

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 БОРНОЇ КИСЛОТИ В ОЧНИХ КРАПЛЯХ
МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ
ХРОМОТОГРАФІЇ

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

Куриляк Ангеліна Юріївна

Керівник:

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

Тимощук Ольга Борисівна

Рецензент:

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

Головченко Оксана Іванівна

Київ – 2023

ЗМІСТ

	<i>ст.</i>
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	4
ОСНОВНА ЧАСТИНА	5
ВСТУП	5
Розділ 1. Властивості борної кислоти та її застосування	8
1.1. Фізико-хімічні властивості	9
1.2. Методи отримання	12
1.3. Сфери застосування	13
1.4. Фармакологічна дія	15
Розділ 2. Матеріали та методи	16
2.1. Об'єкт дослідження	16
2.2. Посуд та обладнання	17
2.3. Реактиви	18
2.4. Методика та умови методу високоефективної рідинної хроматографії	18
2.4.1. <i>Вимоги до стандартних розчинів</i>	22
2.4.2. <i>Вимоги до робочих розчинів</i>	22
2.4.3. <i>Вимоги до вимірювання зразка</i>	23
2.4.4. <i>Вимоги до розрахунку</i>	24
Розділ 3. Результати та їх обговорення	25
3.1. Умови хроматографування	25
3.2. Побудова калібрувального графіка	26
3.3. Результати визначення вмісту борної кислоти у досліджуваних лікарських засобах	28
3.4. Валідація методики	30

<i>3.4.1. Перевірка специфічності методики</i>	30
<i>3.4.2. Перевірка лінійності методики</i>	30
<i>3.4.3. Перевірка робастності методики</i>	31
<i>3.4.4. Перевірка правильності методики</i>	31
3.5. Порівняльний аналіз методик кількісного визначення	31
ВИСНОВКИ	33
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	34
ДОДАТКИ	38
SUMMARY	47

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

Борна кислота широко поширена в медицині, зокрема у фармації [1-6]. За своєю природою – слабка неорганічна кислота. Часто використовується як антисептик, пестицид (насамперед як інсектицид), антипірен, поглинач нейтронів або попередник інших сполук бору [7].

У медичних цілях використовується як антисептик для незначних опіків або порізів, для лікування прищів, профілактики мікозів стоп, а також іноді в мазях і перев'язувальних матеріалах. У дуже розведеному розчині застосовують для промивання очей, лікування деяких видів зовнішнього отиту. Розведена борна кислота також може слугувати для вагінального спринцювання для лікування бактеріального вагінозу через надмірну лужність, а також кандидозу [4-10]. У Великобританії борна кислота застосовується як консервант у пляшках із зразками сечі [6]. В цілому борна кислота є однією з найбільш використовуваних і вивчених боровмісних сполук з давніх часів. Незважаючи на те, що було досягнуто значного прогресу щодо фізіологічного, терапевтичного та пребіотичного значення цієї невеликої молекули, необхідні подальші дослідження для з'ясування механізмів, що діють у цих сферах [3-10].

Борна кислота досить швидко всмоктується та виводиться з організму із сечею із середнім періодом напіврозпаду один день [10]. Вона має низьку гостру токсичність при нанесенні на шкіру та помірно токсична при вдиханні. Немає доказів того, що борна кислота зазнає метаболізму в рослинах або тваринах, можливо, через велику кількість енергії, яка необхідна для розриву міцного ковалентного зв'язку B–O. Наявна інформація, що ця кислота здатна взаємодіяти з кістковими тканинами і при сильному впливі може спричинити смерть [3, 4, 8-10]. Таким чином, борна кислота потребує контролю її споживання.

Для кількісного визначення борної кислоти у лікарських засобах ДФУ рекомендує застосовувати метод титрування [1]/

З розвитком технологій все більшого поширення набуває метод високоефективної рідинної хроматографії, висока аналітична спроможність якого гармонійно доповнюється простотою обслуговування сучасного ВЕРХ обладнання, його повною автоматизацією та комп'ютеризацією.

Високоефективна 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) [11-14].

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.) [15].

Актуальність теми. Пошук нових перспективних методик кількісного визначення борної кислоти.

Мета і завдання досліджень. Метою досліджень було розробити методику кількісного визначення борної кислоти в очних краплях методом високоефективної рідинної хроматографії.

Для досягнення поставленої мети були передбачені наступні завдання:

- аналіз фармакопейних та аналітичних методик ідентифікації та кількісного визначення борної кислоти;
- розробити методику кількісного визначення борної кислоти в очних 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 борної кислоти в очних краплях.

