

**КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХЛОРГЕКСИДИНА БИГЛЮКОНАТА
В ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИХ СРЕДСТВАХ**

С.В. Андреев, Е.С. Беляев, А.О. Иванова, Э.А. Новикова, А.А. Ищенко

Сергей Викторович Андреев *, Евгений Семенович Беляев, Анна Олеговна Иванова,
Эльвина Александровна Новикова

Лаборатория химических исследований дезинфекционных средств, Научно-исследовательский институт дезинфектологии Роспотребнадзора, Научный проезд, 18, Москва, Российская Федерация, 117246
E-mail: svandreev.niid@gmail.com*, cronse@mail.ru, aisoptra@gmail.com, NovikovaEA@niid.ru

Анатолий Александрович Ищенко

Кафедра аналитической химии, Московский технологический университет, проспект Вернадского, 86,
Москва, Российская Федерация, 119571
E-mail: aischenko@yasenevo.ru

Хлоргексидина биглюконат получил широкое распространение в составах для линз, кожных антисептиках и других готовых к применению дезинфицирующих средств. Это обусловлено его малой токсичностью, а также широким спектром антимикробного действия. Общепринятым методом для анализа промышленно выпускаемого хлоргексидина биглюконата (обычно выпускается в виде 20% водного раствора) является высокоэффективная жидкостная хроматография. В настоящей статье рассмотрены основные методы анализа, использующиеся для определения хлоргексидина биглюконата в дезинфицирующих средствах и кожных антисептиках. Предложена новая простая методика определения хлоргексидина биглюконата в технических продуктах и дезинфицирующих средствах, основанная на кислотно-основном титровании в среде спирт-кетон. Показано, что в этой среде соляная кислота взаимодействует с двумя наиболее основными атомами азота молекулы хлоргексидина биглюконата. Точку конца титрования устанавливают по переходу синей окраски в зеленую в присутствии бромфенолового синего. Диапазон измеряемых концентраций от 0,1 до 2,0 масс%. Относительная погрешность методики 2,5% при доверительной вероятности $P = 0,95$. Проведено сравнение диодно-матричного детектора и детектора заряженных аэрозолей для анализа хлоргексидина биглюконата. Показано, что детектор заряженных аэрозолей может использоваться для анализа хлоргексидина биглюконата в тех случаях, когда имеются затруднения при анализе с помощью ультрафиолетового или диодно-матричного детектора. Однако, чувствительность детектора заряженных аэрозолей существенно ниже, чем у диодно-матричного, а диапазон линейности меньше. Все рассмотренные методики были проверены на модельных образцах, а также на образцах дезинфицирующих средств, кожных антисептиков, мыл и салфеток с антибактериальным эффектом.

Ключевые слова: хлоргексидин биглюконат, неводное титрование, ВЭЖХ, детектор заряженных аэрозолей

DETERMINATION OF CHLORHEXIDINE DIGLUCONATE IN DISINFECTANTS

S.V. Andreev, E.S. Belyaev, A.O. Ivanova, E.A. Novikova, A.A. Ischenko

Sergey V. Andreev *, Evgeny S. Belyaev, Anna O. Ivanova, Elvina A. Novikova

Department of Chemistry, Scientific Research Disinfectology Institute, Nauchniy proezd, 18, Moscow, 117246, Russia

E-mail: svandreev.niid@gmail.com*, cronse@mail.ru, aisoptra@gmail.com, NovikovaEA@niid.ru

Anatoly A. Ishchenko

Department of Analytical Chemistry, Moscow University of Technology, Institute of Fine Chemical Technologies, Vernadskogo ave., 86, Moscow, 119571, Russia

