

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я

**НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ
О.О.БОГОМОЛЬЦЯ**

ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ
хімії ліків та лікарської токсикології
(назва кафедри)

ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему «Модифікація методики ВЕРХ дослідження чистоти субстанції
хлоргексидину як представника ряду біс(хлорфеніл)-(імідодікарбамід-
діамід)-ів»

Виконав: здобувач вищої освіти 5 курсу, групи ФЗА
напряму підготовки (спеціальності)
226 «Фармація, промислова фармація»
(шифр і назва напряму підготовки, спеціальності)

Фармацевтичний факультет, заочна форма навчання
Освітньо-кваліфікаційний рівень «магістр»
«Фармація»
(назва освітньої програми)

Аврамчук Олександра Вікторівна
(прізвище та ініціали)

Керівник: к.б.н., ас. Мелешко Р.А.
(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Рецензент: проф., д.м.н. Ніженковська І.В.
(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Київ – 2023-2024 р.р.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	3
ВСТУП.....	5
ОСНОВНА ЧАСТИНА.....	9
РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОЇ БУДОВИ ТА ВЛАСТИВОСТІ ХЛОРГЕКСИДИНУ.....	9
1.1. Особливості хімічної будови хлоргексидину.....	9
1.2. Біологічна активність хлоргексидину.....	13
РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ ХЛОРГЕКСИДИНУ.....	15
2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості хлоргексидину.....	15
РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	25
ВИСНОВКИ.....	35
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	36
SUMMARY.....	41
ДОДАТОК 1.....	42

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

г – грам

ГМДС – гексаметилдисилоксан

ГРХ – газо-рідинна хроматографія

ДФУ – Державна Фармакопея України

ДМСО – диметилсульфоксид

ДМФА – диметилформамід

ІЧ спектр – інфрачервоний спектр

мкл – мікролітр

мкм – мікрометр

мл – мілілітр

ММ – молекулярна маса

НРФ – нерухома рідка фаза

нм – нанометр

РХ – рідинна хроматографія

см⁻¹ – обернений сантиметр

Спектр ПМР – спектр протонно-магнітного резонансу

ТМС – тетраметилсілан

ТГФ – тетрагідрофуран

T. кип. – температура кипіння

T. пл. – температура плавлення

УФ спектр – ультрафіолетовий спектр поглинання

ЯМР ^1H – спектр ядерно-магнітного резонансу протонний

Alk – алкіл-радикал

Ar – арил-радикал

$^{\circ}\text{C}$ – градуси Цельсія

CG – хлоргексидин

Hal – галоген

J, Гц – значення константи спінової взаємодії, герци

ВСТУП

Актуальність теми. Хлоргексидин (або СНХ, СНГ, 1,6-біс(4-хлорофенілбігуанідо)гексан — це дезінфікуючий, антисептичний засіб, який використовується для дезінфекції шкіри, для стерилізації хірургічних інструментів, для очищення ран, лікування дріжджових інфекцій ротової порожнини [1-3].

Хлоргексидин використовують у вигляді рідини або порошку, у формі солі – глюконат або ацетат. В основі молекул хлоргексидину лежить конденсована система, яка складається із трьох фрагментів – бігуаніду, гексаметилену, 4-хлорфенілу. Це система біс, яка об'єднує всі три фрагменти двічі.

Бактерицидну ефективність гуанідних, бігуанідних і бісбігуанідних агентів вивчали на інтактних сформованих бляшок чотирьох оральних (бляшкоутворюючих) мікроорганізмів: *Streptococcus mutans*, *S. sanguis*, *Actinomyces viscosus* і *A. naeslundii*. Активність цих сполук досліджували на підставі особливостей їх молекулярної конфігурації. Дослідження показали, що біс- та бігуанідні конфігурації є більш ефективними, оскільки мали достатню довжину алкільного бічного ланцюга. Необхідно вказати, що ні один структурний фрагмент окремо не визначає ефективність.

Вивчено дію гуанідних, бігуанідних та бісбігуанідних агентів для визначення мінімальних умов (концентрації, тривалості та частоти) лікування, їх клінічної ефективності. Гуанідні, бігуанідні та бісбігуанідні засоби мають більшу ефективність, ніж препарат порівняння – хлоргексидину диглюконат. Визначено бактерицидний індекс зубного нальоту для найсильніших досліджуваних агентів. Порівняння з бактерицидними властивостями хлоргексидину виражено як хлоргексидиновий коефіцієнт [4, 5].

Хлоргексидин є ототоксичним лікарським засобом. Якщо хлоргексидин потрапляю у слуховий прохід із тріснутою барабанною перетинкою, то може розвиватися глухота. Хлоргексидин не відповідає сучасним європейським вимогам до дезінфікуючого засобу для рук. Медичний центр Хантера Холмса МакГуайра (США) виявив під час досліджень, що під час щоденного використання хлоргексидину глюконату для купання (наноситься на мочалку) знижує ризик внутрішньолікарняних інфекцій.

Питання щодо канцерогенного потенціалу хлоргексидину й досі з'ясовується. Управління з контролю за якістю харчових продуктів і медикаментів США рекомендує обмеження використання рідини для полоскання ротової порожнини хлоргексидину глюконату.

При попаданні внутрішньо до організму хлоргексидин погано всмоктується в ШКТ, може викликати подразнення шлунка або нудоту. Випадки аспірації хлоргексидину в легені може призвести до летального результату через високий ризик гострого респіраторного дистрес-синдрому.

Проведена оцінка ефективності хлоргексидину як ополіскувача ротової порожнини хлоргексидину як доповнення до механічних процедур гігієни ротової порожнини. Вивчався контроль гінгівіту та зубного нальоту, порівняно з механічними процедурами гігієни ротової порожнини. Механічні процедури гігієни порожнини рота це чищення зубів, чищення міжзубних проміжків, професійне чищення зубів/лікування пародонту. Встановлено, що хлоргексидин рекомендовано використовувати у якості ополіскувача лише один раз на день. Не рекомендовано використовувати хлоргексидин два рази на день.

Таким чином, хлоргексидин відноситься до небезпечних лікарських засобів, тому, контроль якості цього препарату є важливим для захисту здоров'я та життя пацієнтів.

Хлоргексидин є поліфункціональна органічна сполука. Молекула містять фармакофорні угруповання, функціональні групи – галоген (хлор), аміно групи, феніл радикали, подвійні зв'язки. Субстанція хлоргексидину може досліджуватися як хімічними методами, так, й інструментальними методами. Можна передбачити формування у субстанції внутрішньомолеулярних зв'язків за рахунок вільних аміно груп, реакцій деградації молекул шляхом гідролізу, елімінування атомів галогену.

Під час синтезу хлоргексидину можуть утворюватися побічні продукти, неприпустимі домішки – супровідні речовини або споріднені речовини, які будуть впливати на якість субстанції.

Тому, важливо вводити у фармацевтичний аналіз субстанції хлоргексидину сучасні інструментальні методи, окрім тих методів, які рекомендовано Фармакопеями, для підвищення рівню якості аналізу.

У разі не коректно розроблених умов хроматографування під час проведення хроматографічних досліджень, пробопідготовки зразків, методик спектрального дослідження можливе отримання не коректних результатів дослідження.

Тому, актуальним завданням є розробка хроматографічних умов при дослідженні субстанції хлоргексидину методом ВЕРХ, методик пробопідготовки зразків при дослідженнях спектральними методами, які дозволять правильно інтерпретувати результати та зробити висновки щодо якості досліджуваного зразку.

Мета і завдання дослідження. Метою експериментального дослідження є розробка умов хроматографування при аналізі методом ВЕРХ та абсорбційної спектрофотометрії в ІЧ-області зразку субстанції хлоргексидину, які дозволять зробити висновок щодо її якості.

Завдання експериментального дослідження:

- розробити умови хроматографування методом ВЕРХ субстанції хлоргексидину з метою визначення супровідних речовин та домішок;
- розробити методика хроматографування методом ВЕРХ та методика спектрального дослідження методом абсорбційної спектрофотометрії в ІЧ-області субстанції хлоргексидину;
- провести інструментальні дослідження випробувальних зразків у порівнянні зі стандартними за розробленою методикою та інтерпретувати отримані результати.

Методи дослідження. Високоєфективна рідинна хроматографія на хроматографі Agilent 1260 Infinity II з УФ детектором, колонка – INERTSIL ODS-3V, 250x4,6x5; абсорбційна спектрофотометрія в ІЧ-області (спектрометр Specord M-80); комп'ютерний аналіз за програмою OpenLab CDS.

Новизна та значення одержаних результатів. Новизна експериментального дослідження полягає розробці умов хроматографування методом ВЕРХ та спектральних досліджень субстанції хлоргексидину з метою підтвердження її якості.

Апробація результатів дослідження. Результат досліджень апробовано на міжнародній науково-практичній конференції «Освіта і наука в період глобальних криз та конфліктів у XXI столітті» (Секція «Природничі науки»), НАН ВО України, м. Київ, 08-09 грудня 2023 року.

Публікації: За матеріалами дослідження подані до публікації 1 тези доповіді.

Структура роботи: загальну кількість сторінок – 43, кількість розділів – 3, кількість додатків – 1, кількість використаних джерел – 34.

ОСНОВНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОЇ БУДОВИ ТА ВЛАСТИВОСТІ ХЛОРГЕКСИДИНУ

1.1. Особливості хімічної будови хлоргексидину

Хлоргексидин має хімічну номенклатурну назву ІЮПАК 1,6-біс(4-хлоро-фенілбігуанідо)гексан. Хлоргексидин використовують у формі солей: глюконат, диглюкона, ацетат, діацетат. Молекула складається із біс-фрагментів та, одночасно, фармакофорів: бігуанід, гексаметилен, 4-хлорфеніл. Молекула хлоргексидину – це ароматична система з делокалізованою електронною густиною, має основні властивості за рахунок присутності у біциклічній системі 10 аміно груп. Молекула хлоргексидину – це спряжена система. Спряження відбувається за рахунок перекриття електронної густини подвійних зв'язків не циклічних фрагментів та подвійних зв'язків феніл радикалів (рис. 1.1.1, 1.1.2) .

