

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
Національний медичний університет імені О. О. Богомольця
Фармацевтичний факультет
Спеціальність – 226 «Фармація, промислова фармація»
Кафедра аналітичної, фізичної та колоїдної хімії

КВАЛІФІКАЦІЙНА ВИПУСКНА РОБОТА
КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ БЕНЗАЛКОНІЙ ХЛОРИДУ У ВУШНИХ
КРАПЛЯХ МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ
ХРОМОТОГРАФІЇ

Виконала: студентка 6-го курсу, групи
881Б фармацевтичного факультету

Гончар Яна Олегівна

Керівник:

доцент кафедри аналітичної, фізичної
та колоїдної хімії, к.х.н., доцент

Тимощук Ольга Борисівна

Рецензент:

доцент кафедри ліків та лікарської
токсикології, к.х.н., доцент

Глушаченко Ольга Олександрівна

ЗМІСТ

| | <i>ст.</i> |
|--|------------|
| ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ | 4 |
| ОСНОВНА ЧАСТИНА | 5 |
| ВСТУП | 5 |
| Розділ 1. Властивості бензалконій хлориду та його застосування | 8 |
| 1.1. Фізико-хімічні властивості | 9 |
| 1.2. Методи отримання | 10 |
| 1.3. Сфери застосування | 10 |
| 1.4. Фармакологічна дія | 11 |
| Розділ 2. Матеріали та методи | 13 |
| 2.1. Об'єкт дослідження | 13 |
| 2.2. Посуд та обладнання | 15 |
| 2.3. Реактиви | 15 |
| 2.4. Методика та умови методу високоефективної рідинної хроматографії | 15 |
| 2.4.1. <i>Вимоги до стандартних розчинів</i> | 20 |
| 2.4.2. <i>Вимоги до робочих розчинів</i> | 20 |
| 2.4.3. <i>Вимоги до вимірювання зразка</i> | 20 |
| 2.4.4. <i>Вимоги до розрахунку</i> | 21 |
| Розділ 3. Результати та їх обговорення | 22 |
| 3.1. Умови хроматографування | 22 |
| 3.2. Побудова калібрувального графіка | 23 |
| 3.3. Результати визначення вмісту бензалконій хлориду у досліджуваних лікарських засобах | 25 |
| 3.4. Валідація методики | 27 |

| | |
|---|----|
| <i>3.4.1. Перевірка специфічності методики</i> | 27 |
| <i>3.4.2. Перевірка лінійності методики</i> | 27 |
| <i>3.4.3. Перевірка робастності методики</i> | 28 |
| <i>3.4.4. Перевірка правильності методики</i> | 28 |
| 3.5. Порівняльний аналіз методик кількісного визначення | 29 |
| ВИСНОВКИ | 30 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ | 31 |
| ДОДАТКИ | 35 |
| SUMMARY | 46 |

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

BP – British Pharmacopoeia

JP – Japanese Pharmacopoeia

Ph Eur – European Pharmacopoeia

USP – United States Pharmacopoeia

CAS №65–85–0 – Реєстраційний номер відповідно до CAS REGISTRY

(режим доступу до ресурсу: https://commonchemistry.cas.org/detail?cas_rn=65-85-0)

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

ДФУ – Державна фармакопея України

ЛЗ – лікарський засіб

М – молярність

мкг – мікрограм

мг – міліграм

мл – мілілітр

нм – нанометр

ОСНОВНА ЧАСТИНА

ВСТУП

Лікарські засоби, які у своєму складі містять бензалконій хлорид широко поширені в медицині. Бензалконій хлорид – це амонієва сполука, яка використовується у медицині та ветеринарії переважно як консервант або активний інгредієнт у багатьох офтальмологічних, назальних, пероральних і місцевих препаратах, а також у різноманітних розчинах, мазях і кремах. Має широкий спектр застосування у фармацевтичних засобах як антимікробний консервант, подібний до інших катіонних поверхнево-активних речовин. Розчини, що містять бензалконій хлорид активні проти широкого спектру бактерій, дріжджів і грибків. Активністю переважно відзначається проти грампозитивних, ніж грамнегативних бактерій і мінімально – проти бактеріальних ендоспор та кислотостійких бактерій [1-4]. Також ефективний для дезактивації оболонкових вірусів, таких як корона, грип, герпес і гепатит, у низьких концентраціях нижче 1%. Різноманітні публікації підтримують використання бензалконій хлориду як ефективного противірусного засобу, наприклад проти грипу типу А, SARS-CoV, МЗ1ухо- та споріднених вірусів, кору, простого герпесу, аденовірусу типу 5, чуми собак, пневмоніту кішок, збудників менінгопневмоніту, ВІЛ-1 та інших. Він може ефективно затримувати розмноження водоростей і відтворення мулу; має диспергуючі та проникаючі властивості, може проникати та видаляти мул та водорості [2].

Зазвичай бензалконій хлорид не подразнює та не викликає сенсibilізації і добре переноситься у розчинах, які зазвичай застосовуються на шкірі та слизових оболонках. Проте асоціюється з побічними ефектами при використанні в деяких фармацевтичних препаратах рецептури [5].

Високоєфективна рідинна хроматографія – це аналітичний метод, який застосовується для розділення компонентів у розчині, а також для ідентифікації та кількісного визначення кожного з компонентів. Її

застосування дозволяє здійснювати найточніші аналітичні дослідження (санітарно-гігієнічні, медичні, фармацевтичні тощо) [6-9].

Принцип рідинної хроматографії полягає у розділенні компонентів суміші у відповідності з відмінностями в їх рівноважному розподілі між двома фазами, які не змішуються, одна з яких нерухома, а інша – рухома. Відмінною особливістю ВЕРХ є використання високого тиску (до 400 бар) та дрібнозернистих сорбентів (зазвичай 3-5 мкм, переважно до 1,8 мкм). Це дозволяє розділяти складні суміші речовин швидко та повно (середній час аналізу від 3 до 30 хв.) [10].

Актуальність теми. Пошук нових перспективних методик кількісного визначення бензалконій хлориду.

Мета і завдання досліджень. Метою досліджень було розробити методику кількісного визначення бензалконій хлориду у вушних краплях методом високоефективної рідинної хроматографії.

Для досягнення поставленої мети були передбачені наступні завдання:

- аналіз фармакопейних та аналітичних методик ідентифікації та кількісного визначення бензалконій хлориду;
- розробити методику кількісного визначення бензалконій хлориду у вушних краплях методом високоефективної рідинної хроматографії;
- провести валідацію методики.

Методи дослідження. Для досягнення поставленої мети досліджень були використані емпіричні (спостереження, порівняння, вимірювання, експеримент), комплексні (абстрагування, аналіз і синтез) і теоретичні методи.

Новизна та значення одержаних результатів. Оцінка та підтвердження ефективності застосування методу високоефективної рідинної хроматографії є пошуком альтернативного методу кількісного визначення бензалконій хлориду у вушних краплях.

Апробація результатів. Результати роботи були апробовані на VI міжнародній науково-практичній конференції «KYIVLVIVPHARMA-2023.

Pharmaceutical technology and pharmacology in ensuring active longevity»
(Додаток 5).

Публікації. Публікації відсутні.

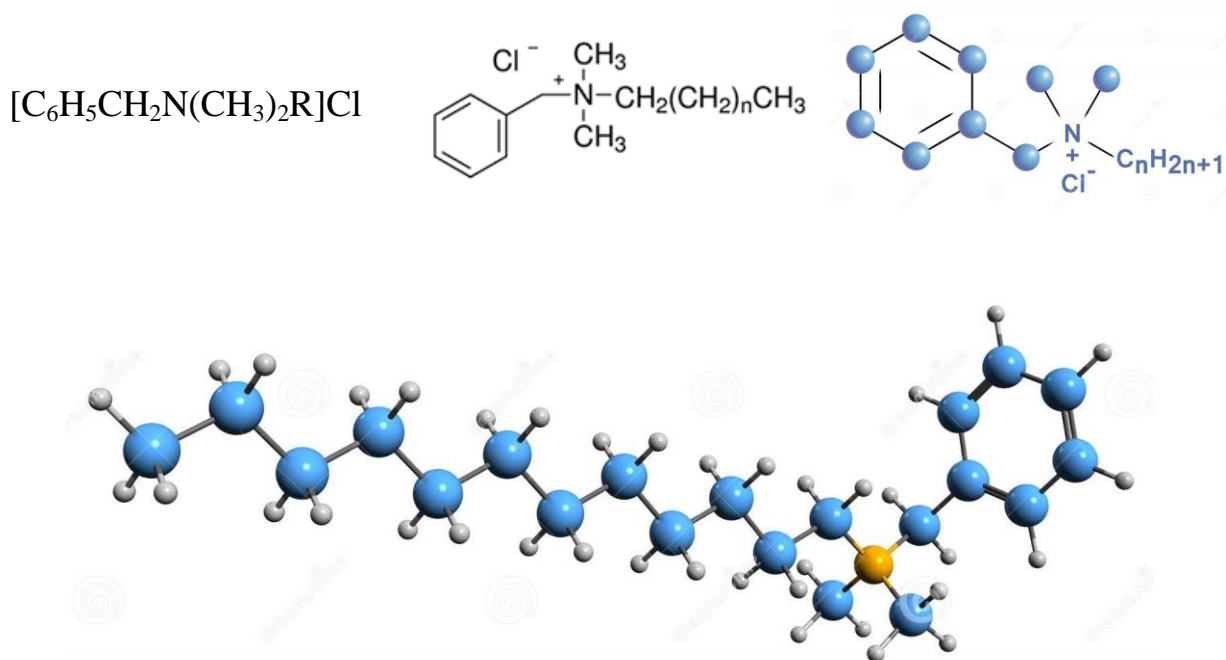
Структура роботи. Робота написана згідно із затвердженим Вченою радою Національного медичного університету імені О.О. Богомольця Положенням «Про порядок підготовки та захисту випускної кваліфікаційної роботи за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація» у Національному медичному університеті імені О.О. Богомольця» та складається з наступних структурних елементів:

- загальна кількість сторінок – 47 ст.;
- основна частина складається зі вступу, 3-х розділів та висновків;
- кількість додатків – 5 додатків;
- кількість джерел використаної літератури – 34 посилань.

Розділ 1. Властивості бензалконій хлориду та його застосування

Бензалконій хлорид (ДФУ, Benzalkonium chloride (Ph Eur, BP, USP, JP), CAS №8001-54-5, ВЗК, ВКС, ВАК, ВАС), також відомий як алкілдіметилбензиламоній хлорид (АДВАС) і під торговою назвою Zephiran [11], є типом катіонної поверхнево-активної речовини. Це органічна сіль, класифікована як сполука четвертинного амонію. АДВАС має три основні категорії використання: як біоцид, катіонна поверхнево-активна речовина та агент фазового перенесення [12]. Є сумішшю алкілбензилдиметиламоній хлоридів, у яких алкільна група має різну довжину алкільного ланцюга з парними номерами (переважно C₁₂, C₁₄ і C₁₆).

Бензалконій хлорид



Вперше бензалконій хлориди були описані у 1935 році Герхардом Домагком, вони з'явилися на ринку як хлориди зефірану, і продавалися як багатообіцяючі та кращі дезінфікуючі та антисептичні засоби [13]. У 1947 році перший продукт, що містить ВАС, був зареєстрований в Агентстві з охорони

навколишнього середовища (ЕРА) у Сполучених Штатах [14]. З тих пір вони використовуються в різноманітних продуктах, як за рецептом, так і без рецепта.

1.1. Фізико-хімічні властивості

За стандартних умов бензалконій хлорид – білий (залежно від чистоти – коливається від безбарвного до блідо-жовтого, з деякою жовтизною, аморфний порошок [2-6]. Молярна маса – 340 г/моль; густина – 0,98 г/см³; температура кипіння – >100°C (760 мм рт. ст.), а зберігання – не вище 30°C [2-6, 15-17].