E-mail: aischenko@yasenevo.ru

Chlorhexidine digluconate has been widely used in lenticular compositions, skin antiseptics and other ready-to-use disinfectants. This is due to its low toxicity, as well as a wide range of antimicrobial effects. A commonly used method for the analysis of commercially available chlorhexidine digluconate (usually available as a 20% aqueous solution) is high-performance liquid chromatography. In this article, the main methods of analysis used to determine chlorhexidine digluconate in disinfectants and skin antiseptics are considered. A new simple technique for the determination of chlorhexidine digluconate in technical products and disinfectants based on acid-base titration in alcohol-ketone is developed. It is shown that in this medium hydrochloric acid interacts with two nitrogen atoms of the chlorhexidine digluconate molecule. The end point of the titration is established by the transition of the blue color to green in the presence of bromophenol blue. The range of measured concentrations is from 0.1 to 2.0 mass%. The relative error of the method is 2.5% with the confidence probability $P = 0.95$. A comparison of the diode array detector and the charged aerosol detector for the determination of chlorhexidine digluconate has been performed. It is shown that a charged aerosol detector can be used to analyze chlorhexidine digluconate in cases where it is difficult to analyze with an ultraviolet or diode array detector. However, the sensitivity of the detector of charged aerosols is significantly lower than that of the diode matrix, and the linearity range is smaller. All methods were tested on model samples, as well as on samples of disinfectants, skin antiseptics, soaps and wipes with antibacterial effect.

Keywords: chlorhexidine digluconate, non-aqueous titration, HPLC, charged aerosol detector

Для цитирования:

Андреев С.В., Беляев Е.С., Иванова А.О., Новикова Э.А., Ищенко А.А. Количественное определение хлоргексидина биглюконата в дезинфицирующих средствах. *Изв. вузов. Химия и хим. технология*. 2018. Т. 61. Вып. 8. С. 4–9

For citation:

Andreev S.V., Belyaev E.S., Ivanova A.O., Novikova E.A., Ischenko A.A. Determination of chlorhexidine digluconate in disinfectants. *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.* 2018. V. 61. N 8. P. 4–9

ВВЕДЕНИЕ

Хлоргексидина биглюконат (1,1'-гексаметилен-бис[5-(4-хлорфенил)бигуанид]биглюконат) (рис. 1) – катионное поверхностно-активное вещество, обладающее широким спектром антимикробной активности и наиболее распространенное для дезинфекции гуанидиновое производное [1,2].

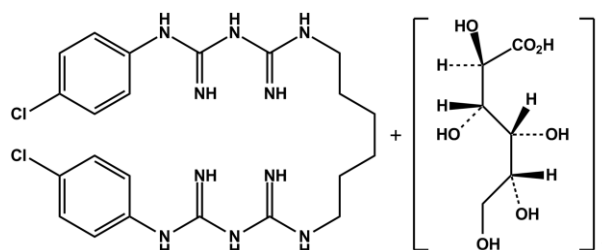


Рис. 1. Хлоргексидина биглюконат
Fig. 1. Chlorhexidine digluconate

Хлоргексидина биглюконат (ХГБ) используется в средствах бытовой химии, в дезинфектантах, в ветеринарных препаратах [3]. В клинической практике его часто используют для обеззараживания кожи, рук и слизистых оболочек [4, 5]. Также его используют при подготовке пациентов к процедурам [6] и для борьбы с биопленками [7].

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) наиболее часто используется для определения хлоргексидина биглюконата. Этот метод описан, например, в 31 выпуске Фармакопеи США [8]. Хроматографию проводят в режиме градиентного элюирования. В качестве элюентов используют ацетонитрил и буферный раствор (содержащий одноосновный фосфат натрия и триэтиламин, рН доводят до 3,0 фосфорной кислотой). Детектирование проводят при 239 нм. Скорость потока около 1,5 мл/мин. Обратнo-фазовая ВЭЖХ с различными условиями описана также в работах [9-16].

В работе [17] описан метод титрования хлоргексидина биглюконата раствором хлорной кислоты в среде ледяной уксусной кислоты. Данный метод имеет диапазон измеряемых концентраций от 0,3 до 1% при относительной погрешности 7%. Этот метод хорошо зарекомендовал себя в практике, однако требует длительной пробоподготовки.

Также известен метод определения ХГБ, основанный на его взаимодействии с катионами Cu^{2+} , с последующим комплексонометрическим определением непрореагировавшей меди. Данный метод был использован для анализа зубных паст [18].

Особенность анализа дезинфицирующих средств заключается в сложности рецептурного состава и многообразии сочетаний различных активных действующих веществ. Отсутствие у большинства производителей современного аналитического оборудования делает актуальной разработку простых методик, которые можно было бы использовать для производственного контроля.

В данной статье предложена новая методика определения хлоргексидина биглюконата, основанная на титровании соляной кислотой в среде спирт-кетон в присутствии индикатора бромфенолового синего.

Также рассмотрена возможность использования детектора заряженных аэрозолей, как альтернатива УФ-детекторам для анализа ХГБ, и проведено сравнение всех трех методов при анализе различных объектов.