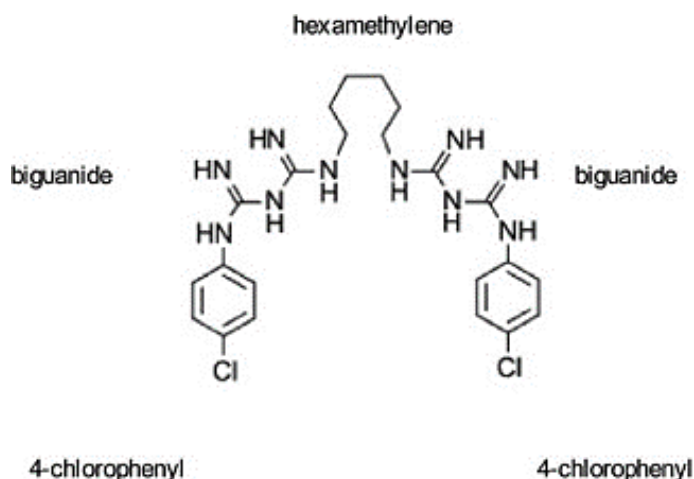


Рисунок 1.1.1. Хімічна формула хлоргексидину із вказаними фармакофорами.

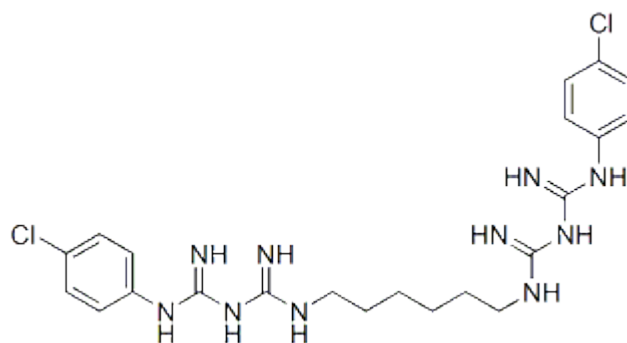


Рисунок 1.1.2. Хімічна формула хлоргексидину.

Хлоргексидину ацетат використовують як загальний антисептик у розчинах 0,05% та 0,1%. Його застосовують для очищення ран, дезінфекції ран, антисептичної обробки опіків (рис. 1.1.3).

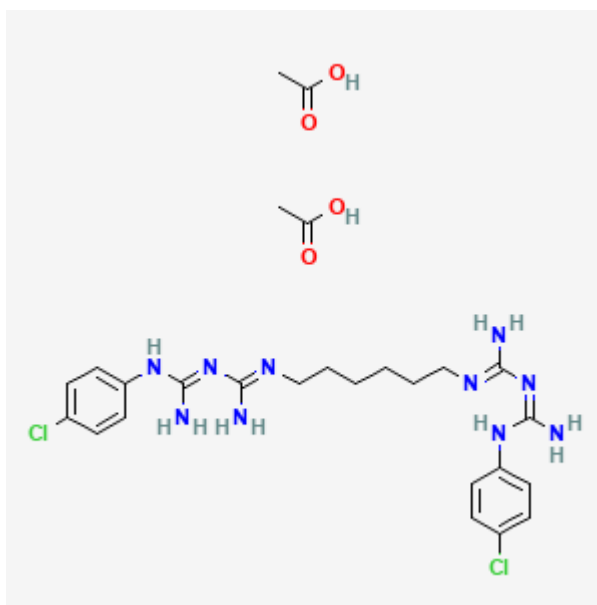


Рисунок 1.1.3. Хімічна формула хлоргексидину ацетату.

Засіб для дезінфекції шкіри «0,5% хлоргексидину глюконат у 70% спирті» (0,5% CHG-70% alc), як стало відомо, може спричинити ураження шкіри у недоношених дітей. Тому, 0,2% розчин хлоргексидину глюконату в ацетаті (0,2% CHG-ацетат) введено в якості дезінфікуючого засобу для шкіри дітей у відділеннях інтенсивної терапії новонароджених.

Використання 2% хлоргексидину глюконату (CHG) знижує рівень інфекції, пов'язаної з центральним кровотоком (CLABSI), на 40%. Навпаки, купання з хлоргексидином не знижує рівень CLABSI. Дослідження включали результат частоти інфікування кровотоку. Чотири дослідження були включені в мета-аналіз наслідків первинних інфекцій кровотоку. Визначено відносний ризик 0,46 з 95% довірчим інтервалом (0,34-0,63). Суттєвий ефект видно за загальним z-показником 4,84 ($P < 0,0001$). Проведений мета-аналіз підтверджує, що 2% CHG знижує CLABSI. Необхідно зауважити, що вартість одного CLABSI в 10 разів перевищує вартість використання тканин, просочених 2% CHG [6-9].

Розчин хлоргексидину диглюконату — це катіонний антибіотик широкого спектру дії сімейства біс(бігуанідів). Він є доступним у різних концентраціях, безпечно використовується протягом понад 40 років. Має специфічне використання для догляду за пуповиною у формі 7,1% хлоргексидину диглюконату (CHX). У 2013 році ВООЗ додала CHX до Модельного списку основних лікарських засобів для дітей; а у 2014 випустила нову настанову щодо догляду за пуповиною з офіційною рекомендацією щодо використання хлоргексидину.

Хлоргексидину диглюконат – це антисептик широкого спектру дії. Механізм його дії: дестабілізація зовнішньої бактеріальної мембрани. Він ефективний для грампозитивних та грамнегативних бактерій, має бактерицидний та бактериостатичний механізми дії. Механізмом дії є руйнування мембрани, а не інактивація АТФ. Засіб може бути корисним проти грибків і вірусів з оболонкою. Хлоргексидин шкідливий у високих концентраціях. Його можна безпечно використовувати в низьких концентраціях у рідинах для полоскання рота та розчинах для контактних лінз (рис. 1.1.4).

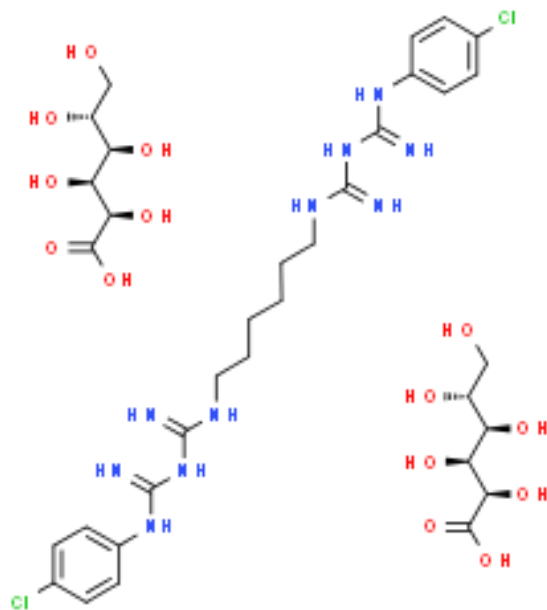


Рисунок 1.1.4. Хімічна формула хлоргексидину диглюконату.

Хлоргексидину глюконат використовують для полоскання порожнини рота з метою лікування гінгівіту (набряк, почервоніння, кровоточивість ясен). Цей лікарський засіб призначає стоматолог. Хлоргексидину глюконат не підходить для лікування всіх типів гінгівіту (рис. 1.1.5).

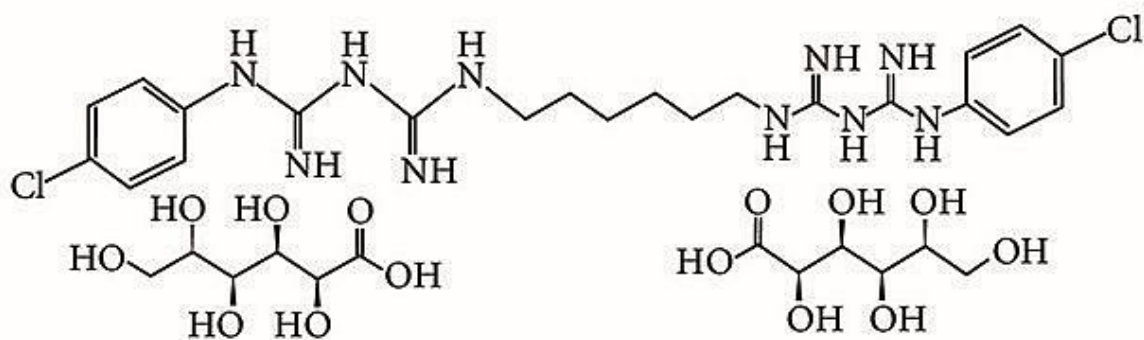


Рисунок 1.1.5. Хімічна формула хлоргексидину глюконату.

1.2. Біологічна активність хлоргексидину

Була досліджена антибактеріальна активність наноемульсії з ефірною олією (ЕО) кориці (*Cinamomum cassia*) як рідини для полоскання рота. Готували наноемульсій з двома типами поверхнево-активних речовин, Tween 80, соєвим лецитином, ЕО кориці.

Лікування порівнювали з хлоргексидином (контроль) за мінімальними інгібіторними та бактерицидними концентраціями (МІС та МВС), синергізмом між лікуваннями та кінетикою антимікробної активності проти *Streptococcus mutans*. Проведено хімічну характеристику ЕО кориці та характеристику наноемульсій.

Наноемульсії показали антимікробну активність у МІС і СВМ 0,625 мг мл⁻¹ проти *Streptococcus mutans* та 0,01 мг мл⁻¹ хлоргексидину. Не виявлено синергізму між кожною наноемульсією ЕО кориці та хлоргексидином.

Порівнюючи ефективність наноемульсій з 0,12% хлоргексидином у кількісному визначенні, зроблено висновок, що їх ефективність лікування приблизно однакового рівня.

Допоміжне лікування пародонтозу залежить від багатьох факторів. Так, проведені дослідження, при яких порівнювали ефективність 0,12% розчину хлоргексидину та ефірних олій при лікуванні хронічного періодонтиту.

Зниження стану пародонта вимірювали за допомогою пародонтального зонда шляхом аналізу значень глибини зонда та рівня клінічного введення через 3-5 місяців. Статистичний аналіз прогресу проводився за допомогою тестів Стьюдента., Апова та Тьюкі з рівнем значущості < 0,05.

Результати досліджень показали, 0,12% хлоргексидин є більш ефективним, тоді як суттєвої різниці між ефірними оліями та контрольною групою не було. Хлоргексидин у концентрації 0,12%, пов'язаний із луценням

коренів, є кращим, ніж терапія ефірними маслами при лікуванні хронічного періодонтиту [10-15].

Таким чином, хлоргексидин (СНХ) є ефективнішим антисептиком для полоскання рота. Ефірні олії (тимол) мають інгібуючу та біоцидну дію на цілий ряд бактерій. Планувалося провести дослідження впливу рідини для полоскання рота, яка містить СНХ та тимол, на лікування гінгівіту.