За своєю структурою належить до класу четвертинних амонієвих сполук (це органічні солі, які мають позитивний заряд на атомі азоту), а тому набув широкого застосування як поверхнево-активна речовина, дезінфікуючий та антисептичний засіб [2-6, 15-17].

Дуже добре розчинний у воді (у воді розчин готовий після збовтування), спирті, ацетоні; незначно розчинний у бензолі; майже нерозчинний в ефірі. Водні розчини зазвичай нейтральні або слаболужні. Розчини піняться після струшування. Концентровані розчини мають гіркий смак і слабкий мигдальний запах [2-6].

Стандартні концентрати виготовляються у вигляді 50% і 80% мас./мас. розчинів; 50% розчин є чисто водним, тоді як більш концентровані розчини вимагають додавання модифікаторів реології (спирти, поліетиленгліколи тощо), щоб запобігти підвищенню в'язкості або утворенню гелю в умовах низьких температур [2-6, 16].

Стабільна речовина. Несумісна з сильними окисниками, вологою. Гігроскопічна та мильна на дотик [2-6, 15, 16].

Для ідентифікації застосовують ультрафіолетову та видиму абсорбційну спектроскопію, а також хроматографію [17].

1.2. Методи отримання

Бензалконій хлорид утворюється реакцією розчину накліл-N-метилбензаміну з метилхлоридом в органічному розчиннику, придатному для осадження четвертинної сполуки під час її утворення [2-4].

У промислових умовах його виробництво ґрунтується на контрольованій реакції між бензилхлоридом і диметиламіном з подальшим додаванням натрій хлориду до утворення хлориду (хлоридної солі) [2, 3].

1.3. Сфери застосування

Бензалконій хлорид – це універсальна хімічна речовина, яка набула широкого застосування у різних галузях промисловості насамперед завдяки її дезінфікуючої, антисептичної та консервуючої ефективності.

Для побутового застосування бензалконій хлорид використовують при виробництві пом'якшувачів тканин, засобів особистої гігієни та косметичних засоби, такі як шампуні, кондиціонери та лосьйони для тіла [18], а також офтальмологічних розчинів та назальних ліків [19]. Також широко використовується в дезодорантах, мийних засобах, дезінфікуючих і бактерицидних засобах для застосування в харчових заводах, пральнях і операційних. Бензалконій хлорид додатково використовується як консервант у косметиці. Крім того, є одними з найпоширеніших активних інгредієнтів дезінфікуючих засобів, які використовуються в житлових, промислових, сільськогосподарських і клінічних умовах [18, 20].

У сільському господарстві застосовується як біоцид, альгіцид та фунгіцид (для боротьби із пліснявою, водоростями, збудниками хвороб бджіл, риб і молюсків у ставках, каналах та інших водоймах) [15].

У фармацевтиці використовується як ефективний бактерицидний та фунгіцидний агент. Крім того, його часто використовують у поєднанні з іншими консервантами або допоміжними речовинами. В офтальмологічних препаратах – у концентрації 0,01–0,02% мас./об.; у назальних і вушних – 0,002–0,02% мас./об.; у парентеральних продуктах – 0,01% мас./об. [15, 21, 22].

Як антисептик шкіри та слизових оболонок застосовується у концентраціях від 1:750 до 1:20 000. Також існує практика застосування в рецептурі антисептичних засобів, яка виникла під час пандемії COVID-19, коли періодично виникала нестача засобів для чищення рук на основі етанолу або ізопропанолу. Експериментально було доведено, що бензалконій хлорид має стійку антимікробну дію протягом чотирьох годин після контакту із вірусом SARS-CoV-2, тоді як дезінфікуючий засіб на основі етанолу демонстрував захист шкіри лише протягом 10 хвилин після нанесення [15].

1.4. Фармакологічна дія

Відомі суперечливі дані про вплив бензалконій хлориду на здоров'я людини [14, 15, 23].

Так, з одного боку, бензалконій хлорид не було визнано канцерогенним, мутагенним або генотоксичним. Проте, у звіті 2006 року ЕРА визнало його токсичність для водного середовища та його мешканців, таких як риба, устриці, креветки та безхребетні [14].

З іншого боку, його характеризують радше подразником, ніж сенсibilізатором, який може викликати алергічний контактний дерматит від кремів, миючих засобів/антисептиків, офтальмологічних препаратів тощо [15].

Виявлена токсична дія після одноразового введення бензалконій хлориду. Так, у людей пероральна доза 100-400 мг/кг або парентеральна доза 5-15 мг/кг вважається смертельною [14].

Існує велика кількість літератури, що вивчає переносимість бензалконій хлориду в офтальмології. Більшість досліджень *in vitro* та *in vivo* показують, що бензалконій хлорид може викликають пошкодження очей. Середній вміст бензалконій хлориду, який використовується в лікарських засобах для очей, становить 0,01-1 мг/мл. У таких дозах він може викликати точкову кератопатію та/або токсичну виразку. Крім того, бензалконій хлорид може викликати подразнення очей і м'яко змінює колір контактних лінз [14].

Дослідження *in vitro* на первинних культурах епітеліальних клітин носа людини свідчать про те, що бензалконій хлорид (0,001–0,05%) може викликати стаз циліарного скорочення. Середній вміст бензалконій хлориду, що використовується в лікарських засобах для назального застосування, становить 0,02-0,33 мг/мл. Доклінічні дані показують, що речовина може викликати гістопатологічні зміни слизової оболонки носа [14, 24].

Середній вміст бензалконій хлориду, який використовується у вушних лікарських засобах, становить 0,02-0,2 мг/мл. Ототоксичність може виникати при нанесенні бензалконій хлориду на вухо [25].

У лікарських засобах для інгаляцій вміст бензалконій хлориду становить близько 2,21 мкг/доза та в розчинах, суспензіях або емульсіях для небулайзерів у концентраціях 0,1-0,2 мг/мл. Встановлено, що у небулізованих розчинах протиастматичних препаратів він може викликати дозозалежну бронхоконстрикцію, особливо у пацієнтів з астмою [26],

Багато масових інгаляторів і назальних спреїв містять бензалконій хлорид як консервант, незважаючи на вагомі докази того, що він може негативно впливати на рух війок, мукоциліарний кліренс, гістологію слизової оболонки носа, функцію нейтрофілів людини та реакцію лейкоцитів на місцеве запалення, викликати астму, подразнення очей тощо [15, 27]. Хоча деякі дослідження не виявили кореляції між використанням бензалконій хлориду в концентраціях 0,1% або нижче в назальних спреях і медикаментозним ринітом [28], інші рекомендували уникати використання бензалконій хлориду в назальних спреях [29. 30].

В цілому, бензалконій хлорид не підходить для використання в очних краплях, що містять місцеві анестетики. Несумісний з милом та іншими аніонними поверхнево активними речовинами, цитратами, йодидами, нітратами, перманганатами, саліцилатами, солями срібла, оксидом і сульфатом цинку [31]. Помічено, що бензалконій хлорид посилює місцеве проникнення лоразепаму [15]. Тому, включення бензалконій хлориду до складу лікарських засобів є важливою інформацією для пацієнтів,

Розділ 2. Матеріали та методи

Мета досліджень полягала у розробці альтернативної методики кількісного визначення бензалконій хлориду у вушних краплях методом високоефективної рідинної хроматографії.

2.1. Об'єкт дослідження

Об'єктом дослідження слугували лікарські засоби, позначені як «ЛЗ №1», «ЛЗ №2» та «ЛЗ №3», які мають державну реєстрацію [32] і у своєму складі містять бензалконій хлорид.

Усі засоби мають подібну лікарську форму – краплі вушні, а також не потребують рецепту для продажу.

ЛЗ №1 – це протимікробний препарат, який діє на органи чуття. Завдяки діючим речовинам характеризується антибактеріальними та анестезуючими властивості, сприяє зменшенню ознак запалення, болю та свербіжжю, локалізує гнійні виділення слизових, запобігає розвитку потенційних ускладнень запалення (мікозні суперінфекції, ранева інфекція тощо). Діючі речовини лікарського засобу в активних дозах не абсорбуються у системний кровотік. Основні фізико-хімічні властивості – прозора, без запаху, дещо в'язка рідина.

Протипоказаннями його застосування є підвищена чутливість до будь-яких інгредієнтів лікарського засобу і до інших сполук зі спорідненою хімічною структурою; перфорація барабанної перетинки (є ризик розвитку ототоксичності); гіперчутливість до амідних місцевоанестезуючих лікарських засобів. Щодо цього лікарського засобу немає відомих досліджень взаємодії з діючими речовинами, присутніми в лікарському засобі. Тривале застосування, може стати причиною сенсibiliзації, розвитку суперінфекції резистентними до препарату мікроорганізмами, включаючи гриби. Може виникнути перехресна алергія і перехресна резистентність з іншими похідними аміноглікозидів.

ЛЗ №2 – це протимікробний засіб, який використовується в офтальмології та отології. Має високу активність *in vitro* відносно більшості грамнегативних мікроорганізмів, включаючи *Pseudomonas aeruginosa*, а також ефективний відносно аеробних грампозитивних мікроорганізмів, таких як стафілококи і стрептококи. Основні фізико-хімічні властивості – прозорий розчин від безбарвного до зеленувато-жовтого кольору.

Протипоказанням його застосування є підвищена чутливість до будь-яких інгредієнтів лікарського засобу. Досліджень взаємодії з іншими лікарськими засобами не проводили. У пацієнтів, які проходили лікування хінолонами, спостерігалися серйозні та інколи летальні (анафілактичні) реакції підвищеної чутливості, часом — після застосування першої дози. Деякі реакції супроводжувалися серцево-судинною недостатністю, втратою свідомості, шумом у вухах, набряком глотки або обличчя, диспноє, кропив'янкою та свербіжем. Лише окремі пацієнти мали реакції гіперчутливості в анамнезі. Як і при застосуванні всіх антибактеріальних засобів, тривале застосування може призвести до надмірного росту нечутливих до антибіотиків бактеріальних штамів або грибів. Може спричиняти подразнення шкіри.

ЛЗ №3 – це протимікробний засіб, який використовується в офтальмології та отології. Бактерицидна дія діючої речовини лікарського засобу, що, головним чином, впливає на синтез ДНК бактерій, виражається шляхом пригнічення ДНК-гірази. Має високу активність *in vitro* відносно більшості грамнегативних мікроорганізмів, включаючи *Pseudomonas aeruginosa*. Він також ефективний щодо аеробних грампозитивних мікроорганізмів, таких як стафілококи і стрептококи. Основні фізико-хімічні властивості – майже безбарвна світло-жовта або світло-зелена прозора рідина.

Протипоказанням його застосування є підвищена чутливість до будь-яких інгредієнтів лікарського засобу. Оскільки діюча речовина має низьку системну концентрацію, взаємодія з іншими лікарськими засобами є малоймовірною.

2.2. Посуд та обладнання

Аналіз досліджуваних лікарських засобів здійснювали за допомогою наступного обладнання:

- хроматографічна система “BISCHOFF CHROMATOGRAPHY” (Додаток 2);
- колонка Nova-Pak C18 150 мм × 3,9 мм;
- мікрошприц 50 мкл.;
- лійка ділильна для екстракції, 1000 мл;
- випарник ротаційний RE-100-PRO;
- ваги аналітичні Radwag AS 220.R2, зав. № 502964, свідоцтво про калібрування № 3816 від 03.06.2019 ТОВ «МЕТРОЛОДЖІ СЕРВІС» (Додаток 3);
- колби мірні, циліндри і піпетки класу точності А (Додаток 4);
- колба грушоподібна для відгону розчинників.

2.3. Реактиви

Для аналізу досліджуваних лікарських засобів були використані наступні реактиви:

- бензалконій хлориду порошок (ч. д. а.)
- вода для хроматографії;
- ацетат натрію (клас HPLC);
- ацетонітрил (клас HPLC);
- метанол (клас HPLC);
- льодяна оцтова кислота.