Несмотря на меньшую чувствительность, детектор заряженных аэрозолей может быть использован для анализа дезинфицирующих средств.

Так, например, при анализе смесей с дидецилдиметиламмоний хлоридом (ДДАХ) было обнаружено искажение результатов при определении ХГБ с помощью диодно-матричного детектора. С помощью детектора заряженных аэрозолей было установлено, что пики ХГБ и ДДАХ накладываются, что ранее не было замечено в виду того, что дидецилдиметиламмоний хлорид не поглощает в УФ-области спектра.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы и материалы. В работе использовались 20% водный раствор хлоргексидина биглюконата, ацетат аммония для ВЭЖХ (Sigma-Aldrich, Германия), ацетонитрил для ВЭЖХ (Merck, Германия), ацетон, метилэтилкетон, 2-пропанол (все квалификации хч, Компонент-Реактив, Россия), бромфеноловый синий водорастворимый (Россия), кислота соляная 0,1 н., приготовленная из стандарт-титров (Россия), деионизованная вода с сопротивлением не менее 18,2 МОм·см, вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72. Другие использованные реактивы были квалификации чда или выше. Коммерческие реактивы использовались без дальнейшей очистки.

Приборы. Хроматографические исследования проводились на ВЭЖХ-системе Thermo Ultimate 3000 (Thermo Scientific, Германия) с диодно-матричным детектором (Thermo Scientific, Германия) и детектором заряженных аэрозолей (Corona® Veo RS, Thermo Scientific, США). Обработка данных осуществлялась с помощью программного обеспечения Chromeleon 6 (Thermo Scientific, Германия). Потенциометрические измерения проводили с помощью стационарного рН-метра Sartorius PB-11 с электродом ЭСК 10601/7.

Условия хроматографического анализа. Наилучшее разделение компонентов было достигнуто при использовании колонки Thermo Acclaim Surfactant 5 мкм (4,6×250 мм) с подвижной фазой, состоящей из ацетонитрила (А) и 0,1 М водного раствора ацетата аммония (значение рН до 5,4 доводили ледяной уксусной кислотой) (Б). Соотношение элюентов приведено в таблице.

Таблица

**Соотношение элюентов
Table. Solvent gradient elution program**

Время, мин	Доля элюента Б, %
0	75
0	75
13,89	20
21,00	20

Температура термостата колонки 30 °С. Скорость потока – 1мл/мин. Объем вводимой пробы – 10 мкл.

Общая методика кислотно-основного титрования. В случае водных растворов хлоргексидина биглюконата к навеске анализируемой пробы прибавляют ацетон, бромфеноловый синий и титруют 0,1 н. раствором соляной кислоты до перехода окраски раствора из синей в зеленую. В случае, если в анализируемой пробе присутствуют спирты, вместо ацетона используют метилэтилкетон, а к навеске также добавляют 2-пропанол.

Метрологическая обработка. Расчет метрологических характеристик представленных методик проводили в соответствии с [19-21].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Хлоргексидина биглюконат в дезинфицирующих средствах применяется в различных концентрациях. Так в качестве кожных антисептиков его используют в виде 1% водного раствора или 0,5% водно-спиртового раствора, а для целей дезинфекции в виде 0,2% водного раствора, 0,1% и 0,5% водно-спиртового раствора.

В работе [22] предложен титриметрический метод определения хлоргексидина биглюконата с потенциометрическим установлением конечной точки титрования. Метод использован для анализа концентрированного водного раствора хлоргексидина биглюконата, основан на титровании хлоргексидина биглюконата раствором соляной кислоты в водно-ацетоновой среде. Показано, что в указанных условиях скачок значений рН лежит в области 4,5-3,5, титр 0,1 н. раствора соляной кислоты по хлоргексидину биглюконату ($M.M. = 897,6$) составляет $T_{ХГБ} = 0,04488 \text{ г/см}^3$ (в то время, как титр ХГБ при титровании в ледяной уксусной кислоте $T_{ХГБ} = 0,02244$). Объясняя механизм реакции, автор делает вывод о том, что при титровании соляной кислотой в водно-ацетоновой среде протонируются только два наиболее основных атома азота.

В развитие метода [22] нами была исследована возможность использования визуального титрования – в присутствии бромфенолового синего, характеризующегося переходом окраски в установленном потенциометрически интервале рН. Были подобраны условия проведения визуального титрования водных растворов с концентрациями от 0,2 до 2% по ХГБ.