Апробація результатів. Результати роботи були апробовані на VI міжнародній науково-практичній конференції «KYIVLVIVPHARMA-2023. Pharmaceutical technology and pharmacology in ensuring active longevity» (Додаток 6).

Публікації. Публікації відсутні.

Структура роботи. Робота написана згідно із затвердженням 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 – 48 ст.;
- основна частина складається зі вступу, 3-х розділів та висновків;
- кількість додатків – 6 додатків;
- кількість джерел використаної літератури – 36 посилань.

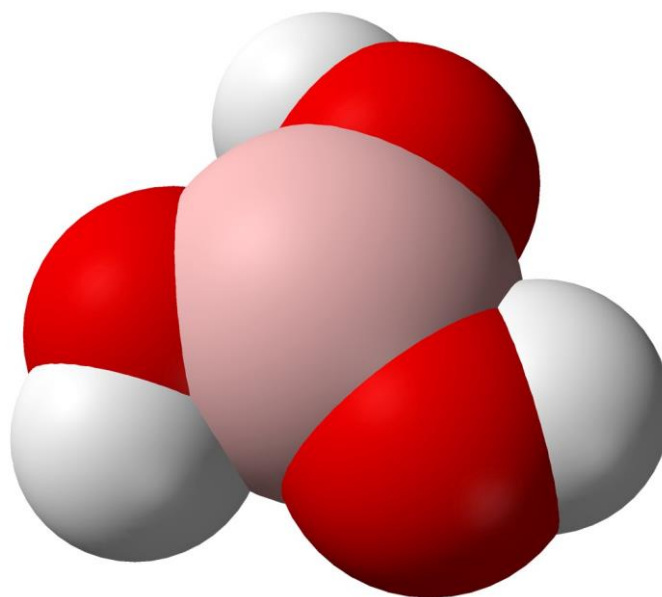
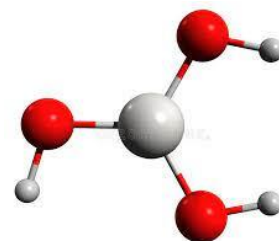
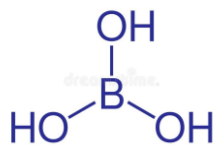
Розділ 1. Властивості борної кислоти та її застосування

Кислота борна (ДФУ) має відома людині протягом тривалого часу та широко поширена у різних сферах діяльності. Тому вона має низку синонімічних назв, а саме: *Acidum boricum* (Ph Eur), *Boric acid* (BP, JP, USP), *Orthoboric acid* (CAS № 10043–35–3), *Metaboric acid* (CAS № 13460–50–9), *Boracic acid*, *Boraic acid*, *Borofax*, *Boron trihydroxide*, *E284*, *Trihydroxyborene* тощо [1-10].

Борна кислота



або



Вона є слабкою кислотою і, діючи як кислота Льюїса, вона утворює комплекси з аміно- та гідроксикислотами, вуглеводами, нуклеотидами та вітамінами через електрондонорно-акцепторні взаємодії. Вважається, що ці взаємодії корисні для здоров'я людини. Тому синтетичні біс-хелатні

комплекси борної кислоти з органічними біомолекулами розглядаються як харчові та/або фармацевтичні компоненти [10].

У біологічних системах неорганічний бор присутній у вигляді недисоційованої борної кислоти або борат-іона $B(OH)_4^-$ [18, 19]. У водних розчинах ці дві форми знаходяться в хімічній рівновазі і можуть взаємоперетворюватися менш ніж за секунду на користь однієї форми над іншою залежно від рН середовища [4].

Борна кислота має значне природне поширення – вона міститься в овочах, більшості фруктів, злаках і горіхах. Проте, ми не спроможні визначити її вміст, оскільки кристали борної кислоти не мають запаху та позбавлені смаку [16, 17]. В природі зустрічається у вигляді мінералу – сассоліт [3].

Бор був прийнятий як необхідна поживна речовина для рослин майже століття тому, але його точна біологічна функція у тварин і людей все ще належить з'ясувати. Дослідження щодо потреби бору як поживної речовини та його ролі в метаболізмі тварин і людини викликають зростаючий інтерес і показують актуальність цього питання [20, 21].

1.1. Фізико-хімічні властивості

За стандартних умов борна кислота є слабкою одноосновною неорганічною кислотою Льюїса бору з хімічною формулою H_3BO_3 [3-8].