Проводили подвійне сліпе рандомізоване клінічне дослідження на 60 пацієнтах з гінгівітом: група I (СНХ/тимолова рідина для полоскання рота-Vi-one) і група II (СНХ рідина для полоскання рота-Behsa). Пацієнти в кожній групі пройшли процедуру видалення зубів, планування коренів і полірування. Полоскали рот 60 секунд двічі на день, вранці і ввечері. Індекс зубного нальоту, індекс ясен, індекс кровоточивості та індекс плями оцінювали на початку дослідження та через 14 днів. Аналіз даних проводили за допомогою SPSS версії 21.

Результати показали, що індекс зубного нальоту та гінгівальний індекс зменшилися у двох групах ($p < 0,001$). Проте група I була значно ефективнішою, ніж група II ($p < 0,001$, $p = 0,021$ відповідно).

Подібні результати спостерігалися щодо індексу кровотечі – дві групи істотно не відрізнялися одна від одної ($p = 0,879$). Обидві групи значно збільшили індекс плям.

На підставі результатів цього дослідження зроблено висновок, що ополіскувач для ротової порожнини СНХ/тимол є більш ефективним та його можна рекомендувати пацієнтам із гінгівітом, спричиненим зубним нальотом [16-21].

РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ ХЛОРГЕКСИДИНУ

2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості хлоргексидину

Спосіб отримання сполуки хлоргексидину включає наступні стадії: реакція гексаметилендиціаногuanідину та гідрохлориду хлораніліну як сировини. Використовують ефір гліколю або нормальний бутанол як розчинник.

Оскільки ефір гліколю або звичайний бутанол використовуються як розчинник, вплив токсичних ефектів розчинника на організм людини зменшується. Зменшується забруднення навколишнього середовища.

Каталізатор не використовується в процесі синтезу, тому, процес подальшої обробки спрощується. Вихід кінцевого продукту сягає 84,7%. Чистота кінцевого продукту 97%.

За іншим способом, хлоргексидин синтезується взаємодією двох молекул прогуанілу, з'єднаних гексаметилендіаміновим спейсером (рис. 2.1.1).

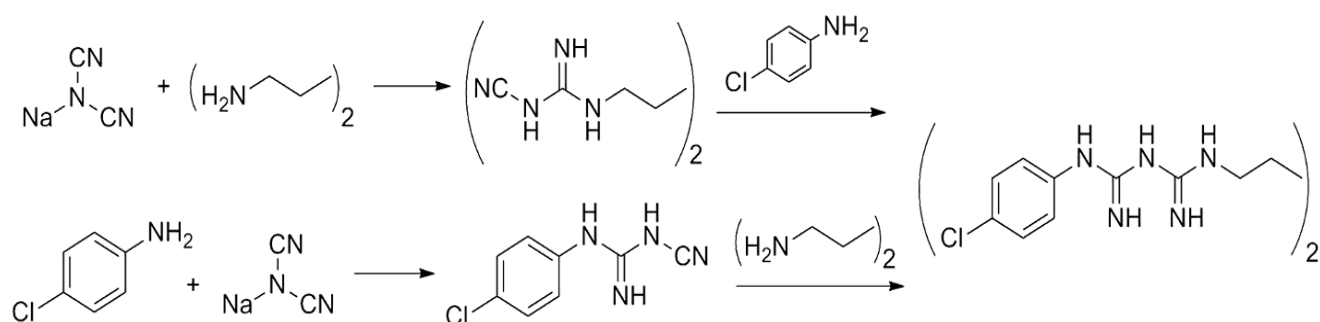


Рисунок 2.1.1. Схема синтезу хлоргексидину.

На другій стадії синтезу використовують пара-хлоранілін, який вступає в реакцію за рахунок вільної аміно групи. Це – це реакція конденсації.

Синтез хлоргексидину полягає в реакції в етанолі за допомогою гідрохлориду аміду *n*-хлорбензойної кислоти та диціандіаміду натрію. Отримують проміжну сполуку, яка реагує з гідрохлоридом гексаметилендіаміну при повторному нагрівання в олії мірбану.

При чому, токсичний побічний ефект великий від застосування олії мірбану. Головне, що утворюються побічні продукти, що негативно впливає на промислове застосування хлоргексидину [22-25].

Описано колориметричне визначення хлоргексидину, яке засноване на утворенні жовтого комплексу між препаратом та бромкрезоловим зеленим. Утворений комплекс екстрагують хлороформом. Пік поглинання цього комплексу знаходиться при 410 нм. Лінійна відповідь досягається від 2,5 до 30 мкг хлоргексидину/мл.

Точність і відтворюваність цього методу роблять його корисним для визначення хлоргексидину при контролі фармацевтичних сумішей.

Спектрофотометричне визначення слідових кількостей хлоргексидину проводили рідинно-рідинною екстракцією. Використовували бромфеноловий синій з проточною системою.

Було можливим визначення хлоргексидину в діапазоні від 1×10^{-4} до 1×10^{-5} М при частоті відбору 40 проб на годину. Метод відноситься до задовільних для застосування при визначенні хлоргексидину у фармацевтичних препаратах.

Простий спектрофотометричний метод був розроблений для визначення хлоргексидину (СН) з комплексом о-гідроксигідрокінонефталеїн(ОП)-марганець(II). Молярне поглинання та

відносне стандартне відхилення для 50,6 мкг СН становили $5,88 \times 10^4$ л моль⁻¹ см⁻¹ і 0,47% (N=8). Цей метод був розроблений для визначення СН у широкому спектрі фармацевтичних препаратів. З термодинамічних параметрів ($\Delta G = -5,49$ ккал моль⁻¹, $\Delta H = 0,04$ ккал моль⁻¹ і $\Delta S = 18,60$ кал моль⁻¹ К⁻¹), отриманих за графіком Вант-Гоффа, зв'язування між СН і QR-Комплекс марганцю(II) вважався гідрофобним.

Хлоргексидин можна аналізувати за допомогою різних методів аналізу, однак ВЕРХ є найбільш ефективним методом.

Розроблено прості, специфічні, точні та спектрофотометричні методи визначення хлоргексидину глюконату (CG) у присутності його домішок та/або продуктів розпаду: пара-хлор-анілін (РСА).

Метод А є спектрофотометричним, де CG визначається спектрофотометричним методом першої похідної D1 у присутності продукту розпаду РСА (при 272 нм). РСА визначається в присутності CG спектрофотометричним методом другої похідної D2 (при 248,6 нм).

Метод В є першою похідною від спектрофотометрії співвідношення спектрів, яка визначає CG при 266,8 нм, РСА при 328 нм.

Метод С — спектрофотометрія з подвійною довжиною хвилі (DWS) з двома довжинами хвилі. 233 і 253 нм для CG. 253,8 і 262 нм для РСА – різниця в поглинанні повинна бути нульовою для другого компоненту.

Метод D – це спектрофотометрія з відніманням співвідношення та спектрофотометрія (EXRS). CG визначають шляхом ділення спектру суміші на концентрацію дільника 5 мкг мл⁻¹ РСА. РСА можна визначити шляхом ділення спектру суміші концентрацією дільника 50 мкг мл⁻¹ CG. Специфіку цих методів досліджено аналізом виготовлених сумішей ХГ та ПКА.

Значення стандартного відхилення – менше 1,5 при аналізі сировини та таблеток. Проведено статистичне порівняння всіх методів: без істотної різниці у точності, що забезпечує їх застосовності при аналізі контролю якості лікарського засобу хлоргексидину [22-25].

Розроблено синтез, досліджено кристалічну структуру та антимікробну ефективність нової композиції, яка містить співвідношення 1:2 хлоргексидину (CHX) до N-циклогексилсульфамату (штучного підсолоджувача).

Хімічна структура визначається за допомогою комбінації рентгенівської дифракції монокристалів (SC-XRD), іонізаційної мас-спектрометрії з електророзпиленням (ESI-MS), спектроскопії ^1H ядерного магнітного резонансу (ЯМР), кореляційної спектроскопії (COSY) та інфрачервона спектроскопія Фур'є з ослабленим повним відображенням (ATR-FTIR).

Нова композиція хлоргексидину (CHX) та N-циклогексилсульфамату містить важливий протимікробний препарат хлоргексидин; проявляє антимікробну дію в концентраціях менше 15 мкг/мл; забезпечує унікальний спосіб доставки основного активного фармацевтичного інгредієнта (API). Заміна неактивного глюконату на біоактивний цикламатний протион забезпечує додаткову перевагу покращення смакового профілю хлоргексидину [26-32].

Протимікробний засіб хлоргексидин вважається стандартом в стоматології. Тимол - це фенол, який міститься в ефірних оліях різних видів рослин та має антимікробний потенціал.

Синергічні ефекти можуть бути досягнуті при спільному застосуванні цих активних фармацевтичних інгредієнтів у технологічних продуктах, у вигляді мікрочастинок із контрольованим вивільненням. Розроблена аналітична методологія із застосуванням дизайну Бокса-Бенкена та

використанням методу ВЕРХ, яка допомагає кількісно визначати хлоргексидин і тимол одночасно в матриці з фармацевтичними ексципієнтами.

Рухома фаза складалася з метанолу та 0,03 М одноосновного натрій-фосфатного буфера (60:40). Нерухома фаза – 0,4% триетиламіну та октилсилану. Метод виявився селективним у присутності продуктів розпаду хлоргексидину та тимолу.

Для хлоргексидину метод був лінійним від 4,8 до 19,2 мкг/мл. Для тимолу від 8,0 до 32,0 мкг/мл.

Точність – до 100%, а оцінка точності мала значення коефіцієнта варіації <5%.

Оскільки метод базувався на дизайні Вох-Бенкен, він був надійним та корисним як допоміжний у процесах контролю якості цих активних фармацевтичних інгредієнтів (рис. 2.1.2).