Экспериментальные исследования показали, что водно-спиртовые растворы хлоргексидина биглюконата в среде водного ацетона оттитровать не удастся. В связи с этим, основываясь на литературных данных о применяемых при неводном титровании органических растворителей, в качестве среды титрования нами был выбран метилэтилкетон с добавлением к пробе 2-пропанола.

Подобраны условия проведения визуального титрования раствором соляной кислоты в среде метилэтилкетона водно-спиртовых растворов хлоргексидина биглюконата в диапазоне концентраций от 0,1 до 2,0%. Количественный анализ хлоргексидина биглюконата обеспечивается при добавлении к навеске пробы 2-пропанола.

Для определения хлоргексидина биглюконата в водных растворах до концентрации 0,2% пригодно титрование соляной кислотой в присутствии бромфенолового синего в среде ацетона.

Метрологическая обработка полученных данных показала, что относительная погрешность методики составляет 2,5% при доверительной вероятности $P = 0,95$. Диапазон измеряемых концентраций от 0,1 до 2,0%.

При анализе этим методом образцов промышленно выпускаемых дезинфицирующих средств было обнаружено, что на результат анализа влияет присутствие анионных ПАВ и эмульгаторов, что ограничивает применение данной методики для анализа мыл с антибактериальным эффектом.

Для решения этой проблемы была рассмотрена возможность анализа хлоргексидина биглюконата методом ВЭЖХ. Нами также было проведено сравнение детектора заряженных аэрозоль и диодно-матричного детектора.

Критерием оптимизации условий хроматографического анализа стало разделение пиков хлоргексидина биглюконата и других веществ, входящих в состав дезинфицирующих средств. Были использованы подвижные фазы с различным соотношением ацетонитрила и буферными растворами с разным рН. Колонки Zorbax Eclipse C18 XDB и Thermo Acclaim RSLC 120 C18 не привели к хорошему разделению хлоргексидина и других компонентов, присутствующих в дезинфицирующих средствах. Из полученных нами данных следует, что время удерживания ХГБ в диапазоне рН от 3,5 до 6,0 изменяется незначительно, в то время как значение рН оказывает существенное влияние на времена удерживания других веществ, таких как хлорид алкилдиметилбензиламмония и других поверхностно-активных веществ.

В итоге наилучшее разделение было достигнуто при использовании колонки Thermo Acclaim Surfactant 5 мкм (4,6×250 мм) с подвижной фазой, состоящей из ацетонитрила и 0,1 М водного раствора ацетата аммония (рН 5,4).

На рис. 2 представлен фрагмент 3D-хроматограммы хлоргексидина биглюконата.

Хлоргексидин биглюконат имеет ярко выраженный максимум поглощения при длине волны 260 нм. В некоторых полученных хроматограммах, особенно в больших концентрациях,

наблюдалось раздваивание пика ХГБ, что может быть связано с частичной диссоциацией хлоргексидина биглюконата и образованием хлоргексидина диацетата.

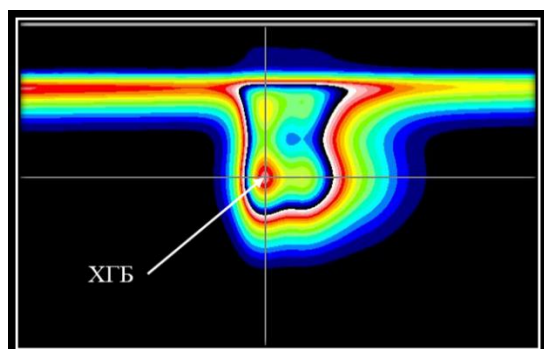


Рис. 2. Фрагмент 3D-хроматограммы ХГБ. Максимум поглощения при 260 нм, время удерживания около 6,5 мин
Fig. 2. 3D chromatogram of chlorhexidine digluconate. UV detection wavelength is 260 nm, retention time is 6.5 min

Диапазон линейности при определении хлоргексидина биглюконата с помощью диодно-матричного детектора составил от 0,012 до 0,111%, предел обнаружения 0,0007%. Относительная погрешность 3,8% при доверительной вероятности $P = 0,95$.

Детектор заряженных аэрозолей при тех же условиях хроматографического анализа имеет диапазон линейности от 0,045 до 0,400%. Предел обнаружения – 0,013%. Относительная погрешность 4,7 % при доверительной вероятности $P = 0,95$.