2.4. Методика та умови методу високоефективної рідинної хроматографії

Високоефективна рідинна хроматографія – це аналітичний метод, який використовується для розділення сполук, розчинних у певному розчиннику.

Це основний метод хроматографії, який використовується в більшості лабораторій світу. Рідинна хроматографія була вперше відкрита як аналітичний метод на початку двадцятого століття і вперше використовувалася як метод розділення кольорових сполук. Звідси походить назва хроматографія, що означає колір, а графіка означає письмо [6, 7].

Залежно від механізму поділу речовин розрізняють такі варіанти ВЕРХ: адсорбційну, розподільчу, іонообмінну, ексклюзивну, хіральну та ін. В адсорбційній хроматографії поділ речовин відбувається за рахунок їх різної здатності адсорбуватися та десорбуватися з поверхні адсорбенту з розвиненою поверхнею, наприклад, силікагелю [6-10].

За полярністю рухомих та нерухомих фаз ВЕРХ поділяють на нормально-фазову та обернено-фазову. Нормально-фазовою називають варіант хроматографії, у якому використовуються полярний сорбент та неполярна рухома фаза. У обернено-фазовому варіанті хроматографії використовують неполярні хімічно модифіковані сорбенти і полярні рухливі фази [6-10].

Усі хроматографічні методи розділення, у тому числі й ВЕРХ, працюють за подібним основним принципом; кожна сполука взаємодіє з іншими хімічними речовинами характерним чином. За допомогою ВЕРХ можна аналізувати лише розчинені в розчинниках сполуки, що дозволяє якісно та кількісно проаналізувати, які компоненти та скільки кожного компонента міститься в зразку [6].

На Рис.1 показана основна схема процесу ВЕРХ. До складу рідинного хроматографа зазвичай входять наступні основні вузли:

- вузол підготовки рухомих фаз, у тому числі й ємність з рухомою фазою (або ємності з окремими розчинниками, що входять до складу рухомих фаз) та систему дегазації рухомих фаз;
- насосна система;
- змішувач рухомих фаз (у разі потреби);
- система введення проби (інжектор);

- хроматографічна колонка (може бути встановлена у спеціальний термостат);
- детектор;
- система збору та обробки даних (комп'ютеризована).

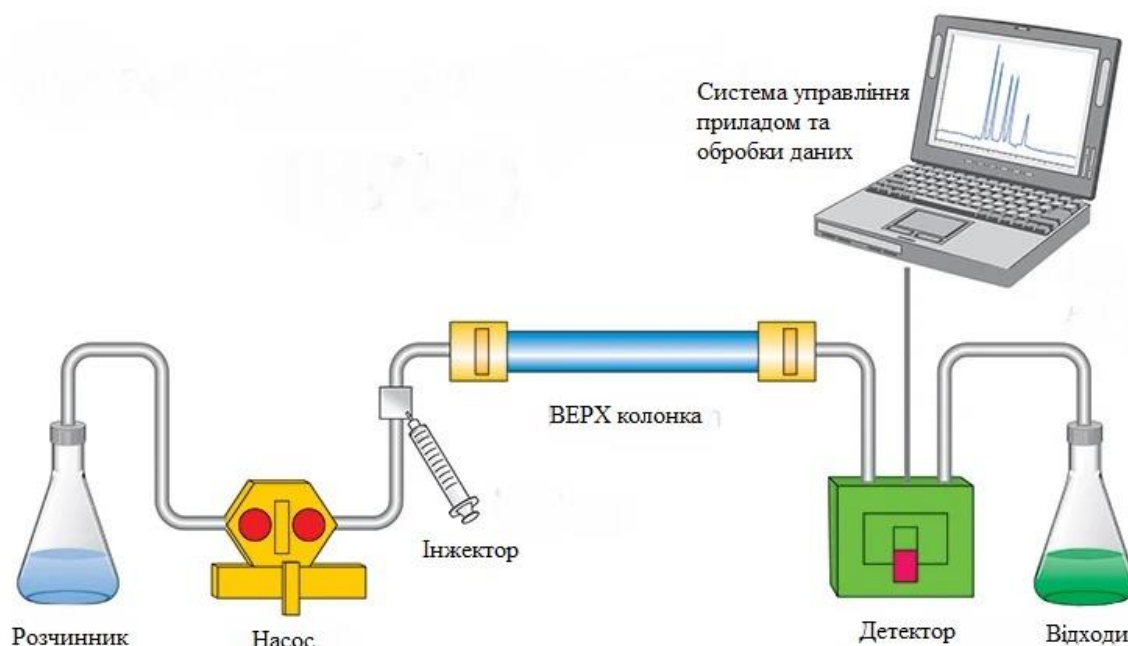


Рис. 1. Схема розташування функціональних блоків рідинного хроматографа

Насоси забезпечують комп'ютеризовану подачу рухомої фази у колонку із заданою постійною швидкістю. Склад рухомої фази може бути постійним або змінним під час аналізу. У першому випадку процес називають ізократичною, тоді як у другому – градієнтною. Перед насосною системою іноді встановлюють фільтри з діаметром отворів 0,45 мкм для фільтрації рухомої фази. Різноманітні розчинники (індивідуальні та їх суміші) застосовуються як рухома фаза. Для нормально-фазової хроматографії зазвичай застосовуються рідкі вуглеводні (гексан, циклогексан, гептан тощо) та інші відносно неполярні розчинники з невеликими добавками органічних полярних сполук, які регулюють елюювальну силу рухомої фази. А для

обернено-фазової хроматографії до складу рухомої фази входять полярні органічні розчинники (зазвичай ацетонітрил та метанол) та вода. Для оптимізації розподілу часто використовують водні розчини з певним значенням рН, зокрема буферні розчини. Застосовують добавки неорганічних та органічних кислот, основ та солей та інші сполуки [6-10].

У змішувачі відбувається утворення єдиної рухомої фази з окремих розчинників, що подаються насосами. Змішування розчинників зазвичай відбувається спонтанно, але іноді застосовуються системи з примусовим змішуванням [6-10].

Інжектори можуть бути універсальними для введення проб від 1-2 мкл до 2 мл або дискретними для введення проби лише певного об'єму. Інжектор для введення проби (розчину) розташовується безпосередньо перед колонкою хроматографії. Його конструкція дозволяє змінювати напрямок потоку рухомої фази та здійснювати попереднє введення проби у петлю певного об'єму (зазвичай від 10 до 100 мкл) [6-10].

Хроматографічні колонки зазвичай є трубками з нержавіючої сталі, скла або пластику, заповнені сорбентом і закриті з обох сторін фільтрами з діаметром отворів 2-5 мкм. Довжина аналітичної колонки, залежно від механізму хроматографічного розділення, може перебувати в діапазоні від 5 до 60 см і більше (зазвичай вона становить 10-25 см), внутрішній діаметр – від 2 до 10 мм (зазвичай 4,6 мм). Як сорбенти зазвичай застосовують силікагель, оксид алюмінію, графіт пористий (використовуються в нормально-фазовій хроматографії), смоли або полімери з кислотними чи основними групами, хімічно модифіковані сорбенти тощо [6-10].

Використовуються різні способи детекції. Найбільш поширеними є спектрофотометричні детектори, що реєструють зміну оптичної щільності в ультрафіолетовій, видимій і часто у ближній інфрачервоній областях спектру від 190 до 800-900 нм [6-10].

Сучасна система обробки даних є пов'язаним з хроматографом персональним комп'ютером із встановленим відповідним програмним

забезпеченням, що дозволяє реєструвати та обробляти хроматограму, а також керувати роботою хроматографа та стежити за основними параметрами хроматографічної системи.

Серед різноманітних технологій, розроблених для хроматографії, пристрої, призначені для молекулярного поділу, які називаються колонками, і високопродуктивні насоси для подачі розчинника зі стабільною швидкістю потоку є одними з ключових компонентів хроматографів.

За допомогою цього методу зразок розділяється на складові частини через різницю у відносній спорідненості різних молекул до фаз, що використовуються для розділення. Виділяються дві фази – рухома (рідина, яка подається під високим тиском) та нерухома (тверда речовина, така як силікагель, алюмогель, алюміній (III) оксид тощо) [6-8]. Розчинник, який використовується для розділення компонентів рідкого зразка для аналізу ВЕРХ, називається рухомою фазою. Рухома фаза подається в розділову колонку, також відому як стаціонарна фаза, а потім до детектора зі стабільною швидкістю потоку, що контролюється насосом подачі розчинника. Певна кількість зразка вводиться в колонку, і сполуки, що містяться в зразку, відокремлюються. Сполуки, розділені в колонці, виявляються детектором, розташований за потоком від колонки, і кожна сполука ідентифікується та визначається кількісно [6-10].

Розділення, котре базується на сорбційній теорії, відбувається у хроматографічній колонці, яка заповнюється речовиною нерухомої фази [7, 8]. Кількісну оцінку здійснюють методом абсолютного калібрування або методом внутрішнього стандарту [7, 9, 17]. Абсолютне калібрування ґрунтується на побудові залежності площ піків досліджуваного розчину від її концентрації у пробі – калібрувального графіка, для формування якого використовують стандартні розчини із заздалегідь відомою концентрацією. Для підвищення точності дослідження кожен стандартний розчин аналізують декілька раз і визначають середнє значення [7-10].

2.4.1. Вимоги до стандартних розчинів

Визначення вмісту бензалконій хлориду у досліджуваних розчинах здійснюється із використанням стандартних розчинів.

Стандартними слугували водні розчини бензалконій хлориду з концентрацією 100, 150 і 200 мкг/мл. Для їх приготування належні наважки бензалконій хлориду розчиняли у відповідній кількості дистильованої води (об'єм кожного отриманого розчину має становити 50 мл).

2.4.2. Вимоги до робочих розчинів

Аналіз вмісту бензалконій хлориду у досліджуваних лікарських засобах проводився у підготовлених робочих розчинах. Для приготування кожного робочого розчину відбирали по 10 мл відповідного лікарського засобу і у колбі доводили до загального об'єму 50 мл.

2.4.3. Вимоги до вимірювання зразка

Вимірювання досліджуваних зразків здійснювали за допомогою хроматографічної системи "BISCHOFF CHROMATOGRAPHY" (Додаток 2) згідно з інструкціями до її застосування. Обрана модель хроматографа характеризується простотою обслуговування, високою продуктивністю, достатньою автоматизацією, повною комп'ютеризацією, опцією автоматичної валідації системи.

Використання згаданої хроматографічної системи передбачає наступну послідовність дій:

- увімкнути усі модулі хроматографічної системи;
- занурити капіляри для розчинників у відповідні ємності;
- відкрити клапан зливної системи насосів;
- для видалення повітря з ліній подачі рухомої фази здійснити прокачування кожної з них;
- після видалення повітря із системи необхідно від'єднати шприц та закрутити зливний клапан;

- тричі промити голку автосемплера;
- прокачати капіляри, які розташовані після насосів;
- під'єднати хроматографічну колонку;
- встановити задану температуру термостата;
- зрівноважити колонку;
- обнулити детектор;
- увімкнути комп'ютер і запустити програму.

З метою дотримання вимог точності вимірювання досліджуваних зразків здійснюється і шестиразовій повторності.

2.4.4. Вимоги до розрахунку

Оцінка вмісту досліджуваної речовини здійснюється методом аналізу піків стандарту (з відомою концентрацією) і речовини з невідомою концентрацією. Вміст діючої речовини у досліджуваному розчині розраховується за рівнянням:

$$X = \frac{(S_{ph} \times m_{st} \times \rho)}{(S_{st} \times m_{ph})},$$

де:

X – вміст діючої речовини у досліджуваному зразку, мг/мл;

S_{ph} – площа піку діючої речовини у розчині досліджуваного зразка;

S_{st} – площа піку діючої речовини у розчині стандарту;

m_{ph} – маса наважки досліджуваного зразка, взятого для аналізу, мг;

m_{st} – маса наважки діючої речовини, мг;

ρ – густина препарату, г/мл.