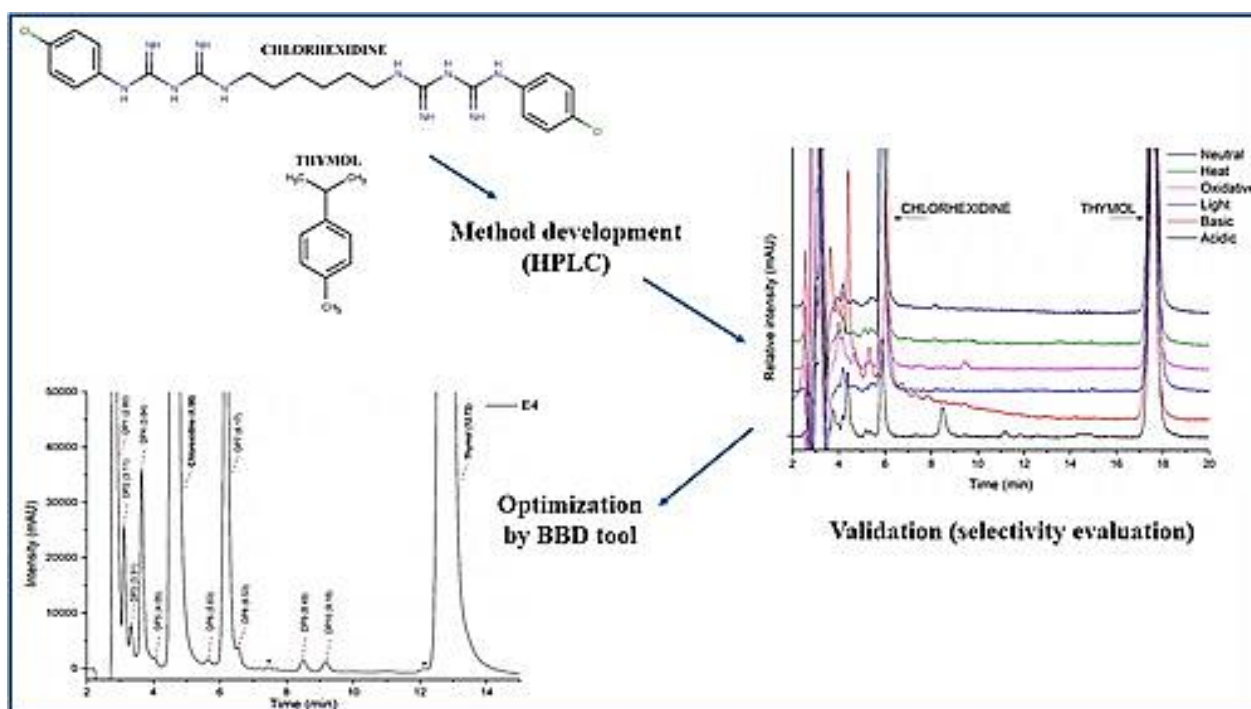


Рисунок 2.1.2. Аналіз хлоргексидину.

Синтез біологічно мезопористих органокремнієвих наноантисептиків з хлоргексидином показано на рисунку 2.1.3.

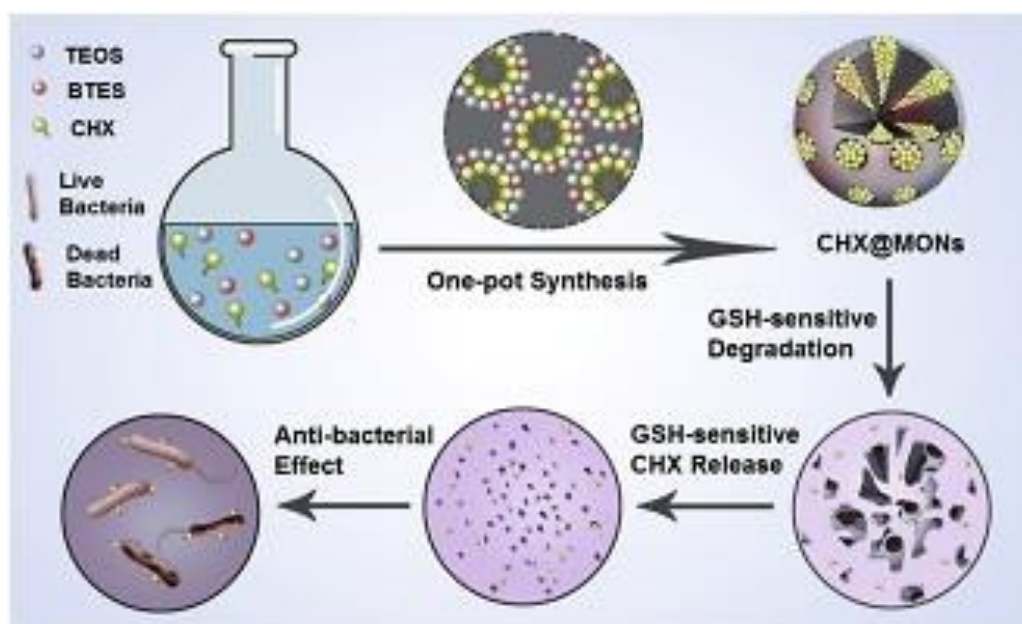


Рисунок 2.1.3. Схема синтезу наносептиків з хлоргексидином.

Розроблено біологічно розкладані мезопористі наночастинки кремнезему (MON), використовуючи CHX як біфункціональний агент.

Хлоргексидин не діє як катіонна матриця для формування структури мезопор, однак, він служить антисептиком широкого спектру дії. Отримані наномептики демонструють високий вміст CHX, його вивільнення CHX. Реагує на глутатіон (GSH) за допомогою механізму, контрольованого деградацією матриці. Це призводить до порівнянних антибактеріальних ефектів з CHX на *Escherichia coli*, на *Staphylococcus aureus*.

Ефективна антибактеріальна концентрація CHX@MONs демонструє меншу цитотоксичність для нормальних клітин. Ці дослідження допоможуть збільшити використання CHX як антисептика.

На рисунку 2.1.4 показано схему синтезу хлоргексидину глюконату.

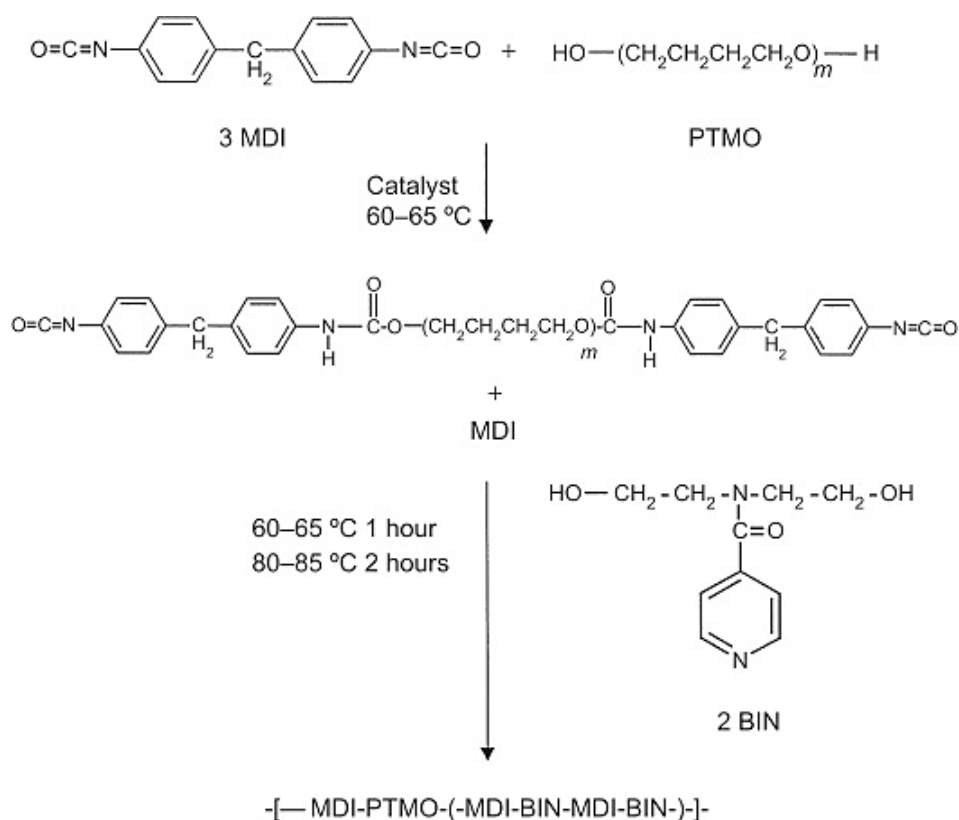


Рисунок 2.1.4. Схема синтезу хлоргексидину глюконату.

На рисунку 2.1.5 представлено хроматограму хлоргексидину, ізольованого під час хіміко-токсикологічних досліджень із плазми крові. Час утримання хлоргексидину та екстракту крові близький, тому складно ідентифікувати сигнал хлоргексидину.

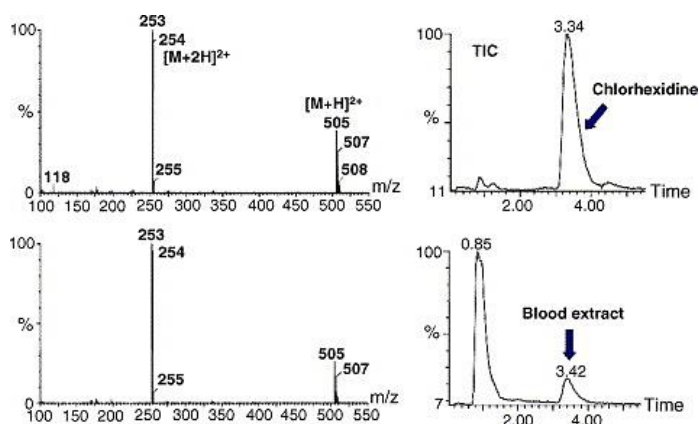


Рисунок 2.1.5. Хроматограма хлоргексидину (Rt 3.34 хв), екстракт із крові (Rt 3.42 хв).

Якщо розглядати Хлоргексидин як лікарську речовину – субстанцію для проведення фармацевтичного аналізу, то ДФУ не регламентує аналіз цієї речовини [33]. Європейська Фармакопея [34] регламентує аналіз Хлоргексидину діацетату, Хлоргексидину діглюконату розчину, Хлоргексидину дигідрохлориду.

Хлоргексидину дигідрохлорид – це кристалічний порошок білого або майже білого кольору. М.м. 578,4.

Його хімічна номенклатурна назва за ІЮПАК – 1,6-біс(4-хлоро-фенілбігуанідо)гексан (рис.2.1.5).

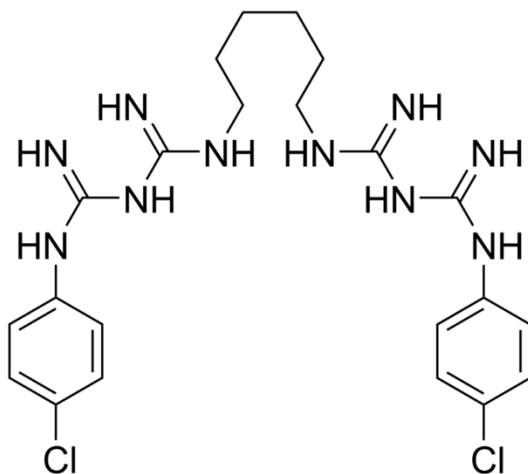


Рисунок 2.1.5. Хімічна формула хлоргексидину.