ВЫВОДЫ

В данной работе рассмотрены три способа определения хлоргексидина биглюконата в дезинфицирующих средствах. Впервые описан метод кислотно-основного титрования в среде спирт-кетон с индикатором бромфеноловым синим. Предложенный метод может быть применен для анализа технических продуктов, а также спирто-содержащих кожных антисептиков. Однако возникают трудности при анализе продуктов, содержащих анионные ПАВ и эмульгаторы.

Показана принципиальная возможность использования детектора заряженных аэрозолей для анализа ХГБ. Несмотря на то, что чувствительность данного детектора ниже, его можно считать более селективным, особенно если учитывать тот факт, что в паре с хлоргексидина биглюконатом часто используются катионные ПАВ. То есть данный тип детектора может быть использован при анализе арбитражных проб.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fraise A.P., Maillard J.-Y., Sattar S.A. Principles and Practice of Disinfection, preservation and sterilization. Blackwell Publishing Ltd. 2013. 618 p.
2. DeBaun B. Evaluation of the antimicrobial properties of an alcohol-free 2% chlorhexidine gluconate solution. *AORN J.* 2008. V. 87. N 5 P. 925-933. DOI: 10.1016/j.aorn.2008.02.001.
3. Borio S., Colombo S., La Rosa G., De Lucia M., Damborg P., Guardabassi L. Effectiveness of a combined (4% chlorhexidine digluconate shampoo and solution) protocol in MRS and non-MRS canine superficial pyoderma: a randomized, blinded, antibiotic-controlled study. *Veterinary dermatology.* 2015. V. 26. N 5. P. 339-345. DOI: 10.1111/vde.12233.
4. Müller G., Langer J., Siebert J., Kramer A. Residual antimicrobial effect of chlorhexidine digluconate and octenidine dihydrochloride on reconstructed human epidermis. *Skin pharmacology and physiology.* 2014. V. 27. N 1. P. 1-8. DOI: 10.1159/000350172.
5. Kramer A., Assadian O., Koburger-Janssen T. Antimicrobial efficacy of the combination of chlorhexidine digluconate and dexpanthenol. *GMS hygiene and infection control.* 2016. V. 11. P. 1-6. DOI: 10.3205/dgkh000284.
6. Gould F.K., Elliott T.S.J., Foweraker J., Fulford M., Perry J.D., Roberts G.J., Sandoe J.A.T., Watkin R.W. Guidelines for the prevention of endocarditis: report of the working party of the British society for antimicrobial chemotherapy. *J. Antimicrob. Chemotherapy.* 2006. V. 57. P. 1035-1042. DOI: 10.1093/jac/dkl121.
7. Bukhary S., Balto H. Antibacterial efficacy of octenisept, alexidine, chlorhexidine, and sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J. endodontics.* 2017. V. 43. N 4. P. 643-647.

REFERENCES

1. Fraise A.P., Maillard J.-Y., Sattar S.A. Principles and Practice of Disinfection, preservation and sterilization. Blackwell Publishing Ltd. 2013. 618 p.
2. DeBaun B. Evaluation of the antimicrobial properties of an alcohol-free 2% chlorhexidine gluconate solution. *AORN J.* 2008. V. 87. N 5 P. 925-933. DOI: 10.1016/j.aorn.2008.02.001.
3. Borio S., Colombo S., La Rosa G., De Lucia M., Damborg P., Guardabassi L. Effectiveness of a combined (4% chlorhexidine digluconate shampoo and solution) protocol in MRS and non-MRS canine superficial pyoderma: a randomized, blinded, antibiotic-controlled study. *Veterinary dermatology.* 2015. V. 26. N 5. P. 339-345. DOI: 10.1111/vde.12233.
4. Müller G., Langer J., Siebert J., Kramer A. Residual antimicrobial effect of chlorhexidine digluconate and octenidine dihydrochloride on reconstructed human epidermis. *Skin pharmacology and physiology.* 2014. V. 27. N 1. P. 1-8. DOI: 10.1159/000350172.
5. Kramer A., Assadian O., Koburger-Janssen T. Antimicrobial efficacy of the combination of chlorhexidine digluconate and dexpanthenol. *GMS hygiene and infection control.* 2016. V. 11. P. 1-6. DOI: 10.3205/dgkh000284.
6. Gould F.K., Elliott T.S.J., Foweraker J., Fulford M., Perry J.D., Roberts G.J., Sandoe J.A.T., Watkin R.W. Guidelines for the prevention of endocarditis: report of the working party of the British society for antimicrobial chemotherapy. *J. Antimicrob. Chemotherapy.* 2006. V. 57. P. 1035-1042. DOI: 10.1093/jac/dkl121.
7. Bukhary S., Balto H. Antibacterial efficacy of octenisept, alexidine, chlorhexidine, and sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J. endodontics.* 2017. V. 43. N 4. P. 643-647.