Розділ 3. Результати та їх обговорення

Метод високоефективної хроматографії – це найточніший аналітичний метод кількісної оцінки речовин. Проте, він вимогливий до умов проведення вимірювань (оптимального температурного режиму хроматографічної колонки, хвилі детектування тощо), а тому їх дотримання є важливою передумовою якісного аналізу досліджуваної речовини.

3.1. Умови хроматографування

Вимірювання вмісту бензалконій хлориду у досліджуваних лікарських засобах здійснювали із дотриманням зазначених у таблиці 1 умов хроматографування.

Таблиця 1. Умови визначення вмісту бензалконій хлориду у досліджуваних лікарських засобах методом високоефективної рідинної хроматографії

| | |
|--------------------------------|-----------------|
| Рухома фаза А | ацетонітрил |
| Рухома фаза В | 0,6М етилацетат |
| рН рухомої фази | 4,6 |
| Швидкість рухомої фази | 1,0 мл/хв. |
| Об'єм інжекції | 50 мкл |
| Довжина хвилі детектування | 262 нм |
| Температура термостату колонки | 30 °С |

Для хроматографічних вимірювань використовували двокомпонентну ацетонітрил-ацетатну рухому фазу із рН 4,6 із градієнтами, зазначеними у таблиці 2.

Буферною фазою у хроматографічному дослідженні слугував розчин 0,6М ацетату, для приготування якого 5,4 г ацетату натрію розчинили в 50 мл води. Значення рН доводили до 4,6 за допомогою крижаної оцтової кислоти, з подальшим розбавленням водою до об'єму 100 мл.

Швидкість рухомої фази становила 1,0 мл/хв., що відповідає технічним характеристикам хроматографічної колонки.

Об'єм інжекції досліджуваної речовини – 50 мкл.

Таблиця 2. Градієнт рухомої фази

| Ацетонітрил | 0,6М ацетат |
|-------------|-------------|
| 75 | 25 |
| 60 | 40 |
| 70 | 30 |

Довжину хвилі для детектування визначали у відповідності з наявною у вільному доступі інформацією щодо фізико-хімічних властивостей бензалконій хлориду. Так, виявило, що для проведення аналітичних досліджень хроматограф доцільно налаштувати на параметри довжини хвилі – 262 нм [13, 15, 16].

Для проведення вимірювань обрали температуру 30 °С, оскільки саме за такої температури встановлювався оптимальний тиск у хроматографічній колонці, а ризик руйнування нерухомої фази мінімізувався.

Належний рівень якості аналітичних досліджень забезпечували попереднім визначенням точності методу. Для цього використали ефект плацебо, який досліджували за допомогою холостого зразка, плацебо та активного розчину. Точність повторюваності забезпечували шляхом використання шести визначень при фіксованому рівні концентрації досліджуваного зразка в гомогенному розчині.

3.2. Побудова калібрувального графіка

Згідно з вимогами до розрахунку вмісту бензалконій хлориду у досліджуваних зразках (див. розділ 2.4.4. Вимоги до розрахунку) градувальна залежність площі піку від концентрації аналізуємої речовини встановлюється на підставі хроматограми стандартного розчину (Рис. 2),

отриманого за методикою, описаною у розділі 2.4.1. Вимоги до стандартного розчину.

Для отримання хроматограм (Рис. 3_{a-c}) стандартних розчинів і подальшого визначення піків провели хроматографічний аналіз кожного з цих розчинів, дотримуючись послідовності дій, зазначених у розділі 2.4.3. Вимоги до вимірювання зразка.

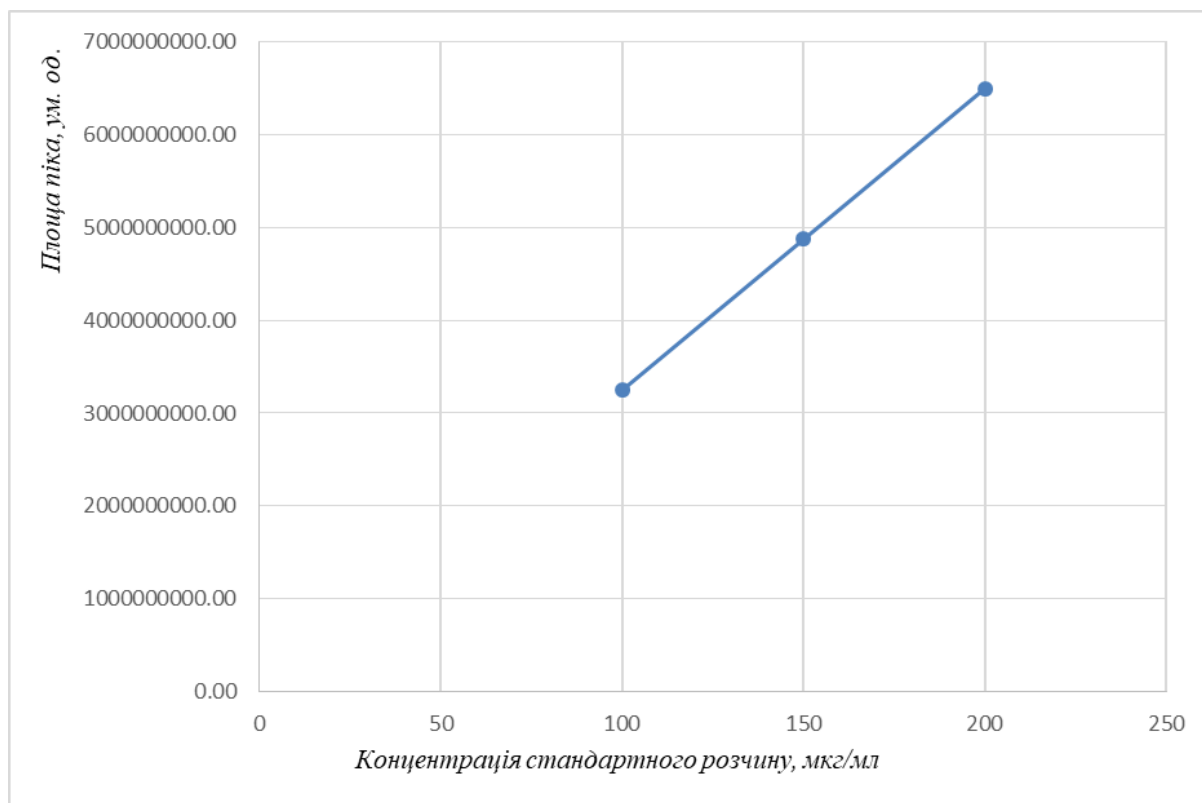
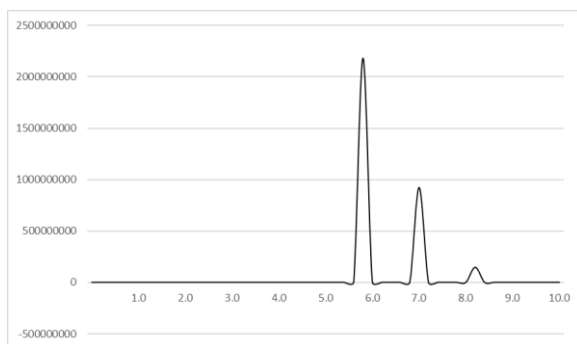


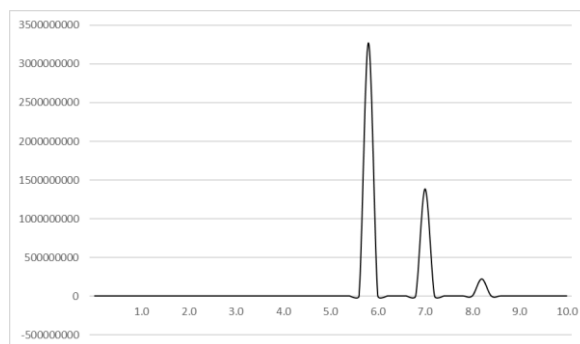
Рис. 2 Калібрувальний графік залежності площі піків стандартних розчинів бензалконій хлориду від їх концентрації

На кожній з хроматограм чітко простежуються три піки, що обумовлено наявністю гомологів (C_{12} , C_{14} і C_{16}) бензалконій хлориду [12] у стандартних розчинах.

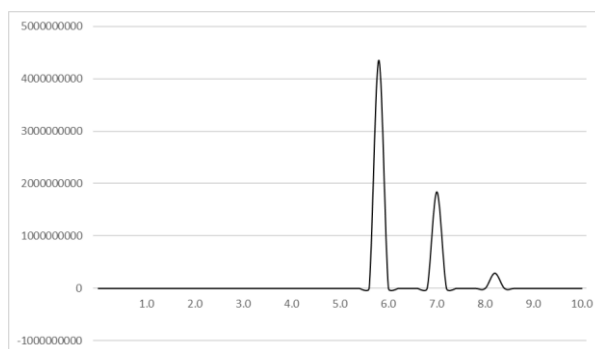
Калібрувальний графік (Рис. 2) був побудований за результатами співставлення концентрацій стандартних розчинів та відповідної площі піка.



a) розчин із вмістом 100 мкг/мл



b) розчин із вмістом 150 мкг/мл



c) розчин із вмістом 200 мкг/мл

Рис. 3 Хроматограми стандартних розчинів бензалконій хлориду

Аналіз отриманих даних вказує, що залежність площі піків стандартних розчинів бензалконій хлориду від їх концентрації є лінійною з рівнянням регресії, яке дорівнює $y = 32468902,34x - 8066,56$ з коефіцієнтом кореляції $R^2 = 0,99996$. Таким чином, отриманий калібрувальний графік відповідає належним вимогам для вимірювання кількості бензалконій хлориду у досліджуваних розчинах.

3.3. Результати визначення вмісту бензалконій хлориду у досліджуваних лікарських засобах

За результатами аналізу робочих розчинів досліджуваних лікарських засобів отримані відповідні хроматограми (Рис. 4_{a-c}), а також визначено площу піків. У наведених хроматограмах бензалконій хлорид також формує три піки, як і у хроматограмах стандартних розчинів.