Хлоргексидину дигідрохлорид. Чистота 98,0-101,0% (суха речовина). Субстанція дуже добре розчинна у воді *P* та у етанолі (96%) *P*, добре розчинна у пропілен гліколі.

За Eur.Ph. Хлоргексидину дигідрохлориду ідентифікується методом абсорбційної ІЧ-спектрофотометрії (2.2.24), відповідністю спектру ФСЗ хлоргексидину дигідрохлориду, ТШХ (субстанцію розчиняють у метанолі), хімічним методом – реакціями на хлориди (2.3.1). Виявляють домішку Р (хлоранілін) за методом 2.2.25 – сигнал при 556 нм.

Ідентифікацію супровідних домішок субстанції Хлоргексидину дигідрохлориду проводять методом РХ (2.2.29).

Тестовий розчин готують у рухомій фазі А.

Для приготування рухомої фази А використовують суміш розчинників: трифлуороацетатна кислота *P* – ацетонітрил *P* – трифлуороацетатна кислота *P* у воді для хроматографування, 0,1% *P* (20 : 20 : 80, V/V/V).

Для приготування рухомої фази В використовують суміш розчинників: трифлуороацетатна кислота *P* – трифлуороацетатна кислота *P* у воді для хроматографування *P* – трифлуороацетатна кислота *P* у ацетонітрилі *P* (10 : 10 : 90, V/V/V).

УФ-детектування при 254 нм.

Специфіковані домішки – А, В, Н, J, К, N, О.

Хлоргексидину діглюконату розчин. М.м. 898.

Чистота 190,0 г/л – 210,0 г/л. Розчин безбарвний або жовтуватий.

Розчин змішується з водою; змішується із не більше, ніж 3-ма частинами ацетону; змішується із не більше, ніж 5-ма частинами етанолу (96%).

За Eur.Ph. Хлоргексидину діглюконату розчин ідентифікується методом абсорбційної ІЧ-спектрофотометрії (2.2.24), відповідністю спектру ФСЗ хлоргексидину діглюконату, ТШХ (2.2.27), хімічним методом – 1) реакція з титану жовтим; осад, що випадає рекристалізують, сушать при 100-105 °С. визначають температуру плавлення сухого залишку при 132-136°С; 2) реакція з цетримідом Р, з натрію гідроксидом розчином та бромною водою – спостерігається глибоке червоне забарвлення.

Виявляють домішку Р (хлоранілін) за методом 2.2.25 – сигнал при 556 нм.

Ідентифікацію супровідних домішок субстанції Хлоргексидину дигідрохлориду проводять методом РХ (2.2.29).

Тестовий розчин готують у рухомій фазі А.

Для приготування рухомої фази А використовують суміш розчинників: трифлуороацетатна кислота *P* – ацетонітрил *P* – трифлуороацетатна кислота *P*

у воді для хроматографування, 0,1% *P* (20 : 20 : 80, V/V/V).

Для приготування рухомої фази В використовують суміш розчинників: трифлуороацетатна кислота *P* – трифлуороацетатна кислота *P* у воді для хроматографування *P* – трифлуороацетатна кислота *P* у ацетонітрилі *P* (10 : 10 : 90, V/V/V). УФ-детектування при 254 нм.

Специфіковані домішки – А, В, F, G, H, I, J, K, L, N, O. Q – неспецифікована домішка, структура не відома.

Хлоргексидину діацетат. М.м. 626. Це мікрокристалічний порошок білого або майже білого кольору.

Чистота 98,0-101,0% (суха речовина). Субстанція добре розчинна у воді *P* та у етанолі (96%) *P*, легко розчинна у пропілен гліколі та гліцерині.

За Eur.Ph. Хлоргексидину діацетат ідентифікується методом абсорбційної ІЧ-спектрофотометрії (2.2.24), відповідністю спектру ФСЗ хлоргексидину діацетату, ТШХ (2.2.27) – субстанцію розчиняють у метанолі, рухома фаза: безвона мурашина кислота *P* – вода *P* – етанол (96%) *P* – метилен хлорид *P* (7 : 10 : 40 : 50, V/V/V/V).

Виявляють домішку Р (хлоранілін) за методом 2.2.25 – сигнал при 556 нм.

Ідентифікацію супровідних домішок субстанції Хлоргексидину проводять методом РХ (2.2.29).

Тестовий розчин готують у рухомій фазі А.

Для приготування рухомої фази А використовують суміш розчинників: трифлуороацетатна кислота *P* – ацетонітрил *P* – трифлуороацетатна кислота *P* у воді для хроматографування, 0,1% *P* (20 : 20 : 80, V/V/V).

Для приготування рухомої фази В використовують суміш розчинників: трифлуороацетатна кислота *P* – трифлуороацетатна кислота *P* у воді для хроматографування *P* – трифлуороацетатна кислота *P* у ацетонітрилі *P* (10 : 10 : 90, V/V/V). УФ-детектування при 254 нм.

Специфіковані домішки – А, H, I, K, N, O, P.

РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Державна Фармакопея України не регламентує аналіз хлоргексидину субстанції. Європейська Фармакопея [34] висуває певні вимоги до фармацевтичного аналізу лікарських засобів: Хлоргексидину діацетату, Хлоргексидину діглюконату розчину, Хлоргексидину дигідрохлориду.

В даній роботі дослідження хлоргексидину субстанції, опираючись на фармакопейні методи, виконується та описується вперше.

Субстанція хлоргексидину має різну розчинність у органічних та неорганічних розчинниках: добре розчиняється у полярних розчинниках – воді, етанолі; у органічних розчинниках – гліцерині, пропілен гліколю.

Чистота. 98.0-101.0% (підтвердження методом ВЕРХ).

Ідентифікація проводиться за методом ІЧ-абсорбційної спектрофотометрії, хроматографічним методом. Порівняння проводиться із стандартом хлоргексидином CRS.

Споріднені сполуки досліджуються методом рідинної хроматографії (РХ), (2.2.29). Субстанцію розчиняють у суміші розчинників: трифлуороацетатна кислота *P* – ацетонітрил *P* – трифлуороацетатна кислота *P* у воді для хроматографування або трифлуороацетатна кислота *P* – трифлуороацетатна кислота *P* у воді для хроматографування *P* – трифлуороацетатна кислота *P* у ацетонітрилі *P*.

Серед регламентованих Eur. Ph. специфікованих та неспецифікованих домішок субстанції хлоргексидину 16 речовин: А, В, С, D, E, F, G, H, I, J, K, L, N, O, P, Q. Домішка P (хлоранілін) – специфікована. Домішка Q – домішка неідентифікована із невідомою структурою.

Eur.Ph. встановлюються ліміти на домішки:

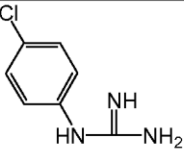
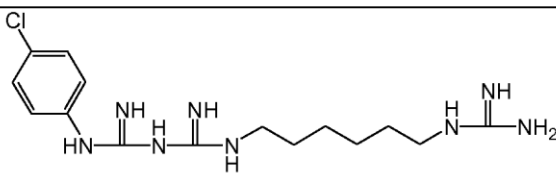
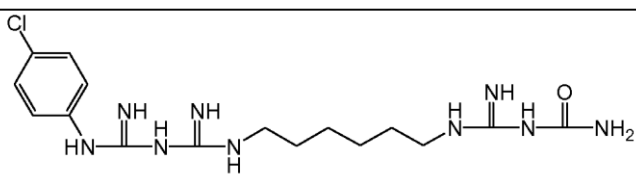
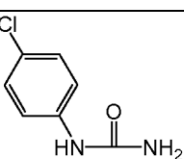
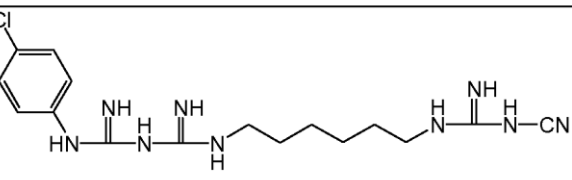
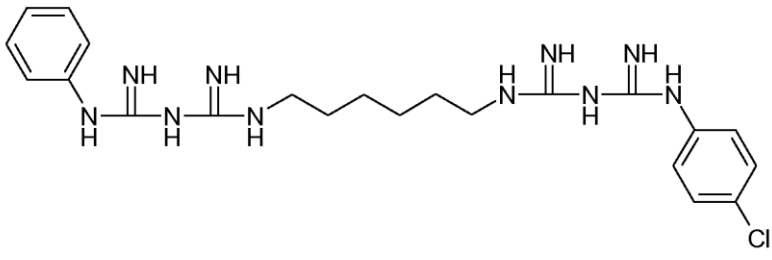
- ліміт для домішки H – 0.5%
- ліміт для домішки K – 0.4%
- ліміт для домішок I, O - 0.4%

- ліміт для домішок А, N – 0.15%

Для неспецифікованих домішок ліміт 0.10%, разом – 1.0%.

Контроль специфікованих домішок виконується методом РХ. Хімічні формули домішок у субстанції хлоргексидину показано у таблиці 3.1.

Таблиця 3.1. Хімічні формули домішок хлоргексидину.

B	 <chem>NC(=O)c1ccc(Cl)cc1</chem>
C	 <chem>NC(=O)NCCCCCNc1ccc(Cl)cc1</chem>
D	 <chem>NC(=O)NCCCCCNc1ccc(Cl)cc1</chem>
E	 <chem>NC(=O)c1ccc(Cl)cc1</chem>
F	 <chem>NC(=O)NCCCCCNc1ccc(Cl)cc1</chem>
G	 <chem>NC(=O)NCCCCCNc1ccc(Cl)cc1</chem>

Нами проведено хроматографічне дослідження за допомогою методу ВЕРХ субстанції хлоргексидину з метою розробки та опрацювання умов хроматографування та методик проведення процедур дослідження.

Матеріали та методи.

Для проведення інструментальних досліджень використовували хроматограф Agilent 1260 Infinity II з УФ детектором; колонка – INERTSIL ODS-3V, 250x4,6x5 з температурою – 25°C.