8. The United States Pharmacopeia. USP 31. NF 26. Chlorhexidine Gluconate Solution. Rockville. 2008. 1732 p.
9. **Havlíková L., Matysová L., Nováková L., Hájková R., Solich P.** HPLC determination of chlorhexidine gluconate and p-chloroaniline in topical ointment. *J. Pharmaceut. Biomed. Analysis*. 2007. V. 43. P. 1169–1173. DOI: 10.1016/j.jpba.2006.09.037.
10. **Xue Y., Tang M., Hieda Y., Fujihara J., Takayama K., Takatsuka H., Takeshita H.** High-performance liquid chromatographic determination of chlorhexidine in whole blood by solid-phase extraction and kinetics following an intravenous infusion in rats. *J. analyt. toxicol.* 2009. V. 33. N 2. P. 85–91. DOI: 10.1093/jat/33.2.85.
11. **Nicolay A., Wolff E., Vergnes M. F., Kaloustian J., Portugal H.** Rapid HPLC method for determination of parachloroaniline in chlorhexidine antiseptic agent in mouth-rinses, ophthalmic and skin solution. *Am. J. Analyt. Chem.* 2011. V. 2. N 4. P. 422–428. DOI: 10.4236/ajac.2011.24051.
12. **Dogan A., E Basçi N.** Development and validation of RP-HPLC and ultraviolet spectrophotometric methods of analysis for the quantitative determination of chlorhexidine gluconate and benzydamine hydrochloride in pharmaceutical dosage forms. *Current Pharmaceut. Analysis*. 2011. V. 7. N 3. P. 167–175. DOI: 10.2174/157341211796353228.
13. **Chiapetta S.C., de Oliveira É.C., Olivier B.C., Mercante L.A., Henriques D.M., Pereira Netto A.D.** Intralaboratory validation, comparison and application of HPLC-UV-DAD methods for simultaneous determination of benzalkonium chloride, chlorhexidine digluconate and triclosan. *J. Brazil. Chem. Soc.* 2011. V. 22. N 10. P. 1913–1920. DOI: 10.1590/S0103-50532011001000012.
14. **Cardoso M.A., Fávero M.L.D., Gasparetto J.C., Hess B.S., Stremel D.P., Pontarolo R.** Development and validation of an RP-HPLC method for the determination of chlorhexidine and p-chloroaniline in various pharmaceutical formulations. *J. Liq. Chromatog. Relat. Technol.* 2011. V. 34. P. 1556–1567. DOI: 10.1080/10826076.2011.575979.
15. **Gonçalves A.R., do Nascimento L.D., Duarte G.H.B., Simas R.S., Jesus Soares A., Eberlin M.N., Marques L.A.** Liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of p-chloroaniline in gel and aqueous chlorhexidine products used in dentistry. *Chromatographia*. 2016. V. 79. P. 841–849. DOI: 10.1007/s10337-016-3100-6.
16. **Işık B.D., Acar E.T.** Development and Validation of an HPLC Method for the Simultaneous Determination of Flurbiprofen and Chlorhexidine Gluconate. *Chromatographia*. 2018. V. 81. N 4. P. 699–706. DOI: 10.1007/s10337-018-3485-5.
17. МВИ-2-2007-05-3. Методика выполнения измерений содержания хлоргексидина биглюконата в пробах дезинфицирующих средств титриметрическим методом.
18. **Borissova R., Mandjukova S.** Titrimetric and spectrophotometric determination of chlorhexidine digluconate in tooth pastes. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1997. V. 357. P. 977–980. DOI: 10.1007/s002160050285.
19. ICH Guideline: Validation of Analytical Procedures. Text and Methodology, Q2(R1). 2005.
20. ГОСТ Р ИСО 5725.1-6 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений.
21. РМГ 61-2010. Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки.
22. **Крейнгольд С.У.** Практическое руководство по химическому анализу дезинфекционных препаратов. М.: Экспрессринг. 2001. 156 с.
8. The United States Pharmacopeia. USP 31. NF 26. Chlorhexidine Gluconate Solution. Rockville. 2008. 1732 p.