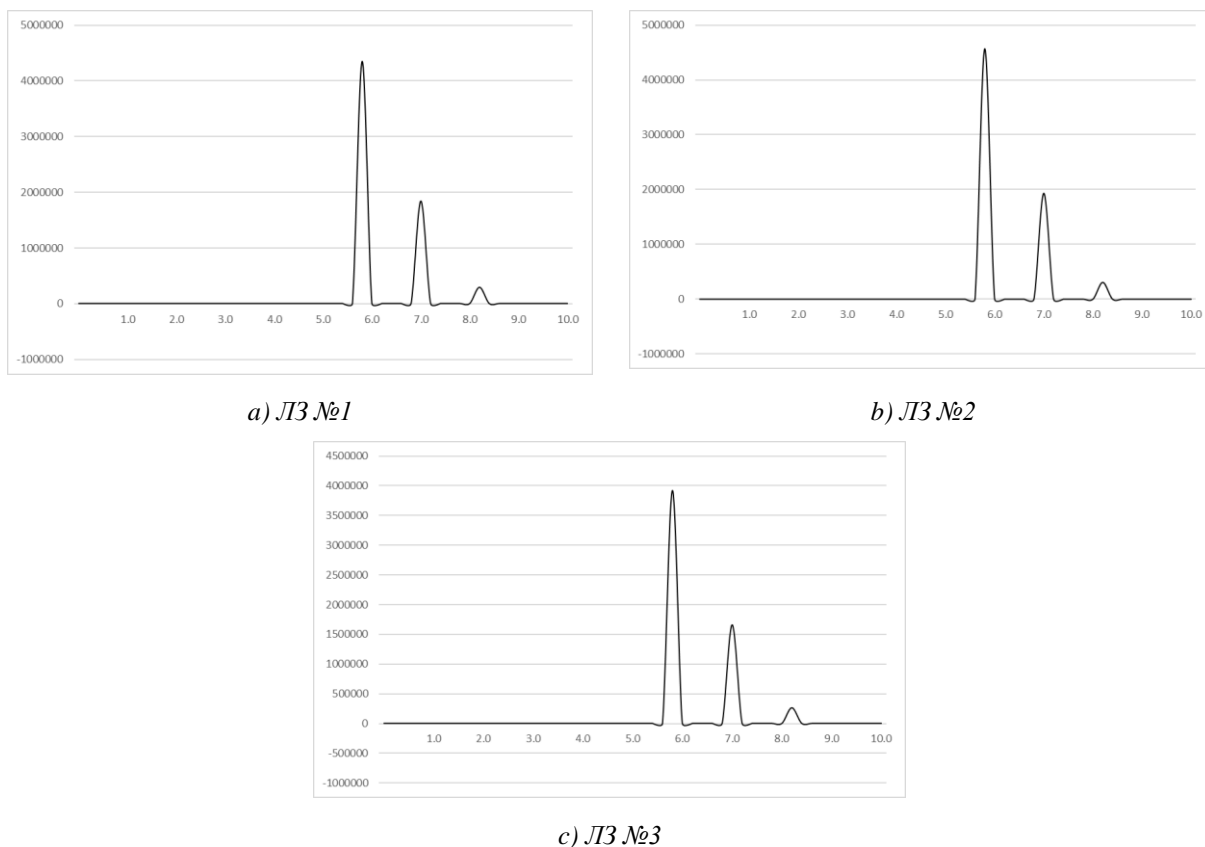


Рис. 4 Хроматограми досліджуваних лікарських засобів

Значення площі піків кожного з повторень наведено у Табл. 3. Оцінку вмісту досліджуваної речовини у кожному з лікарських засобів здійснювали методом аналізу піків стандарту та піків аналізованих розчинів за допомогою рівняння, зазначеного у розділі 2.4.4. Вимоги до розрахунку.

Табл. 3. Площа піків (ум. од.) та вміст (мкг/мл) бензалконій хлориду у досліджуваних лікарських засобах

| Повторення | ЛЗ №1 | ЛЗ №2 | ЛЗ №3 |
|----------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| 1 | 6479913.98 | 6818301.05 | 5847504.87 |
| 2 | 6492282.08 | 6804891.53 | 5842077.14 |
| 3 | 6489188.44 | 6806798.42 | 5841534.37 |
| 4 | 6483046.54 | 6816830.02 | 5835703.94 |
| 5 | 6484557.69 | 6824055.77 | 5834414.13 |
| 6 | 6484817.12 | 6791039.34 | 5816350.89 |
| <i>Середнє</i> | <i>6485634.31</i> | <i>6810319.353</i> | <i>5836264.223</i> |
| <i>Вміст</i> | <i>0,20</i> | <i>0,21</i> | <i>0,18</i> |

Як видно із Табл. 3, середньоарифметичний вміст бензалконій хлориду у досліджуваних лікарських засобах коливався від 0,18 до 0,21 мкг/мл. Така відносно мала кількість досліджуваної речовини у аналізованих лікарських засобах пояснюється тим, що бензалконій хлорид застосовується як допоміжна речовина.

3.4. Валідація методики

Для підтвердження ефективності обраної методики і достовірності її результатів застосовували відповідні заходи валідації – перевірили специфічність методики, її лінійність, робастність і правильність [33, 34].

3.4.1. Перевірка специфічності методики

Здатність визначити досліджувану речовину у присутності інших компонентів характеризує її специфічність [33].

Методика випробовувалась безпосередньо на рідких лікарських формах, склад яких зазначений в інструкціях для медичного використання. Тому, перевірку результатів, отриманих за допомогою вищезазначеної методики кількісного визначення досліджуваної речовини, на специфічність методики ми порівнювали як з відомою концентрацією компонента у лікарських засобах, так і з результатами аналізу показників спектрального поглинання. Виявлено чіткій збіг за обома критеріями, що доводить специфічність аналізованої методики.

3.4.2. Перевірка лінійності методики

Здатність запропонованої методики підтримувати пряму пропорційну залежність значення оптичної густини від концентрації досліджуваної речовини є її лінійністю [33].

Аналіз досліджуваної методики кількісного визначення вказав на її однозначну лінійність (Рис. 2). Ознакою лінійності є значення коефіцієнту

кореляції ($R^2 = 0.99996$, що задовольняє вимогам ДФУ) та лінійна функція, яка описується рівнянням: $y = 32468902,34x - 8066,56$.

3.4.3. Перевірка робасності методики

Порівняння між собою експериментальних результатів, котрі були отримані за допомогою різних методик, є типовою практикою у аналітичній практиці, у тому числі й у фармації. Таким чином оцінюються систематичні помилки порівняння результатів досліджуваних методик, якщо вони мають місце. Крім того, практикується перевірка методики у різних лабораторних умовах (робасність) – різне походження реагентів, відмінність у часі проведення вимірювання, виконання вимірювань відповідно до типового алгоритму різними виконавцями тощо. У нашому випадку для перевірки робасності досліджуваної методики використали критерій оцінки відхилення площі піку шести зразків стандартних розчинів. Крім того, надійність методу забезпечували за допомогою дотримання постійної температури хроматографічної колонки у термостаті.

Результати та відповідне обговорення наведені у розділі 3.2. Побудова калібрувального графіка. Ефект плацебо досліджували за допомогою холостого зразка, плацебо та активного розчину в ВЕРХ.

3.4.4. Перевірка правильності методики

Перевірку правильності методики здійснювали за принципом «введено-знайдено». Отримані результати вимірювань корелюють із регламентованим вмістом досліджуваної речовини у відповідних лікарських засобах. За результатами порівняння експериментальних даних щодо вмісту аналізованого компонента у досліджуваних лікарських засобах виявлено достатній рівень точність (правильність) запропонованого методу.

3.5. Порівняльний аналіз методик кількісного визначення

Згідно з *European pharmacopoeia* для ідентифікації бензалконій хлориду переважно застосовують ультрафіолетову та видиму абсорбційну спектрофотометрію [17].

Незважаючи на те, що спектрофотометрія є поширеним і доступним методом аналізу забарвлених та безбарвних розчинів хімічних сполук, цей метод характеризується низкою недоліків – насамперед це вимогливість до умов проведення вимірювань (зовнішній фактор є вагомим чинником) та відносно низька точність отриманих результатів.

Високоєфективна рідинна хроматографія – це аналітичний метод, який для ідентифікації та кількісного визначення кожного з компонентів досліджуваної речовини використовує розділення компонентів суміші у відповідності з відмінностями в їх рівноважному розподілі між двома фазами, які не змішуються. Відмінною особливістю ВЕРХ є його висока точність, а тому його застосування набуває все більшого попиту і поширення.

ВИСНОВКИ

1. За результатами проведених досліджень було визначено кількісний вміст бензалконій хлориду у досліджуваних лікарських засобах за допомогою методу високоефективної рідинної хроматографії. Було встановлено, що у лікарському засобі ЛЗ №1 кількість бензалконій хлориду становила 0,20 мкг/мл, ЛЗ №2 – 0,21 мкг/мл, а у ЛЗ №3 – 0,18 мкг/мл.

2. Аналізована методика була перевірена за основними валідаційними критеріями (специфічність, лінійність, робастність та правильність). Виявлено, що валідаційна якість відповідає критеріям прийнятності згідно Державної фармакопеї України, а тому зазначену методику доцільно використовувати для кількісного визначення бензалконій хлориду у вушних краплях.

3. Запропонована методика виявила високу точність вимірювань, а тому її можна застосовувати як альтернативний метод.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Фармацевтична енциклопедія [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: [https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/1878/benzalkoniyu-
xlorid](https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/1878/benzalkoniyu-
xlorid).
2. Benzalkonium Chloride. Novo Nordisk Pharmatech A/S [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <https://novonordiskpharmatech.com/>.
3. Benzalkonium Chloride. Ataman chemicals [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: [https://www.atamanchemicals.com/benzalkonyum-
klorur_u23719/?lang=EN](https://www.atamanchemicals.com/benzalkonyum-
klorur_u23719/?lang=EN).
4. Rowe, R.C., Sheskey, P.J., Cook, W.G., Fenton, M.E, ‘Handbook of pharmaceutical excipients’, 7th ed. London, Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, eds., 2012, p. 60–61.
5. Smolinske, S.C., ‘Handbook of Food, Drug and Cosmetic Excipients’, Boca Raton, FL: CRC Press, 1992, p. 31–39.
6. What is HPLC? Chemistry Europe [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: https://www.chemistryviews.org/details/education/9464911/What_is_HPLC/.
7. Kazakevich, Yuri; LoBrutto, Rosario, eds. (2007). HPLC for pharmaceutical scientists. Hoboken, NJ: Wiley-Interscience.
8. Levin, Shulamit (January 2004). “Reversed Phase Stationary Phases in Pharmaceutical Sciences”. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. 27 (7–9): 1353–1376 [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/JLC-120030606>.
9. Bayne, Shirley; Carlin, Michelle (2017). Forensic Applications of High Performance Liquid Chromatography (1st ed.). CRC Press.
10. Dong, Michael (2018). “Ten Common-Sense Corollaries in Pharmaceutical Analysis by High Performance Liquid Chromatography”. LCGC Europe. LCGC Europe-08-01-2018. 31 (8): 432–436 [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.chromatographyonline.com/view/ten->

[common-sense-corollaries-pharmaceutical-analysis-high-performance-liquid-chromatography](#).

11. Zephiran (benzalkonium chloride). Sanofi. Retrieved 28 April 2020 [Электронный ресурс]. – Режим доступа до ресурсу:

<https://products.sanofi.us/zephiran/zephiran.pdf>.

12. Maximilian Lackner, Josef Peter Guggenbichler "Antimicrobial Surfaces" Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH, Weinheim, 2013 [Электронный ресурс]. – Режим доступа до ресурсу:

https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14356007.q03_q01.

13. Price PB. 1950. Benzalkonium chloride (zephiran chloride) as a skin disinfectant. Arch Surg 61:23–33 [Электронный ресурс]. – Режим доступа до ресурсу: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15426542>.

14. U.S. Environmental Protection Agency (EPA). 2006. Reregistration eligibility decision for alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride (ADBAC). EPA739-R-06-009 U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

15. Benzalkonium Chloride. Chemical book [Электронный ресурс]. – Режим доступа до ресурсу:

https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB0712969.htm.

16. Benzalkonium Chloride. International Labour Organization. [Электронный ресурс]. – Режим доступа до ресурсу:

https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_lang=en&p_card_id=1584&p_version=2.

17. European pharmacopoeia. Tenth edition. Strasbourg. 2019.

18. Tezel U, Pavlostathis S, Tezel U, Pavlostathis S. 2012. The role of quaternary ammonium compounds on antimicrobial resistance in the environment, p 349–386. In Keen PL, Montforts MHMM (ed), Antimicrobial resistance in the environment. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ.

19. Choi SM, Roh TH, Lim DS, Kacew S, Kim HS, Lee B-M. 2018. Risk assessment of benzalkonium chloride in cosmetic products. J Toxicol Environ Health B Crit Rev 21:8–23 [Электронный ресурс]. – Режим доступа до ресурсу:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29211634/>.

20. Condell O, Iversen C, Cooney S, Power KA, Walsh C, Burgess C, Fanning S. 2012. Efficacy of biocides used in the modern food industry to control *Salmonella enterica*, and links between biocide tolerance and resistance to clinically relevant antimicrobial compounds. *Appl Environ Microbiol* 78:3087–3097 [Электронный ресурс]. – Режим доступа до ресурсу:

<https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.07534-11>.