Умови хроматографування:

- час хроматографування – 60 хв;
- потік – 1,0 мл/хв
- детектування – УФ при 254 нм
- об'єм інжекції – 10 мкл
- рухома фаза А – суміш розчинників для ВЕРХ: трифлуороацетатна кислота *P* – ацетонітрил *P* – трифлуороацетатна кислота *P* у воді для хроматографування, 0,1% *P* (20 : 20 : 80, V/V/V);
- рухома фаза В – суміш розчинників для ВЕРХ: трифлуороацетатна кислота *P* – трифлуороацетатна кислота *P* у воді для хроматографування *P* – трифлуороацетатна кислота *P* у ацетонітрилі *P* (10 : 10 : 90, V/V/V).

Градiєнт- рухома фаза А, рухома фаза В (табл. 3.2).

Таблиця 3.2. Градiєнт.

Час (хвилини)	Рухома фаза А (% v/v)	Рухома фаза В (% v/v)
0-2	100	0
2-32	80	20
32-47	80	20
37-47	70	30
47-54	70	30

Методика приготування тестового розчину:

До 0,20 г субстанції додавали 1 мл HCl R, перемішували, розводили до 30 мл водою R до отримання прозорого розчину. Додавали 5 мл (103 г/л) р-ну хлороводневої кислоти R, 0,35 мл нітрію нітриту розчину R, 2 мл (50 г/л) р-ну амонію сульфамату R, 5 мл (1 г/л) р-ну нафтилетилендіаміну HCl R, 1 мл етанолу (96%) R, переносили у мірну колбу, доводили до 50 мл водою R.

Методика приготування тестового розчину:

Розводять 0,13 г субстанції у рухомій фазі А, доводили до 100,0 мл рухомою фазою А.

Методика приготування стандартного розчину (а):

Стандартний розчин хлоргексидину (а):

Точну наважку 5 мг фармакопейного стандартного зразка Державної Фармакопеї України хлоргексидину розчиняють у 1,0 мл рухомої фази А.

Методика приготування стандартного розчину (b):

Стандартний розчин хлоргексидину (b):

Розводять 1 мл стандартного розчину хлоргексидин до об'єму 100 мл рухомою фазою А.

Комп'ютерний аналіз за допомогою програми OpenLab CDS.

Для визначення сторонніх домішок методом ВЕРХ використовували реактиви:

- ацетонітрил (чистоти для ВЕРХ),
- вода (чистоти для ВЕРХ),
- трифлуороацетатна кислота (чистоти для ВЕРХ).

Отримані результати.

При дослідженні стандартних зразківДФУ В(1), В (2), розчинів досліджуваних зразків 1, 2 отримано наступні результати (табл. 3.3, 3.4).

Таблиця 3.3. Розчини стандартних речовин.

	Стандарт В (1)		Стандарт В (2)	
	Хлоргексидин			
	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>RT</i>	<i>Area</i>
	2,901	59,837	2,897	62,047
	2,917	61,500	2,914	63,333
	2,917	59,467		
Середнє	2,914	60,268	2,909	62,690
SD	0,093	1,083	0,070	0,909
RSD(≤2.0%)	0,38%	1,80%	0,30%	1,45%

Розчини стандартні:

Хлоргексидин, стандарт В (1):

- значення *Rt* знаходиться в інтервалі 2,901-2,917 хв;
- середнє значення *Rt* стандартів знаходиться в інтервалі 2,914 хв;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 59,467-61,500;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 60.268;
- SD *Rt* 0.093;
- SD *Ar* 1.083;
- RSD *Rt* (<2.0%) 0.38%;
- RSD *Ar* (<2.0%) 1.80%.
- RSD *Ar* (<2.0%) 1.45%.

Хлоргексидин, стандарт В (2):

- значення *Rt* знаходиться в інтервалі 2,897-2,914 хв;
- середнє значення *Rt* стандартів знаходиться в інтервалі 2,909 хв;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 62,047-63,333;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 62.690;
- SD *Rt* 0.070;
- SD *Ar* 0.909;

- RSD Rt (<2.0%) 0.30%;
- RSD Ar (<2.0%) 1.45%.

Таблиця 3.4. Розчини випробувального зразку.

Зразок					
Хлоргексидин	Домішка Р (пара-хлоранілін):		R	Домішка І (етилпарабон)	
	RT	RT		RT	RT
	2,818	4,401		8,6	5,090
2,919	4,300	5,260			
2,380	4,267	5,198			

Розчин зразку І:

Хлоргексидин, зразок І:

- значення Rt знаходиться в інтервалі 2,818-2,919 хв;
- середнє значення Rt стандартів знаходиться в інтервалі 2,908 хв;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 35992,141-35999,784;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 35995,000;

Домішка Р (пара-хлоранілін):

- значення Rt знаходиться в інтервалі 4,101-4,300 хв;
- середнє значення Rt стандартів знаходиться в інтервалі 4,299 хв;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 36,364-37,330;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 36,883;

Домішка І (етилпарабон):

- значення Rt знаходиться в інтервалі 5,090-5,260 хв;
- середнє значення Rt стандартів знаходиться в інтервалі 5,194 хв;

- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 63,970-64,577;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 64.259;

Таким чином, виявлена специфікована домішка Р (пара-хлоранілін) та неспецифікована *Домішка 1 (етилпарабон)*.

Хроматограми представлено на рисунках 3.1, 3.2.

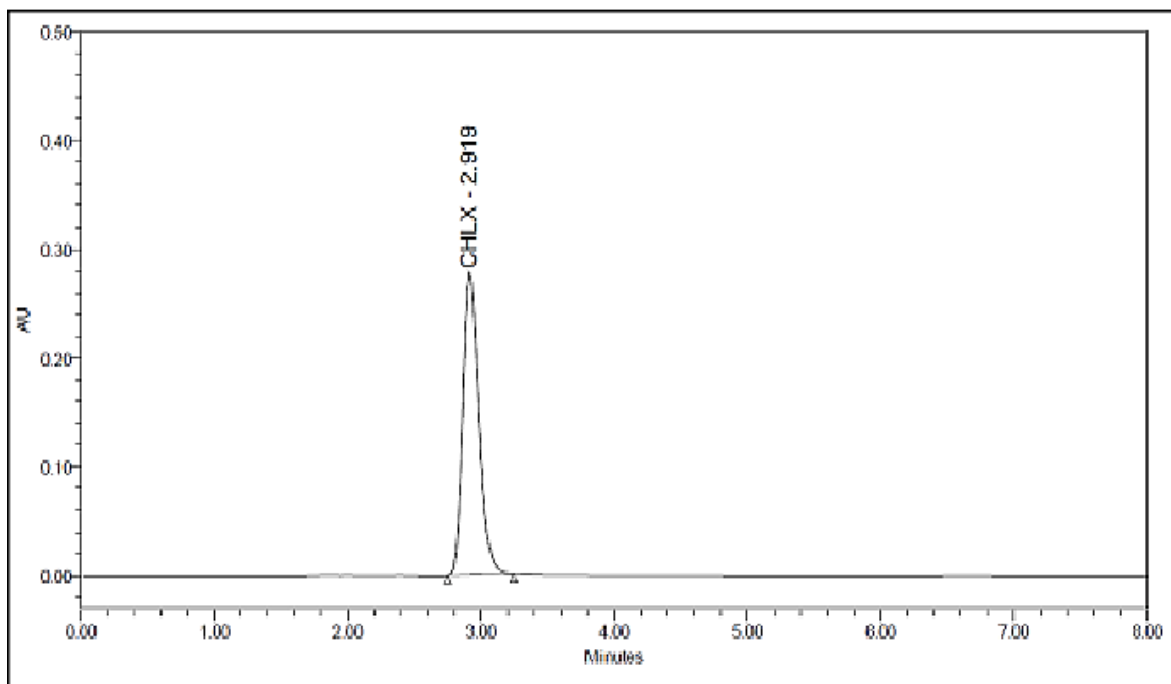


Рисунок 3.1. Хроматограма стандартного зразку: хлоргексидин ($R_t=2,919$ хв).

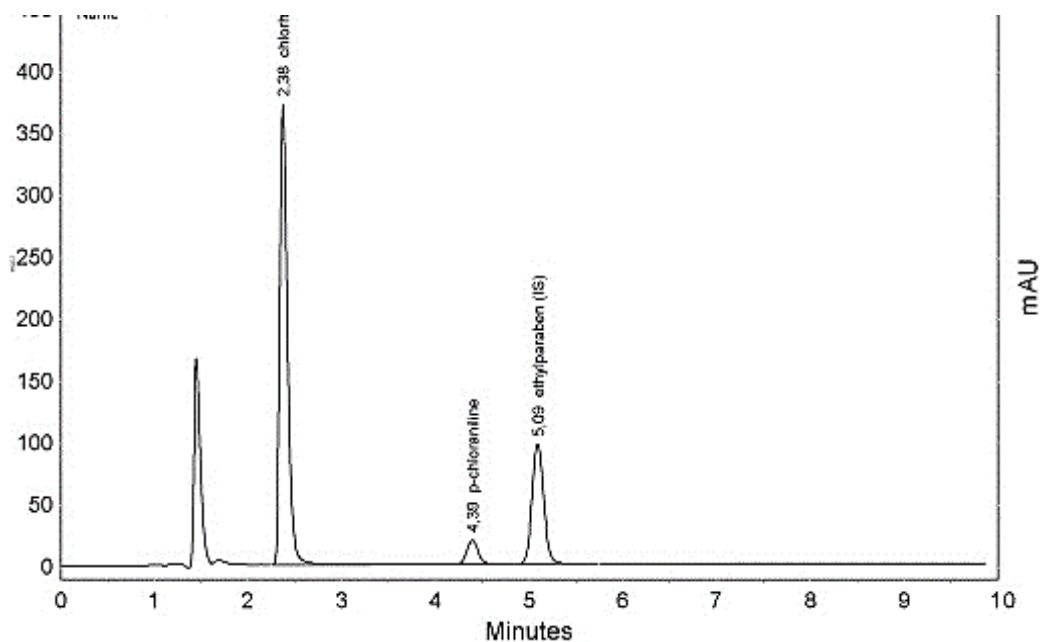


Рисунок 3.2. Хроматограма досліджуваного зразку: хлоргексидин ($R_t=2,380$ хв), специфікована домішка Р (пара-хлоранілін) ($R_t=4,300$ хв), неприпустима домішка 1 (етилпарабон) ($R_t=5,090$ хв).

З метою дослідження змін у ІЧ-спектрі хлоргексидину субстанції з неприпустимою домішкою 1 у своєму складі, методом абсорбційної спектрофотометрії в ІЧ-області (спектрометр Specord M-80) отримано ІЧ-спектр досліджуваної субстанції хлоргексидину.

ІЧ-спектри зразків записували у виді таблеток з KBr. Потім зразки поміщали в тримач зразків приладу.

