимость площади пика от концентрации стандартного раствора гидрохлорида гуанидина.

По результатам количественного определения гидрохлорида гуанидина в образце с известной концентрацией (20 мг/мл) в соответствии с предлагаемой методикой и способом расчета, был рассчитан параметр открываемости  $R$  [15]:

$$R = \frac{X}{X_0} \cdot 100\%$$

где  $X_0$  – известное содержание ГТХ;  $X$  – найденное содержание ГТХ.

Значение  $R$  составляет 97.0%. Согласно [16], для удовлетворения критерию точности значение  $R$  должно составлять  $100 \pm 5\%$ , так что разработанная методика данному критерию удовлетворяет.

Достоверность разработанной методики оценивали по ее повторяемости и воспроизводимости. Результаты количественного определения гидрохлорида гуанидина в двух сериях измерений субстанции ОГМГ-ГХ представлены в табл. 2. При статистической обработке результатов по известным уравнениям [17] рассчитывали среднее арифметическое значение относительной площади пика  $\bar{A}$ , дисперсию  $S^2$ , стандартное отклонение  $S$  и относительное стандартное отклонение  $S_{\text{отн}}$ .

Таблица 2. Содержание гидрохлорида гуанидина в двух сериях измерений субстанции ОГМГ-ГХ согласно разработанной методике ВЭЖХ

| 1 серия                                                                   |                     |                                | 2 серия                                                                   |                     |                                |
|---------------------------------------------------------------------------|---------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|---------------------|--------------------------------|
| № образца                                                                 | Отн. площадь пика А | Концентрация гуанидина, мкг/мл | № образца                                                                 | Отн. площадь пика А | Концентрация гуанидина, мкг/мл |
| 1.1                                                                       | 9.113               | 39.65                          | 2.1                                                                       | 9.236               | 40.18                          |
| 1.2                                                                       | 8.674               | 37.76                          | 2.2                                                                       | 8.779               | 38.21                          |
| 1.3                                                                       | 8.492               | 36.98                          | 2.3                                                                       | 8.371               | 36.46                          |
| 1.4                                                                       | 8.935               | 38.88                          | 2.4                                                                       | 8.882               | 38.66                          |
| 1.5                                                                       | 8.487               | 36.96                          | 2.5                                                                       | 8.767               | 38.16                          |
| 1.6                                                                       | 8.775               | 38.20                          | 2.6                                                                       | 8.455               | 36.82                          |
| $\bar{A} = 8.746$<br>$S^2 = 0.0616$<br>$S = 0.2482$<br>$S_{отн} = 2.84\%$ |                     |                                | $\bar{A} = 8.748$<br>$S^2 = 0.0971$<br>$S = 0.3116$<br>$S_{отн} = 3.56\%$ |                     |                                |
| F = 1.25                                                                  |                     |                                |                                                                           |                     |                                |

Из данных таблицы видно, что относительное стандартное отклонение для каждой серии образцов не превышает 5%, что свидетельствует об удовлетворении методики критерию повторяемости.

Воспроизводимость методики [17] оценивали с помощью критерия Фишера  $F$  (при уровне значимости  $\alpha = 0.05$ , и степенях свободы дисперсий  $S^2_1$  и  $S^2_2$  – 5 и 5 соответственно):

$$F = \frac{S^2_1}{S^2_2}$$

где  $S^2_1$  и  $S^2_2$  – величины дисперсий, при условии, что  $S^2_1 > S^2_2$ .

Полученное значение критерия Фишера согласно табл. 2 не превышает критического значения 5.05, что подтверждает воспроизводимость методики.

Предел количественного определения методики оценивали с использованием калибровочной прямой, по показателю  $LOQ$  [18]:

$$LOQ = 10 \cdot \frac{s}{b}$$

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

Для 1-й серии образцов (табл. 2)  $b = 0.2325$ , а  $s = 0.2482$ , так что нижний предел количествен-

ного определения методики составляет  $LOQ = 10.7$  мкг/мл.

В заключение оценивали стабильность растворов анализируемой пробы в течение 30 ч (табл. 3). Относительное стандартное отклонение пло-

Таблица 3. Стабильность раствора пробы при хранении по результатам разработанной методики ВЭЖХ

| Время хранения, ч                                                          | Отн. площадь пика А | Концентрация гуанидина, мкг/мл |
|----------------------------------------------------------------------------|---------------------|--------------------------------|
| 1                                                                          | 9.312               | 40.50                          |
| 2                                                                          | 8.941               | 38.91                          |
| 6                                                                          | 8.764               | 38.15                          |
| 8                                                                          | 8.821               | 38.39                          |
| 24                                                                         | 8.438               | 36.75                          |
| 30                                                                         | 8.678               | 37.78                          |
| $\bar{A} = 8.826$<br>$S^2 = 0.08515$<br>$S = 0.2918$<br>$S_{отн} = 3.31\%$ |                     |                                |

щадей пиков на хроматограммах испытуемых растворов, полученных в течение 24 ч, не должно быть более 5%. Из табл. 3 следует, что разработанный метод удовлетворяет критерию стабильности, по крайней мере, в течение 30 ч.