21. Marple, B., Rolanf, P., Benninger, M., ‘Safety review of benzalkonium chloride used as a preservative in intranasal solutions: an overview of conflicting data and opinions’, *Otolaryngol Head Neck Surg.*, Vol. 130, 2004, p. 131–141.

22. Noecker, R., Miller, K.V., 'Benzalkonium Chloride in Glaucoma Medications', *The Ocular Surface*, Vol. 9(3), July 2011, p. 159–162.

23. Basketter DA, Marriott M, Gilmour NJ, White IR. 2004. Strong irritants masquerading as skin allergens: the case of benzalkonium chloride. *Contact Dermatitis* 50:213–217 [Электронный ресурс]. – Режим доступа до ресурсу: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.0105-1873.2004.00331.x>.

24. Snow, J. B.; Wackym, P. A. (2009). *Ballenger's Otorhinolaryngology: Head and Neck Surgery* (reviseded.). PMPH-USA. p. 277.

25. Honigman, J.L., ‘Disinfectant ototoxicity [letter]’, *Pharm J*, no. 215, 1975, p. 523.

26. Committee on Drugs, American Academy of Pediatrics. ‘“Inactive” ingredients in pharmaceutical products: update’, *Paediatrics*, Vol. 99, February 1997, p. 268–278.

27. Kennedy, D W; Bolger, W E; Zinreich, S J (2001). *Diseases of the Sinuses Diagnosis and Management*. B.C. Decker Inc. p. 162.

28. Marple, B; Roland, P; Benninger, M (2004). ‘Safety review of benzalkonium chloride used as a preservative in intranasal solutions: an overview of conflicting data and opinions’. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*. 130 (1): 131–41.

29. Beule, A. G. (2010). "Physiology and pathophysiology of respiratory mucosa of the nose and the paranasal sinuses". *GMS Current Topics in Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery*. 9: Doc07.

30. Graf, P (2005). "Rhinitis medicamentosa: a review of causes and treatment". *Treatments in Respiratory Medicine*. 4 (1): 21.

31. Martindale: The Complete Drug Reference (37th edition ed.). Sean C. Sweetman, ed. (2011), London: Pharmaceutical Press.

32. Компендіум. Спеціалізоване медичне інтернет-видання для лікарів, провізорів, фармацевтів, студентів медичних і фармацевтичних вишів. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://compendium.com.ua/>

33. Валідація аналітичних методик і випробувань. Державна Фармакопея України. Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е видання. Харків: РІРЕГ, 2001. С. 58-67. Доповнення 1. 2004. С. 2-4.

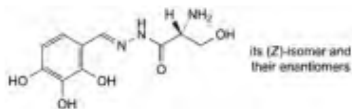
34. Георгіянц В.А. Валідація аналітичних методик у фармації : теорія, нормативні аспекти, проблеми практики / В.А. Георгіянц, О.А. Євтіфєєва. – Фармацевтичний часопис. – №2. – 2007. – С.13-18.

ДОДАТКИ

Витяг з Європейської фармакопеї [17]

Bentonite

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 10.0

Monographs
B

C. (2RS)-2-amino-3-hydroxy-N'-[(EZ)-(2,3,4-trihydroxyphenyl)methylidene]propanehydrazide.

01/2017:0467



BENTONITE

Bentonitum

DEFINITION

Natural clay containing a high proportion of montmorillonite, a native hydrated aluminium silicate in which some aluminium and silicon atoms may be replaced by other atoms such as magnesium and iron.

CHARACTERS

Appearance: very fine, homogeneous, greyish-white powder with a more or less yellowish or pinkish tint.

Solubility: practically insoluble in water and in aqueous solutions.

It swells with a little water forming a malleable mass.

IDENTIFICATION

A. To 0.5 g in a metal crucible add 1 g of *potassium nitrate R* and 3 g of *sodium carbonate R* and heat until the mixture melts. Allow to cool. To this residue add 20 mL of boiling *water R*, mix and filter. Wash the insoluble residue with 50 mL of *water R*. To this residue add 1 mL of *hydrochloric acid R* and 5 mL of *water R*. Filter. To the filtrate add 1 mL of *strong sodium hydroxide solution R* and filter. To this filtrate add 3 mL of *ammonium chloride solution R*. A gelatinous white precipitate is formed.

B. Add 2.0 g in 20 portions to 100 mL of a 10 g/L solution of *sodium laurilsulfate R* in a 100 mL graduated cylinder about 30 mm in diameter. Allow 2 min between additions for each portion to settle. Allow to stand for 2 h. The apparent volume of the sediment is not less than 22 mL.

C. 0.25 g gives the reaction of silicates (2.3.1).

TESTS

Alkalinity. To 2 g add 100 mL of *carbon dioxide-free water R* and shake for 5 min. To 5 mL of this suspension add 0.1 mL of *thymolphthalein solution R*. The liquid becomes bluish. Add 0.1 mL of 0.1 M *hydrochloric acid*. The liquid is decolourised within 5 min.

Coarse particles: maximum 0.5 per cent.

To 20 g add 1000 mL of *water R* and mix for 15 min using a high-speed mixer capable of operating at not less than 5000 r/min. Transfer the suspension to a wet sieve (75), tared after drying at 100-105 °C. Wash with 3 quantities, each of 500 mL, of *water R*, ensuring that any agglomerates have been dispersed. Dry the sieve at 100-105 °C and weigh. The particles on the sieve weigh a maximum of 0.1 g.

Loss on drying (2.2.32): maximum 15 per cent, determined on 1.000 g by drying in an oven at 105 °C.

Microbial contamination

TAMC: acceptance criterion 10³ CFU/g (2.6.12).

FUNCTIONALITY-RELATED CHARACTERISTICS

This section provides information on characteristics that are recognised as being relevant control parameters for one or more functions of the substance when used as an excipient

(see chapter 5.15). Some of the characteristics described in the *Functionality-related Characteristics* section may also be present in the mandatory part of the monograph since they also represent mandatory quality criteria. In such cases, a cross-reference to the tests described in the mandatory part is included in the *Functionality-related Characteristics* section. Control of the characteristics can contribute to the quality of a medicinal product by improving the consistency of the manufacturing process and the performance of the medicinal product during use. Where control methods are cited, they are recognised as being suitable for the purpose, but other methods can also be used. Wherever results for a particular characteristic are reported, the control method must be indicated.

The following characteristics may be relevant for bentonite used as viscosity-increasing agent or suspending agent.

Sedimentation volume. To 6.0 g add 200 mL of *water R* and mix for 20 min using a high-speed mixer capable of operating at 10 000 r/min. Transfer 100 mL of this suspension to a graduated cylinder. Allow to stand for 24 h. The volume of the clear supernatant is not greater than 2 mL.

Swelling power with water: see Identification B.

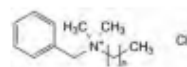
04/2009:0372

corrected 10.0



BENZALKONIUM CHLORIDE

Benzalkonii chloridum



[8001-54-5]

DEFINITION

Mixture of alkylbenzyltrimethylammonium chlorides, the alkyl groups mainly having chain lengths of C₁₂, C₁₄ and C₁₆.

Content: 95.0 per cent to 104.0 per cent of alkylbenzyltrimethylammonium chlorides (anhydrous substance) calculated using the average relative molecular mass (see Tests).

CHARACTERS

Appearance: white or yellowish-white powder or gelatinous, yellowish-white fragments, hygroscopic. On heating it forms a clear molten mass.

Solubility: very soluble in water and in ethanol (96 per cent). An aqueous solution froths copiously when shaken.

IDENTIFICATION

First identification: B, E.

Second identification: A, C, D, E.

A. Ultraviolet and visible absorption spectrophotometry (2.2.25).

Test solution. Dissolve 80 mg in *water R* and dilute to 100.0 mL with the same solvent.

Spectral range: 220-350 nm.

Absorption maxima: at 257 nm, 263 nm and 269 nm.

Shoulder: at about 250 nm.

B. Examine the chromatograms obtained in the test for average relative molecular mass and ratio of alkyl components.

Results: the principal peaks in the chromatogram obtained with the test solution are similar in retention time to the principal peaks in the chromatogram obtained with the reference solution.

1938

See the information section on general monographs (cover pages)

C. To 2 mL of solution S (see Tests) add 0.1 mL of *glacial acetic acid R* and, dropwise, 1 mL of *sodium tetraphenylborate solution R*. A white precipitate is formed. Filter. Dissolve the precipitate in a mixture of 1 mL of *acetone R* and 5 mL of *ethanol (96 per cent) R*, heating to not more than 70 °C. Add *water R* dropwise to the warm solution until a slight opalescence forms. Heat gently until the solution is clear and allow to cool. White crystals separate. Filter, wash with 3 quantities, each of 10 mL, of *water R* and dry *in vacuo* (2.2.32) at a temperature not exceeding 50 °C. The crystals melt (2.2.14) at 127 °C to 133 °C.

D. To 5 mL of *dilute sodium hydroxide solution R* add 0.1 mL of *bromophenol blue solution R1* and 5 mL of *methylene chloride R* and shake. The methylene chloride layer is colourless. Add 0.1 mL of solution S and shake. The methylene chloride layer becomes blue.

E. To 2 mL of solution S add 1 mL of *dilute nitric acid R*. A white precipitate is formed which dissolves on the addition of 5 mL of *ethanol (96 per cent) R*. The solution gives reaction (a) of chlorides (2.3.1).

TESTS

Solution S. Dissolve 1.0 g in *carbon dioxide-free water R* and dilute to 100 mL with the same solvent.

Appearance of solution. Solution S is clear (2.2.1) and not more intensely coloured than reference solution Y₆ (2.2.2, Method II).

Acidity or alkalinity. To 50 mL of solution S add 0.1 mL of *bromocresol purple solution R*. Not more than 0.1 mL of 0.1 M *hydrochloric acid* or 0.1 M *sodium hydroxide* is required to change the colour of the indicator.

Average relative molecular mass and ratio of alkyl components. Liquid chromatography (2.2.29).

Test solution. Dissolve 0.400 g of the substance to be examined in *water R* and dilute to 100.0 mL with the same solvent.

Reference solution. Dissolve the contents of a vial of *benzalkonium chloride for system suitability CRS* in 5.0 mL of *water R*.

Column:

- size: $l = 0.25$ m, $\varnothing = 4.6$ mm;
- stationary phase: end-capped nitrile silica gel for chromatography R (5 μ m).

Mobile phase: mix 45 volumes of *acetonitrile R* and 55 volumes of a 13.6 g/L solution of *sodium acetate R* previously adjusted to pH 5.0 with *glacial acetic acid R*.

Flow rate: 2.0 mL/min.

Detection: spectrophotometer at 254 nm.

Injection: 10 μ L.

Identification of homologues: use the chromatogram supplied with *benzalkonium chloride for system suitability CRS* and the chromatogram obtained with the reference solution to identify the peaks due to C₁₂, C₁₄ and C₁₆.

Relative retention with reference to C₁₂ homologue (retention time = about 6 min): C₁₄ homologue = about 1.3; C₁₆ homologue = about 1.7.

System suitability: reference solution:

- resolution: minimum 1.5 between the peaks due to the C₁₂ and C₁₄ homologues.

Calculate the average relative molecular mass of the sample by summing the products for each homologue, using the following expression:

$$W\left(\frac{A}{B}\right)$$

- A = area of the peak due to the given homologue in the chromatogram obtained with the test solution;
 B = sum of the areas of the peaks due to all homologues in the chromatogram obtained with the test solution;
 W = relative molecular mass for the given homologue: 340, 368 and 396 for the C₁₂, C₁₄ and C₁₆ homologues, respectively.

Calculate the percentage of each homologue, using the following expression:

$$100\left(\frac{C}{D}\right)$$

- C = product of the relative molecular mass of the given homologue and the area of the corresponding peak in the chromatogram obtained with the test solution;
 D = sum of the C values for all homologues quantified.