ІЧ-спектр хлоргексидину характеризується основними піками поглинання функціональних груп при:

$2542, 2956,67 \text{ cm}^{-1}$ (NH, сіль вторинного аміну), $1519,80 \text{ cm}^{-1}$ (NH, вторинний ароматичний амін), $1259,43 \text{ cm}^{-1}$ (C–N, вторинний ароматичний амін), $1022,20, 1155,28 \text{ cm}^{-1}$ (CN) (рис. 3.3).

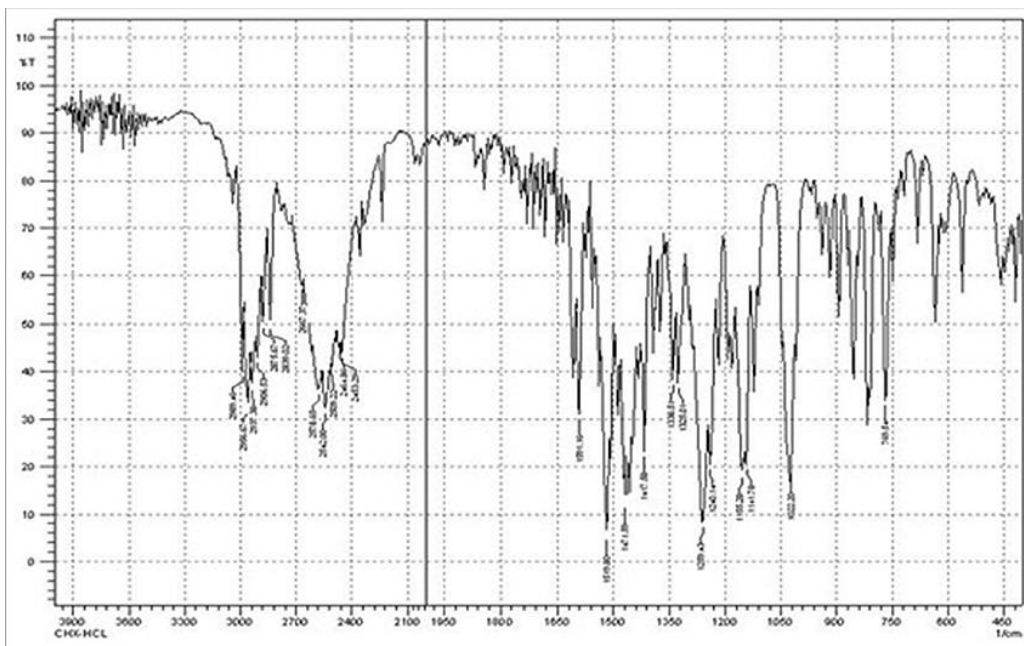


Рисунок 3.3. ІЧ-спектр досліджуваного зразку хлоргексидину.

В таблиці 3.5 представлена порівняльна характеристика сигналів функціональних груп молекули хлоргексидину (стандарт) та досліджуваного зразку хлоргексидину.

Таблиця 3.5. Порівняльна характеристика ІЧ-спектрів стандарту та зразку хлоргексидину субстанції.

ІЧ-спектр хлоргексидину (стандарт), cm^{-1} , δCN , NH , νCN , NH	Функціональна група	ІЧ-спектр хлоргексидину (зразок), cm^{-1} , δCN , NH , νCN , NH
2240-2260 Середня інтенсивність	CN	1022,20, 1155,28
1250-1180 Середня інтенсивність	CN, вторинний ароматичний амін	1259,43
1580-1625 Середня інтенсивність	NH, вторинний ароматичний амін	1519,80

3500	NH,	2542,
Середня інтенсивність	сіль вторинного аміну	2956,67

Таким чином, можна спостерігати зміщення валентних коливань функціональних груп CN, NH, що пов'язано із наявністю у субстанції неприпустимої домішки 1. Деформаційні коливання σ_{NH} дають нехарактеристичні смуги помірної інтенсивності в області $1580-1625\text{ см}^{-1}$, в той час, як у зразку деформаційні коливання σ_{NH} розташовуються в області $1519,80\text{ см}^{-1}$.

Хлоргексидин (зміни, що відбулися у хроматографічній картині):

<i>Хлоргексидин, стандарт В (1):</i>	<i>Хлоргексидин, зразок 1:</i>
значення R_t знаходиться в інтервалі 2,901-2,917 хв;	значення R_t знаходиться в інтервалі 2,818-2,919 хв;
середнє значення R_t стандартів знаходиться в інтервалі 2,914 хв;	середнє значення R_t стандартів знаходиться в інтервалі 2,908 хв;
площина піка на хроматограмі коливається в інтервалі 59,467-61,500;	площина піка на хроматограмі коливається в інтервалі 35992,141-35999,784;
середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 60.268;	середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 35995,000.
SD R_t 0.093;	
SD Ar 1.083;	
RSD R_t (<2.0%) 0.38%;	
RSD Ar (<2.0%) 1.80%.	
RSD Ar (<2.0%) 1.45%.	

ВИСНОВКИ

1. Розроблено умови хроматографічного дослідження методом ВЕРХ субстанції хлоргексидину з метою визначення супровідних речовин та домішок.
2. Розроблено методики для виконання хроматографування методом ВЕРХ, методики приготування стандартних та випробувальних розчинів: рухома фаза А – суміш розчинників для ВЕРХ: трифлуороацетатна кислота *P* – ацетонітрил *P* – трифлуороацетатна кислота *P* у воді для хроматографування, 0,1% *P* (20 : 20 : 80, V/V/V); рухома фаза В – суміш розчинників для ВЕРХ: трифлуороацетатна кислота *P* – трифлуороацетатна кислота *P* у воді для хроматографування *P* – трифлуороацетатна кислота *P* у ацетонітрилі *P* (10 : 10 : 90, V/V/V), методику спектрального дослідження методом абсорбційної спектрофотометрії в ІЧ-області субстанції хлоргексидину (спектрометр Spesord M-80), в результаті чого порівняно спектри стандартного та досліджуваного зразків хлоргексидину.
3. Проведене хроматографічне (ВЕРХ) та спектральне дослідження субстанції хлоргексидину, в результаті чого, виявлено, що хроматографічні умови та методики дослідження розроблено коректно: пік хлоргексидину розташовується з R_t у інтервалі 2,818-2,919 хв, порівняно із стандартним значенням (R_t 2,901-2,917 хв), виявлено неприпустиму домішку 1 (етилпарабон) ($R_t=5,090$ хв), в ІЧ-спектрі спостерігати зміщення валентних коливань функціональних груп CN, NH, так, деформаційні коливання σ_{NH} давали нехарактеристичні смуги помірної інтенсивності в області $1580-1625\text{ см}^{-1}$, в той час, як у зразку деформаційні коливання σ_{NH} розташовуються в області $1519,80\text{ см}^{-1}$.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. "Chlorhexidine Gluconate". *PubChem*. Retrieved 1 July 2023.
2. "Chlorhexidine Acetate". *PubChem*. Retrieved 1 July 2023.
3. Wade RG, Bourke G, Wormald JC, Totty JP, Stanley GH, Lewandowski A, et al. (November 2021). "Chlorhexidine versus povidone-iodine skin antisepsis before upper limb surgery (CIPHUR): an international multicentre prospective cohort study". *BJS Open*. **5** (6): *zrab117*. doi:10.1093/bjsopen/zrab117. PMC 8677347. PMID 34915557.
4. Wade RG, Burr NE, McCauley G, Bourke G, Efthimiou O (December 2021). "The Comparative Efficacy of Chlorhexidine Gluconate and Povidone-iodine Antiseptics for the Prevention of Infection in Clean Surgery: A Systematic Review and Network Meta-analysis". *Annals of Surgery*. **274** (6): *e481e488*. doi:10.1097/SLA.0000000000004076. PMID 32773627. S2CID 225289226.
5. "Chlorhexidine (Oral Route) Precautions - Mayo Clinic". *www.mayoclinic.org*. Retrieved 27 June 2023.
6. Vanessa Morais Muniz, José Venâncio Chaves Júnior, Cícero Flávio Soares Aragão, Fábio Santos de Souza, Fábio Correia Sampaio. A HPLC method for simultaneous quantification of chlorhexidine and thymol using Box-Behnken design for robustness of the method assessment. *J. of Liq. Chrom. & Relat. Techol.* V.46, 2023, 6-10:168-179.
7. Soares, A. K.; Bonvini, B.; Fukushigue, C. Y. Evaluation of the Prophylactic Antimicrobial Potential of Mouthwashes Containing in Their Formulation Chlorhexidine and Essential Oils. *Salusvita* 2019, **38**, 87–96.
8. Ribas, M. A.; de, L.; Santos, B. M.; Botelho, M. P. J. Evaluation of the Bactericide Property of 0.12% and 0.2% Chlorexidine Digluconate in Solution. *Braz. J. Dev.* 2020, **6**, 4621–4634. DOI: 10.34117/bjdv6n1-331.

9. Picoli, M. E. F. da S.; Botelho, M. C. P.; Ananias, F.; Secco, A. S. Evaluation of Chlorhexidine Efficiency in Reduction of Microbial Load in Water Lines of Dental Equipment. *Braz. J. Dev.* 2022, 8, 23074–23095. DOI: 10.34117/bjdv8n4-022.
10. Lee, S.; Laghapour Lighvan, N.; McCredie, V.; Pechlivanoglou, P.; Krahn, M.; Quiñonez, C.; Azarpazhooh, A. Chlorhexidine-Related Mortality Rate in Critically Ill Subjects in Intensive Care Units: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Respir. Care* 2019, 64, 337–349. DOI: 10.4187/respcare.06434.
11. Di Paolo, G. B.; Pereira, C. S.; Souza Júnior, A. R.; Machado, F. C.; Carvalho, T. d A. Impacts of Intensive Care Patients' Oral Hygiene on Nosocomial and Ventilator-Associated Pneumonia: Integrative Literature Review. *Res. Soc. Dev.* 2021, 10, e376101321586. DOI: 10.33448/rsd-v10i13.21586.
12. Villa, O.; Ramberg, P.; Fukui, H.; Emilson, C. G.; Papanikolaou, G.; Heijl, L.; Birkhed, D. Interaction between Chlorhexidine and Fluoride in a Mouthrinse Solution—A 4-Day and 6-Week Randomized Clinical Pilot Study. *Clin. Oral Investig.* 2018, 22, 1439–1448. DOI: 10.1007/s00784-017-2219-7.
13. Sokolik, C. G.; Ben-Shabat-Binyamini, R.; Gedanken, A.; Lellouche, J. P. Proteinaceous Microspheres as a Delivery System for Carvacrol and Thymol in Antibacterial Applications. *Ultrason. Sonochem.* 2018, 41, 288–296. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2017.09.032.
14. Agustinisari, I.; Mulia, K.; Nasikin, M. The Effect of Eugenol and Chitosan Concentration on the Encapsulation of Eugenol Using Whey Protein-Maltodextrin Conjugates. *Appl. Sci.* 2020, 10, 3205. DOI: 10.3390/app10093205.
15. Vrachas, A.; Gkountanas, K.; Boutsikaris, H.; Dotsikas, Y. Development and Validation of a Novel RP-HPLC Method for the Determination of Cetrimide and Chlorhexidine Gluconate in Antiseptic Solution. *Analytica* 2022, 3, 79–91. DOI: 10.3390/analytica3010006. DOI: 10.3390/analytica3010006.