9. **Havlíková L., Matysová L., Nováková L., Hájková R., Solich P.** HPLC determination of chlorhexidine gluconate and p-chloroaniline in topical ointment. *J. Pharmaceut. Biomed. Analysis*. 2007. V. 43. P. 1169–1173. DOI: 10.1016/j.jpba.2006.09.037.
10. **Xue Y., Tang M., Hieda Y., Fujihara J., Takayama K., Takatsuka H., Takeshita H.** High-performance liquid chromatographic determination of chlorhexidine in whole blood by solid-phase extraction and kinetics following an intravenous infusion in rats. *J. analyt. toxicol.* 2009. V. 33. N 2. P. 85–91. DOI: 10.1093/jat/33.2.85.
11. **Nicolay A., Wolff E., Vergnes M. F., Kaloustian J., Portugal H.** Rapid HPLC method for determination of parachloroaniline in chlorhexidine antiseptic agent in mouth-rinses, ophthalmic and skin solution. *Am. J. Analyt. Chem.* 2011. V. 2. N 4. P. 422–428. DOI: 10.4236/ajac.2011.24051.
12. **Dogan A., E Basçi N.** Development and validation of RP-HPLC and ultraviolet spectrophotometric methods of analysis for the quantitative determination of chlorhexidine gluconate and benzydamine hydrochloride in pharmaceutical dosage forms. *Current Pharmaceut. Analysis*. 2011. V. 7. N 3. P. 167–175. DOI: 10.2174/157341211796353228.
13. **Chiapetta S.C., de Oliveira É.C., Olivier B.C., Mercante L.A., Henriques D.M., Pereira Netto A.D.** Intralaboratory validation, comparison and application of HPLC-UV-DAD methods for simultaneous determination of benzalkonium chloride, chlorhexidine digluconate and triclosan. *J. Brazil. Chem. Soc.* 2011. V. 22. N 10. P. 1913–1920. DOI: 10.1590/S0103-50532011001000012.
14. **Cardoso M.A., Fávero M.L.D., Gasparetto J.C., Hess B.S., Stremel D.P., Pontarolo R.** Development and validation of an RP-HPLC method for the determination of chlorhexidine and p-chloroaniline in various pharmaceutical formulations. *J. Liq. Chromatog. Relat. Technol.* 2011. V. 34. P. 1556–1567. DOI: 10.1080/10826076.2011.575979.
15. **Gonçalves A.R., do Nascimento L.D., Duarte G.H.B., Simas R.S., Jesus Soares A., Eberlin M.N., Marques L.A.** Liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of p-chloroaniline in gel and aqueous chlorhexidine products used in dentistry. *Chromatographia*. 2016. V. 79. P. 841–849. DOI: 10.1007/s10337-016-3100-6.
16. **Işık B.D., Acar E.T.** Development and Validation of an HPLC Method for the Simultaneous Determination of Flurbiprofen and Chlorhexidine Gluconate. *Chromatographia*. 2018. V. 81. N 4. P. 699–706. DOI: 10.1007/s10337-018-3485-5.
17. МВИ-2-2007-05-3. Методика выполнения измерений содержания хлоргексидина биглюконата в пробах дезинфицирующих средств титриметрическим методом.
18. **Borissova R., Mandjukova S.** Titrimetric and spectrophotometric determination of chlorhexidine digluconate in tooth pastes. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1997. V. 357. P. 977–980. DOI: 10.1007/s002160050285.
19. ICH Guideline: Validation of Analytical Procedures. Text and Methodology, Q2(R1). 2005.
20. ISO 5725.1-6 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 2. Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method. (in Russian).
21. РМГ 61-2010. State system for ensuring the uniformity of measurements. Indicators of accuracy, accuracy, precision of quantitative chemical analysis techniques. Methods of evaluation. (in Russian).
22. **Kreyngol'd S.U.** Practical guidance on the chemical analysis of disinfection products. М.: Ekspressprint. 2001. 156 p.

Поступила в редакцию (Received) 06.12.2017

Принята к опубликованию (Accepted) 25.07.2018