Limits:

- C₁₂ homologue: minimum 40 per cent;
- C₁₄ homologue: minimum 20 per cent;
- sum of C₁₂ and C₁₄ homologues: minimum 70 per cent.

Impurities A, B and C. Liquid chromatography (2.2.29).

Prepare the solutions immediately before use.

Test solution. Dissolve 0.50 g of the substance to be examined in *methanol R1* and dilute to 10.0 mL with the same solvent.

Reference solution (a). Dissolve 25.0 mg of *benzyl alcohol CRS* (impurity A) in *methanol R1* and dilute to 100.0 mL with the same solvent.

Reference solution (b). Dissolve 75.0 mg of *benzaldehyde CRS* (impurity B) in *methanol R1* and dilute to 100.0 mL with the same solvent. Dilute 1.0 mL of this solution to 10.0 mL with *methanol R1*.

Reference solution (c). Dilute 1.0 mL of reference solution (a) to 10.0 mL with *methanol R1*.

Column:

- size: $l = 0.15$ m, $\varnothing = 4.6$ mm;
- stationary phase: end-capped octadecylsilyl silica gel for chromatography R (5 μ m);
- temperature: 30 °C.

Mobile phase:

- mobile phase A: dissolve 1.09 g of *sodium hexanesulfonate R* and 6.9 g of *sodium dihydrogen phosphate monohydrate R* in *water R*; adjust to pH 3.5 with *phosphoric acid R* and dilute to 1000.0 mL with the same solvent;

- mobile phase B: *methanol R1*;

| Time (min) | Mobile phase A (per cent V/V) | Mobile phase B (per cent V/V) |
|------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 0 - 10 | 80 | 20 |
| 10 - 14 | 80 → 50 | 20 → 50 |
| 14 - 35 | 50 | 50 |
| 35 - 36 | 50 → 20 | 50 → 80 |
| 36 - 55 | 20 | 80 |

Flow rate: 1.0 mL/min.

Detection: spectrophotometer at 210 nm for impurities A and C, and at 257 nm for impurity B.

Injection: 20 μ L.

Relative retention with reference to impurity A (retention time = about 10 min): impurity B = about 1.3; impurity C = about 2.4.

System suitability: at 210 nm:

- signal-to-noise ratio: minimum 10 for the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (c);

- *symmetry factor*: minimum 0.6 for the peak due to impurity A in the chromatogram obtained with reference solution (a).

Limits:

- *correction factor*: for the calculation of content, multiply the peak area of impurity C by 1.3;
- *impurity A*: not more than the area of the corresponding peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.5 per cent);
- *impurity B*: not more than the area of the corresponding peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.15 per cent);
- *impurity C*: not more than 0.1 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.05 per cent).

Amines and amine salts. Dissolve 5.0 g with heating in 20 mL of a mixture of 3 volumes of 1 M hydrochloric acid and 97 volumes of methanol R and add 100 mL of 2-propanol R. Pass a stream of nitrogen R slowly through the solution. Titrate with up to 12.0 mL of 0.1 M tetrabutylammonium hydroxide and record the potentiometric titration curve (2.2.20). If the curve shows 2 points of inflexion, the volume of titrant added between the 2 points is not greater than 5.0 mL. If the curve shows no point of inflexion, the substance to be examined does not comply with the test. If the curve shows 1 point of inflexion, repeat the test but add 3.0 mL of a 25.0 g/L solution of dimethyldecylamine R in 2-propanol R before the titration. If the titration curve after addition of 12.0 mL of the titrant shows only 1 point of inflexion, the substance to be examined does not comply with the test.

Water (2.5.12): maximum 10 per cent, determined on 0.300 g.

Sulfated ash (2.4.14): maximum 0.1 per cent, determined on 1.0 g.

ASSAY

Dissolve 2.00 g in water R and dilute to 100.0 mL with the same solvent. Transfer 25.0 mL of the solution to a separating funnel, add 25 mL of methylene chloride R, 10 mL of 0.1 M sodium hydroxide and 10.0 mL of a freshly prepared 50 g/L solution of potassium iodide R. Shake well, allow to separate and discard the methylene chloride layer. Shake the aqueous layer with 3 quantities, each of 10 mL, of methylene chloride R and discard the methylene chloride layers. To the aqueous layer add 40 mL of hydrochloric acid R, allow to cool and titrate with 0.05 M potassium iodate until the deep-brown colour is almost discharged. Add 5 mL of methylene chloride R and continue the titration, shaking vigorously, until the methylene chloride layer no longer changes colour. Carry out a blank titration on a mixture of 10.0 mL of the freshly prepared 50 g/L solution of potassium iodide R, 20 mL of water R and 40 mL of hydrochloric acid R.

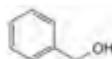
1 mL of 0.05 M potassium iodate is equivalent to $\frac{x}{10}$ mg of benzalkonium chloride where x is the average relative molecular mass of the sample.

STORAGE

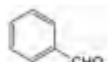
In an airtight container.

IMPURITIES

Specified impurities: A, B, C.



A. benzyl alcohol,



B. benzaldehyde,



C. (chloromethyl)benzene.

04/2009:0371
corrected 10.0**BENZALKONIUM CHLORIDE SOLUTION****Benzalkonii chloridi solutio****DEFINITION**

Aqueous solution of a mixture of alkylbenzyltrimethylammonium chlorides, the alkyl groups mainly having chain lengths of C₁₂, C₁₄ and C₁₆.

Content: 475 g/L to 525 g/L of alkylbenzyltrimethylammonium chlorides, calculated using the average relative molecular mass (see Tests). The solution may contain ethanol (96 per cent).

CHARACTERS

Appearance: clear, colourless or slightly yellowish liquid.

Solubility: miscible with water and with ethanol (96 per cent).

It froths copiously when shaken.

IDENTIFICATION

First identification: B, E.

Second identification: A, C, D, E.

A. Ultraviolet and visible absorption spectrophotometry (2.2.25).

Test solution. Dilute 0.3 mL to 100.0 mL with water R.

Spectral range: 220-350 nm.

Absorption maxima: at 257 nm, 263 nm and 269 nm.

Shoulder: at about 250 nm.

B. Examine the chromatograms obtained in the test for average relative molecular mass and ratio of alkyl components.

Results: the principal peaks in the chromatogram obtained with the test solution are similar in retention time to the principal peaks in the chromatogram obtained with the reference solution.

C. To 0.05 mL add 2 mL of water R, 0.1 mL of glacial acetic acid R and, dropwise, 1 mL of sodium tetraphenylborate solution R. A white precipitate is formed. Filter. Dissolve the precipitate in a mixture of 1 mL of acetone R and 5 mL of ethanol (96 per cent) R, heating to not more than 70 °C. Add water R dropwise to the warm solution until a slight opalescence forms. Heat gently until the solution is clear and allow to cool. White crystals separate. Filter, wash with 3 quantities, each of 10 mL, of water R and dry in vacuo (2.2.32) at a temperature not exceeding 50 °C. The crystals melt (2.2.14) at 127 °C to 133 °C.

D. To 5 mL of dilute sodium hydroxide solution R add 0.1 mL of bromophenol blue solution R1 and 5 mL of methylene chloride R and shake. The methylene chloride layer is colourless. Add 0.05 mL of the solution to be examined and shake. The methylene chloride layer becomes blue.

E. To 0.05 mL add 1 mL of dilute nitric acid R. A white precipitate is formed which dissolves on the addition of 5 mL of ethanol (96 per cent) R. The solution gives reaction (a) of chlorides (2.3.1).

TESTS

Solution S. Dilute 2.0 g to 100 mL with carbon dioxide-free water R.

Appearance of solution. Solution S is clear (2.2.1) and not more intensely coloured than reference solution Y_6 (2.2.2, Method II).

Acidity or alkalinity. To 50 mL of solution S add 0.1 mL of bromocresol purple solution R. Not more than 0.1 mL of 0.1 M hydrochloric acid or 0.1 M sodium hydroxide is required to change the colour of the indicator.

Average relative molecular mass and ratio of alkyl components. Liquid chromatography (2.2.29).

Test solution. Determine the density (2.2.5) of the solution to be examined. Dilute a quantity of the solution to be examined equivalent to about 0.400 g of benzalkonium chloride to 100.0 mL with water R.

Reference solution. Dissolve the contents of a vial of benzalkonium chloride for system suitability CRS in 5.0 mL of water R.

Column:

- size: $l = 0.25$ m, $\varnothing = 4.6$ mm;
- stationary phase: end-capped nitrile silica gel for chromatography R (5 μ m).

Mobile phase: mix 45 volumes of acetonitrile R and 55 volumes of a 13.6 g/L solution of sodium acetate R previously adjusted to pH 5.0 with glacial acetic acid R.

Flow rate: 2.0 mL/min.

Detection: spectrophotometer at 254 nm.

Injection: 10 μ L.

Identification of homologues: use the chromatogram supplied with benzalkonium chloride for system suitability CRS and the chromatogram obtained with the reference solution to identify the peaks due to homologues C_{12} , C_{14} and C_{16} .

Relative retention with reference to C_{12} homologue (retention time = about 6 min): C_{14} homologue = about 1.3; C_{16} homologue = about 1.7.

System suitability: reference solution:

- resolution: minimum 1.5 between the peaks due to the C_{12} and C_{14} homologues.

Calculate the average relative molecular mass of the sample by summing the products for each homologue, using the following expression:

$$W \left(\frac{A}{B} \right)$$

- A = area of the peak due to the given homologue in the chromatogram obtained with the test solution;
- B = sum of the areas of the peaks due to all homologues in the chromatogram obtained with the test solution;
- W = relative molecular mass for the given homologue: 340, 368 and 396 for the C_{12} , C_{14} and C_{16} homologues, respectively.

Calculate the percentage of each homologue, using the following expression:

$$100 \left(\frac{C}{D} \right)$$

- C = product of the relative molecular mass of the given homologue and the area of the corresponding peak in the chromatogram obtained with the test solution;
- D = sum of the C values for all homologues quantified.

Limits:

- C_{12} homologue: minimum 40 per cent;
- C_{14} homologue: minimum 20 per cent;
- sum of C_{12} and C_{14} homologues: minimum 70 per cent.

Impurities A, B and C. Liquid chromatography (2.2.29). Prepare the solutions immediately before use.

Test solution. Determine the density (2.2.5) of the solution to be examined. Dilute a quantity of the solution to be examined equivalent to 2.5 g of benzalkonium chloride to 50.0 mL with methanol R1.

Reference solution (a). Dissolve 25.0 mg of benzyl alcohol CRS (impurity A) in methanol R1 and dilute to 100.0 mL with the same solvent.

Reference solution (b). Dissolve 75.0 mg of benzaldehyde CRS (impurity B) in methanol R1 and dilute to 100.0 mL with the same solvent. Dilute 1.0 mL of this solution to 10.0 mL with methanol R1.

Reference solution (c). Dilute 1.0 mL of reference solution (a) to 10.0 mL with methanol R1.

Column:

- size: $l = 0.15$ m, $\varnothing = 4.6$ mm;
- stationary phase: end-capped octadecylsilyl silica gel for chromatography R (5 μ m);
- temperature: 30 °C.

Mobile phase:

- mobile phase A: dissolve 1.09 g of sodium hexanesulfonate R and 6.9 g of sodium dihydrogen phosphate monohydrate R in water R; adjust to pH 3.5 with phosphoric acid R and dilute to 1000.0 mL with the same solvent;
- mobile phase B: methanol R1;

| Time (min) | Mobile phase A (per cent V/V) | Mobile phase B (per cent V/V) |
|------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 0 - 10 | 80 | 20 |
| 10 - 14 | 80 \rightarrow 50 | 20 \rightarrow 50 |
| 14 - 35 | 50 | 50 |
| 35 - 36 | 50 \rightarrow 20 | 50 \rightarrow 80 |
| 36 - 55 | 20 | 80 |

Flow rate: 1.0 mL/min.

Detection: spectrophotometer at 210 nm for impurities A and C, and at 257 nm for impurity B.