16. Chandran, P.; Pillai, S. C.; Govindasamy, S.; Arumugasamy, S. Detection of the Release of Chlorhexidine from Cured Denture Resins Discs: Subsequently Deducing the Ability of Denture Resin as a Drug Carrier. *JDMT* 2022, 11, 127–137. DOI: 10.22038/JDMT.2022.59581.1465.
17. Soliman, R. M.; Salam, R. A. A.; Eid, B. G.; Khayyat, A.; Neamatallah, T.; Mesbah, M. K.; Hadad, G. M. Stability Study of Thymoquinone, Carvacrol and Thymol Using HPLC-UV and LC-ESI-MS. *Acta Pharm.* 2020, 70, 325–342. DOI: 10.2478/acph-2020-0028.
18. Patole, V. C.; Chaudhari, S. P. Method Development and Validation for the Simultaneous Estimation of Thymol and Eugenol by Using RP-HPLC in Pure and in Emulgel Formulation. *Indian Drugs* 2021, 58, 59–65. DOI: 10.53879/id.58.07.11895.
19. Chaker, H.; Ameer, N.; Saidi-Bendahou, K.; Djennas, M.; Fourmentin, S. Modeling and Box-Behnken Design Optimization of Photocatalytic Parameters for Efficient Removal of Dye by Lanthanum-Doped Mesoporous TiO₂. *J. Environ. Chem. Eng.* 2021, 9, 104584. DOI: 10.1016/j.jece.2020.104584.
20. International Conference on Harmonization (ICH), Guidelines, Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2005.
21. Alam, M. I.; Siddiqui, A.; Ur, R.; Khanam, N.; Kamaruddin, S. J. A Multivariate Quantification of Box-Behnken Design Assisted Method Development and Validation of Dextromethorphan Hydrobromide and Desloratadine Simultaneously by Reverse-Phase HPLC in in-House Syrup Formulation. *J. Sep. Sci.* 2020, 43, 3597–3606. DOI: 10.1002/jssc.202000510.
22. Kumar, G.; Mullick, P.; Nandakumar, K.; Mutalik, S.; Rao, C. M. Box–Behnken Design-Based Development and Validation of a Reverse-Phase HPLC Analytical Method for the Estimation of Paclitaxel in Cationic Liposomes. *Chromatographia* 2022, 85, 629–642. DOI: 10.1007/s10337-022-04172-w.

23. Hu, Q.; Tang, H.; Wang, Y. Challenges in Analysis of Hydrophilic Metabolites Using Chromatography Coupled with Mass Spectrometry. *J. Anal. Test.* 2020, 4, 140–162. DOI: 10.1007/s41664-020-00126-z.
24. Gomes, K. A.; Santos, A. L. R.; Faria, A. M. Evaluation of Mobile Phase Additives and Temperature on Column Lifetime for High-Performance Liquid Chromatography. *Quim. Nova* 2020, 43, 300–306. DOI: 10.21577/0100-4042.20170482.
25. Ferguson, P. D.; Shaw, R.; McCudden, A.; Elliot, C.; Welham, M.; McAlpine, V.; Castel, C.; Armstrong, T.; Yang, Q.; Qiu, W. Improving Robustness of Pharmaceutical Dosage Form Sample Preparation Using Experimental Design and Process Understanding Tools. *Chromatographia* 2020, 83, 1525–1538. DOI: 10.1007/s10337-020-03969-x.
26. Echeverria, M. S.; Xavier, S. R.; Sanches Filho, P. J.; Barbin, E. L.; Camacho, G. B.; Waldemarin, R. F. A. Detection of Para-Chloroaniline after Disinfection of Acrylic Resin with In-Vitro Chlorhexidine Gluconate. *South Braz. Dent. J.* 2020, 18, 52–59. DOI: 10.21726/rsbo.v18i1.1453.
27. Abraham, C.; Devi, L. G. One-Pot Facile Sol-Gel Synthesis of W, N, C and S Doped TiO₂ and Its Application in the Photocatalytic Degradation of Thymol under the Solar Light Irradiation: Reaction Kinetics and Degradation Mechanism. *J. Phys. Chem. Solids* 2020, 141, 109350. DOI: 10.1016/j.jpcs.2020.109350.
28. Bhide, A. R.; Surve, D. H.; Guha, S.; Jindal, A. B. A Sensitive RP-HPLC Method for Estimation of Artemether from Polymeric Nanoparticles after Pre-Column Acid Treatment Using UV-Visible Detector. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2020, 43, 624–632. DOI: 10.1080/10826076.2020.1777564.
29. Gouveia, F.; Bicker, J.; Santos, J.; Rocha, M.; Alves, G.; Falcão, A.; Fortuna, A. Development, Validation and Application of a New HPLC-DAD Method for Simultaneous Quantification of Apixaban, Dabigatran, Edoxaban and

- Rivaroxaban in Human Plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2020, 181, 113109. DOI: 10.1016/j.jpba.2020.113109.
30. Sanchez, J. M. Linear Calibrations in Chromatography: The Incorrect Use of Ordinary Least Squares for Determinations at Low Levels, and the Need to Redefine the Limit of Quantification with This Regression Model. *J. Sep. Sci.* 2020, 43, 2708–2717. DOI: 10.1002/jssc.202000094.
31. Mutalik, S. P.; Mullick, P.; Pandey, A.; Kulkarni, S. S.; Mutalik, S. Box–Behnken Design Aided Optimization and Validation of Developed Reverse Phase HPLC Analytical Method for Simultaneous Quantification of Dolutegravir Sodium and Lamivudine Co-Loaded in Nano-Liposomes. *J. Sep. Sci.* 2021, 44, 2917–2931. DOI: 10.1002/jssc.202100152.
32. Elkady, E. F.; Fouad, M. A.; Mozayad, A. N. Application of Box-Behnken Experimental Design and Response Surface Methodology for Selecting the Optimum RP-HPLC Conditions for the Simultaneous Determination of Methocarbamol, Indomethacin and Betamethasone in Their Pharmaceutical Dosage Form. *BMC Chem.* 2022, 16, 114. DOI: 10.1186/s13065-022-00908.
33. Державна Фармакопея України. 2-ге вид., у 3-х т. Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». Х.: Укр. наук. фармакоп. центр якості лік. засобів. 2014. Т. 2. С. 152-154.
34. European Pharmacopoeia. Council of Europe, Strasbourg, 10-th ed., 2019. V.1: 2174-2178.

SUMMARY

Avramchuk Oleksandra
MODIFICATION OF THE HPLC TECHNIQUE FOR STUDING THE PURITY OF THE CHLORHEXIDINE SUBSTANCE AS A REPRESENTATIVE OF A NUMBER OF BIS-(CHLOROPHENYL)-(IMIDODICARBAMIDE-DIAMIDE)-S

The department of medicinal chemistry and toxicology

Scientific supervisor: PhD (Biol), as. Meleshko R.A.

Keywords: chlorhexidine, 4-para-chloroaniline, HPLC, admixture.

Introduction. Chlorhexidine is a dangerous drug, therefore, quality control of this drug is important to protect the health and life of patients. Chlorhexidine is a multifunctional organic compound. During the synthesis of chlorhexidine, by-products, unacceptable impurities can be formed - accompanying substances or related substances, which will affect the quality of the substance. Therefore, it is important to introduce modern instrumental methods into the pharmaceutical analysis of the chlorhexidine substance, in addition to the methods recommended by Pharmacopoeias, to improve the quality of the analysis.

Materials and methods. Research object are chlorhexidine, standard samples. Research subject: implementation of HPLC method to pharmaceutical analysis of chlorhexidine. Methods: HPLC (Agilent 1260 Infinity II chromatograph with UV detector), column INERTSIL ODS-3V, 250x4,6x5; spectral method –IR-absorbtion spectrophotometry (Specord M-80); computer analysis using the OpenLab CDS program.

Results. Techniques for performing HPLC chromatography, methods for preparing standard and test solutions were developed: mobile phase A - a mixture of solvents for HPLC, a technique for spectral research by absorption spectrophotometry in the IR region of the chlorhexidine substance (Specord M-80 spectrometer), as a result of which compared spectra of standard and studied samples of chlorhexidine.

Conclusions. A chromatographic (HPLC) and spectral study of the chlorhexidine substance was carried out, as a result of which it was found that the chromatographic conditions and research methods were developed correctly: the peak of chlorhexidine is located with R_t in the interval 2.818-2.919 min, compared to the standard value (R_t 2.901-2.917 min), an inadmissible impurity 1 (ethylparabon) was detected ($R_t=5.090$ min), in the IR spectrum, a shift in the valence vibrations of functional groups CN, NH, was observed, yes, the deformation vibrations of σ_{NH} gave uncharacteristic bands of moderate intensity in the region of 1580-1625 cm^{-1} , while in the sample the σ_{NH} deformation vibrations are located in the region of 1519.80 cm^{-1} .

ДОДАТОК 1

Публікації, участь у роботі конференцій, симпозіумів.

1. Вельчинська О., Аврамчук О.В., Белей В., Кузко А. Переваги методу високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) в аналізі фармацевтичних композицій. Міжнародна науково-практична конференція «Освіта і наука в період глобальних криз та конфліктів у XXI столітті» (Секція «Природничі науки»), НАН ВО України, м. Київ, 08-09 грудня 2023 року.
2. FIP Symposium, Digital Event «Particle-size Measurement and its impact on Drug Bioavailability», 06.11.2023, The Netherland (Online educational activity). Certificate.



3. FIP Symposium, Digital Event «Regulators Advisory Group: Launch of the Regulatory Self-Assessment Tool for Substandard or Falsified Medicinal Products», 07.11.2023, The Netherland (Online educational activity). Certificate.