### Выводы

Разработан ВЭЖХ-метод количественного определения гидрохлорида гуанидина в фармацевтической субстанции – «разветвленном гидрохлориде олигогексаметиленгуанидина» и проведена его валидация по показателям специфичности, точности по параметру открываемости, достоверности по параметрам повторяемости и воспроизводимости, пределу количественного определения и стабильности раствора пробы. Проведенные исследования показывают возможность использования разработанного метода ВЭЖХ для стандартизации субстанции по параметру «примесные соединения».

### ЛИТЕРАТУРА:

1. Feng L., Wu F., Li J., Jiang Y., Duan X. Antifungal activities of polyhexamethylene biguanide and polyhexamethylene guanide against the citrus sour rot pathogen *Geotrichum citri-aurantii* *in vitro* and *in vivo* // *Postharvest Biology & Technology*. 2011. V. 61. № 2-3. P. 160–164.
2. Зубрилов С.П. Современные подходы к оснащению морских и речных судов установками по очистке питьевых, сточных и нефтесодержащих вод // *Журн. унив-та водных коммуникаций*. 2013. № 1. С. 95–97.
3. Пантелеева Л.Г. Вирулицидная активность катионных поверхностно-активных веществ и дезинфицирующих средств на их основе // *Дезинфекционное дело*. 2006. № 1. С. 34–38.
4. Воинцева И.И., Гембицкий П.А. Полигуанидины – дезинфекционные средства и полифункциональные добавки. М.: ЛКМ-пресс, 2009. С. 6–21.
5. Кедик С.А., Седишев И.П., Панов А.В., Жаворонок Е.С., Ха Кам Ань. Разветвленные олигомеры на основе производного гуанидина и содержащее их дезинфицирующее средство : пат. РФ 2443684. Заявл. 13.12.2010, опубл. 27.02.2012.
6. Кедик С.А., Панов А.В., Сакаева И.В., Седишев И.П., Черта Ю.В. Дезинфицирующее средство, содержащее разветвленные олигомеры на основе производного гуанидина, и его применение в водоочистке : пат. РФ 2461611. Заявл. 21.06.2011, опубл. 20.09.2012.
7. Кедик С.А., Бочарова О.А., Ха Кам Ань, Панов А.В., Седишев И.П., Жаворонок Е.С., Тимофеева Т.И., Суслов В.В., Бексаев С.Г. Структура и молекулярно-массовые характеристики гидрохлоридов олигогексаметиленгуанидинов // *Хим.-фарм. журн.* 2010. Т. 44. № 10. С. 40–45.
8. [http://www.biopag.ru/index.php?option=com\\_content&view=article&id=71&Itemid=163](http://www.biopag.ru/index.php?option=com_content&view=article&id=71&Itemid=163)
9. <http://www.ngpedia.ru/id642829p1.html>
10. Седишев И.П. Способ получения дезинфицирующего средства (варианты) : пат. РФ 2223791. Заявл. 10.10.2003, опубл. 20.02.2004.
11. Государственная фармакопея XII издания. Т. 1. М: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2008. С. 259.
12. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. М.: Химия, 1979. С. 309.
13. Государственная фармакопея XII издания. Т. 1. С. 240.
14. Руководство для предприятий фармацевтической промышленности: методические рекомендации. М.: Спорт и Культура – 2000, 2007. С. 22–24.
15. AOAC, Peer-Verified Methods Program: Manual on Policies and Procedures. USA, Arlington, Va., 1993. P. 10.
16. FDA Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. May 2001. P. 5.
17. ГОСТ Р ИСО 5725-2-2002, часть 2 «Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений» (5725-2-2002-1, 5725-2-2002-2, 5725-2-2002-3).

18. Руководство для предприятий фармацевтической промышленности: методические рекомендации. С. 31–33.
19. Там же. С. 49.
20. FDA Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. P. 6–8.

## **DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHOD OF CONTROL MONOMER IMPURITIES GUANIDINE HYDROCHLORIDE IN PHARMACEUTICAL SUBSTANCE “BRANCHED HYDROCHLORIDE OLIGO(HEXAMETHYLENEGUANIDINE)”**

**S.A. Kedik<sup>1,2</sup>, D.O. Shatalov<sup>1,2,@</sup>, S.G. Beksaev<sup>1,2</sup>, I.P. Sedishev<sup>2</sup>,  
E.S. Zhavoronok<sup>2</sup>, V.V. Suslov<sup>2</sup>, A.V. Panov<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> *M.V. Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies, Moscow, 119571 Russia*

<sup>2</sup> *ZAO «Institute of Pharmaceutical Technologies», Moscow, 119571 Russia*

@Corresponding author e-mail: shat-05@mail.ru

*Some existing methodologies for quantitative estimation of guanidine hydrochloride during the analysis of various samples were described. Their shortcomings impeding the implementation of the control of the monomer in the pharmaceutical substance were identified. A method for quantitative determination of guanidine hydrochloride in pharmaceutical substance “branched oligo(hexamethyleneguanidine) hydrochloride” by high performance liquid chromatography was developed. The method was validated to standardize the substance by the parameter “impurity compounds”.*

**Keywords:** *branched oligo(hexamethyleneguanidine) hydrochloride, guanidine hydrochloride, impurity compounds, high performance liquid chromatography.*