Injection: 20 μ L.

Relative retention with reference to impurity A (retention time = about 10 min): impurity B = about 1.3; impurity C = about 2.4.

System suitability: at 210 nm:

- signal-to-noise ratio: minimum 10 for the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (c);
- symmetry factor: minimum 0.6 for the peak due to impurity A in the chromatogram obtained with reference solution (a).

Limits:

- correction factor: for the calculation of content, multiply the peak area of impurity C by 1.3;
- impurity A: not more than the area of the corresponding peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.5 per cent);
- impurity B: not more than the area of the corresponding peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.15 per cent);
- impurity C: not more than 0.1 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.05 per cent).

Amines and amine salts. Mix 10.0 g, while heating, with 20 mL of a mixture of 3 volumes of 1 M hydrochloric acid and 97 volumes of methanol R and add 100 mL of 2-propanol R. Pass a stream of nitrogen R slowly through the solution. Titrate with up to 12.0 mL of 0.1 M tetrabutylammonium hydroxide and record the potentiometric titration curve (2.2.20). If the curve shows 2 points of inflexion, the volume of titrant added

between the 2 points is not greater than 5.0 mL. If the curve shows no point of inflexion, the solution to be examined does not comply with the test. If the curve shows 1 point of inflexion, repeat the test but add 3.0 mL of a 25.0 g/L solution of *dimethyldecylamine R* in *2-propanol R* before the titration. If the titration curve after the addition of 12.0 mL of the titrant shows only 1 point of inflexion, the solution to be examined does not comply with the test.

Sulfated ash (2.4.14): maximum 0.1 per cent, determined on 1.0 g.

ASSAY

Determine the density (2.2.5) of the solution to be examined. Dilute 4.00 g to 100.0 mL with *water R*. Transfer 25.0 mL of the solution to a separating funnel, add 25 mL of *methylene chloride R*, 10 mL of 0.1 M *sodium hydroxide* and 10.0 mL of a freshly prepared 50 g/L solution of *potassium iodide R*. Shake well, allow to separate and discard the methylene chloride layer. Shake the aqueous layer with 3 quantities, each of 10 mL, of *methylene chloride R* and discard the methylene chloride layers. To the aqueous layer add 40 mL of *hydrochloric acid R*, allow to cool and titrate with 0.05 M *potassium iodate* until the deep-brown colour is almost discharged. Add 5 mL of *methylene chloride R* and continue the titration, shaking vigorously, until the methylene chloride layer no longer changes colour. Carry out a blank titration on a mixture of 10.0 mL of the freshly prepared 50 g/L solution of *potassium iodide R*, 20 mL of *water R* and 40 mL of *hydrochloric acid R*.

1 mL of 0.05 M *potassium iodate* is equivalent to $\frac{x}{10}$ mg of benzalkonium chloride where *x* is the average relative molecular mass of the sample.

LABELLING

The label states the content of ethanol (96 per cent), if any.

IMPURITIES

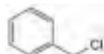
Specified impurities: A, B, C.



A. benzyl alcohol,



B. benzaldehyde,



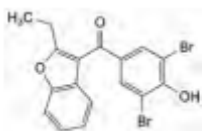
C. (chloromethyl)benzene.



01/2017:1393

BENZBROMARONE

Benzbromaronum



$C_{17}H_{12}Br_2O_3$
[3562-84-3]

M_r 424.1

DEFINITION

(3,5-Dibromo-4-hydroxyphenyl)(2-ethylbenzofuran-3-yl)-methanone.

Content: 98.0 per cent to 101.0 per cent (dried substance).

CHARACTERS

Appearance: white or almost white, crystalline powder.

Solubility: practically insoluble in water, freely soluble in acetone and in methylene chloride, sparingly soluble in ethanol (96 per cent).

mp: about 152 °C.

IDENTIFICATION

A. Infrared absorption spectrophotometry (2.2.24).

Comparison: *benzbromarone CRS*.

B. By means of a copper wire, previously ignited, introduce a small amount of the substance to be examined into the non-luminous part of a flame. The colour of the flame becomes green.

TESTS

Appearance of solution. The solution is clear (2.2.1) and not more intensely coloured than reference solution Y_2 (2.2.2, *Method II*).

Dissolve 1.25 g in *dimethylformamide R* and dilute to 25 mL with the same solvent.

Acidity or alkalinity. Shake 0.5 g with 10 mL of *carbon dioxide-free water R* for 1 min and filter. To 2.0 mL of the filtrate add 0.1 mL of *methyl red solution R* and 0.1 mL of 0.01 M *hydrochloric acid*. The solution is red. Add 0.3 mL of 0.01 M *sodium hydroxide*. The solution is yellow.

Related substances. Liquid chromatography (2.2.29).

Test solution. Dissolve 0.125 g of the substance to be examined in 30 mL of *methanol R* and dilute to 50.0 mL with the mobile phase.

Reference solution (a). Dilute 1.0 mL of the test solution to 100.0 mL with the mobile phase. Dilute 1.0 mL of this solution to 10.0 mL with the mobile phase.

Reference solution (b). Dissolve 10 mg of *benzarone CRS* (impurity C) in the mobile phase and dilute to 20 mL with the mobile phase. To 5 mL of this solution add 1 mL of the test solution and dilute to 100 mL with the mobile phase.

Column:

- size: $l = 0.25$ m, $\varnothing = 4.6$ mm;
- stationary phase: octadecylsilyl silica gel for chromatography R (5 μ m).

Mobile phase: *glacial acetic acid R*, *acetonitrile R*, *water R*, *methanol R* (5:25:300:990 V/V/V/V).

Flow rate: 1.5 mL/min.

Detection: spectrophotometer at 231 nm.

Injection: 20 μ L.

Run time: 2.5 times the retention time of benzbromarone.

Relative retention with reference to benzbromarone: impurity A = about 0.6; impurity B = about 2.

System suitability: reference solution (b):

- resolution: minimum 10.0 between the peaks due to impurity C (1st peak) and benzbromarone (2nd peak).

Limits:

- impurity A: not more than 4 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.4 per cent);
- impurity B: not more than 10 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (1.0 per cent);
- unspecified impurities: for each impurity, not more than the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.10 per cent);

Хроматограф рідинний “BISCHOFF CHROMATOGRAPHY”



До складу хроматографічна система входить:

- насос HPLC COMPACT PUMP 2250 B102208;
- насос HPLC COMPACT PUMP 2250 B102259;
- UV-VIS спектрометр DAD 4L 11013;
- рефрактометр 985 1151001006138;
- автосамплер 840 130481.

Ваги аналітичні Radwag AS 220.R2



Radwag AS 220.R2 – це аналітичні електронні ваги з рідкокристалічним дисплеєм. Вони призначені для точного вимірювання маси рідких та сипких матеріалів й предметів у лабораторних умовах.

Функції ваг:

- зважування;
- можливість зважування габаритних навісок із нижнього боку ваг;
- можливість вимірювання щільності твердих і рідких матеріалів;
- компенсація маси тари;
- автонуль;
- рахунок штук;
- контроль за відхиленням під час градування;
- звіт результатів калібрування;
- постійне передавання даних на комп'ютер;
- велика камера зважування;
- тарілка із системою проти перевантаження;
- пакет цифрових фільтрів — адаптація ваг до умов роботи на місці;
- можливість безперервної роботи.

| | |
|------------------------------------|-------------------------|
| Найбільша межа зважування, г | 220 |
| Дискретність, г | 0,0001 |
| Діаметр платформи, мм | 100 |
| Рівномірна температура, °С | +18 – +30 |
| Градування | внутрішня (автоматична) |
| Індикатор | рідкокристалічний |
| Живлення | 230 В 50 Гц / 11 В АС |
| Клас точності згідно ГОСТ 24104-88 | 2 |
| Клас точності згідно ДСТУ EN 45501 | 1 |

Мірний посуд класу А





KyivLvivPharma-2023

CERTIFICATE

THIS IS TO CERTIFY THAT

Yana Honchar


PARTICIPATED IN THE VI INTERNATIONAL SCIENTIFIC AND PRACTICAL
CONFERENCE

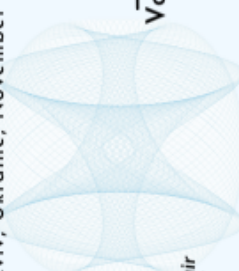
**"KYIVLVIVPHARMA-2023. PHARMACEUTICAL
TECHNOLOGY AND PHARMACOLOGY IN
ENSURING ACTIVE LONGEVITY"**

DURATION - 30 HOURS (1 ECTS CREDIT)

Held in Kyiv-Lviv, Ukraine, November 16-18, 2023

Kyiv-Lviv
November 16-18, 2023
UA N00195


Vladyslav STRASHNYI
Dr. Sci. (Pharm.), Professor, Co-chair
of the Organizing Committee of
conference




Volodymyr BESSARABOV
Dr. Sci. (Engin.), Professor,
Responsible secretary of
conference

SUMMARY

Honchar Yana

QUANTITATIVE DETERMINATION OF BENZALKONIUM CHLORIDE
IN EAR DROPS BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Department of analytical, physical and colloidal chemistry

Scientific supervisor: Tymoshchuk Olga

Keywords: benzalkonium chloride, ear drops, method of high-performance liquid chromatography, HPLC, quantitative analysis

Introduction. Benzalkonium chloride is an ammonium compound used in medicine and veterinary medicine primarily as a preservative or active ingredient in many ophthalmic, nasal, oral, and topical preparations, as well as in a variety of solutions, ointments, and creams. It is generally non-irritating and non-sensitizing and is well tolerated in solutions commonly used on the skin and mucous membranes. However, it is associated with side effects when used in some pharmaceutical formulations. Ultraviolet and visible absorption spectrophotometry, as well as chromatography, are used for benzalkonium chloride identification.

Materials and methods. The subject of research was benzalkonium chloride, and the object of research was its quantitative content in the investigated medicinal products. Empirical (observation, comparison, measurement, experiment), complex (abstraction, analysis and synthesis) and theoretical methods were used to achieve the research goal.

Results. High performance liquid chromatography is the primary chromatography method used in most laboratories around the world. Measurements of the studied samples were carried out using the chromatographic system "BISCHOFF CHROMATOGRAPHY" according to the instructions for its use.

Solutions of benzalkonium chloride with a concentration of 100, 150 and 200 µg/ml served as standards. The analysis of medicinal products was carried out with the help of working solutions, for the preparation of which 10 ml of the corresponding medicinal product was taken and brought to a total volume of 50 ml in a flask. In order to comply with the accuracy requirements, the measurement of the samples under study is also carried out six times.

Chromatographic analysis of each of these solutions was performed to obtain chromatograms of standard solutions and further determination of peaks. Three peaks are clearly visible on each of the chromatograms, which is due to the presence of homologues (C12, C14 and C16) of benzalkonium chloride in standard solutions. The calibration graph was constructed based on the results of comparing the concentrations of the standard solutions and the corresponding peak area. According to the results of the analysis of the working solutions of the studied drugs, the appropriate chromatograms were obtained, and the area of the peaks was also determined. The content of the tested substance in each of the medicines was estimated by the method of analyzing the peaks of the standard and the peaks of the analyzed solutions. Thus, the arithmetic mean content of benzalkonium chloride in the studied medicinal products ranged from 0.18 to 0.21 µg/ml. Such a relatively small amount of the tested substance in the analyzed medicinal products is explained by the fact that benzalkonium chloride is used as an auxiliary substance.

Conclusions. It has been experimentally proven that method of high-performance liquid chromatography is an effective method for the quantitative analysis of medicinal products. Validation of the studied technique was carried out in terms of specificity, linearity, reliability and correctness. It was established that the validation characteristics correspond to the acceptance criteria according to the State Pharmacopoeia of Ukraine, and therefore it is advisable to use the indicated method for the quantitative determination of benzalkonium chloride in the ear drops.