Це тверда речовина у формі безбарвних кристалів або білого порошку яка не має запаху [4-6]. Три атоми кисню утворюють тригональну планарну геометрію навколо бору. Довжина зв'язку В-О становить 136 пм, а О-Н – 97 пм. Молекулярна точкова група – C_{3h} [22]. Відомі дві кристалічні форми кислоти: триклінна і гексагональна. Перша є найбільш поширеною, а друга, яка є термодинамічно стабільнішою, може бути отримана за спеціальних умов [23].

Середня молекулярна маса – 61,833 г/моль (моноізотопна – 62.017524428 г/моль) [4-6]. Температура плавлення 170,9 °С, а кипіння –

300 °C [3-8]. За рахунок високої густини (1,435 г/см³) тоне у воді та змішується з нею; відносно погано розчинна [3-6].

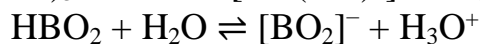
Нагрівання борної кислоти призводить до втрати нею води і поступового перетворення, спочатку у метаборну кислоту, потім у тетраборну а насамкінець зневоднюється до борного ангідриду [3-6]:



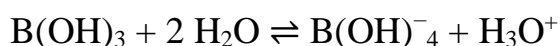
Водні розчини борної кислоти є сумішшю поліборних кислот загальної формули $\text{H}_{3m-2n}\text{B}_m\text{O}_{3m-n}$ [3-8]. При розчиненні у воді вона частково дисоціює з утворенням метаборної кислоти:



Водний розчин виявляє слабкі кислотні властивості [24-28]:



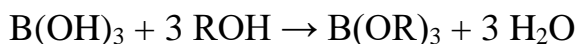
Однак спектроскопія комбінаційного розсіювання сильно лужних розчинів показала присутність іонів $[\text{B(OH)}_4]^-$. Це змусило зробити припущення, що її кислотні властивості обумовлені не відщепленням катіону H^+ , а приєднанням гідроксильного аніону: дійти висновку, що кислотність є виключно результатом абстракції OH^- з води [27]:



Вступає в реакцію з безводною сульфатною кислотою [22]:

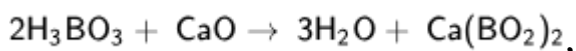


Реагує зі спиртами з утворенням боратних ефірів, B(OR)_3 , де R означає алкіл або арил. Реакцію зазвичай запускає дегідратуючий агент, такий як концентрована сульфатна кислота [29]:



Кислотність розчинів борної кислоти значно підвищується в присутності цис-віцінальних діолів (органічних сполук, що містять однаково орієнтовані гідроксильні групи в сусідніх атомах вуглецю, $(\text{R}_1, \text{R}_2)=\text{C(OH)}-\text{C(OH)}=(\text{R}_3, \text{R}_4)$), таких як гліцерин і маніт [24-29]. Тетрагідроксиборат-аніон, що утворюється під час розчинення, спонтанно реагує з цими діолами з утворенням відносно стабільних аніонних ефірів, що містять одне або два п'ятичленних кільця $-\text{B}-\text{O}-\text{C}-\text{C}-\text{O}-$.

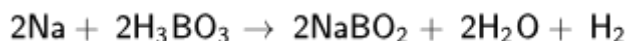
При нагріванні борна кислота розчиняє оксиди металів, утворюючи відповідні солі. За надлишку оксиду утворюється метаборат кальцію:



а за нестачі оксиду утворюється тетраборат кальцію:



З металами взаємодіє при нагріванні:



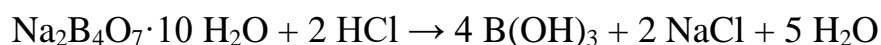
Комплексоутворення борної кислоти з цукрами має особливе значення для розуміння ролі бору як переносника нуклеотидів і вуглеводів [10].

Існує декілька методів ідентифікації борної кислоти, але до ДФУ внесено лише два [1]. З-поміж них метод спалювання, коли досліджувана субстанція надає полум'ю зеленої облямівки, є найбільш доступним.

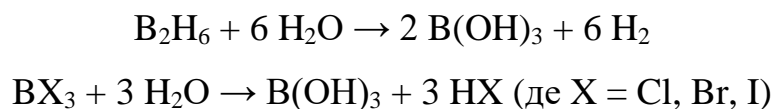
Для кількісного визначення в ДФУ [1] зазначено лише метод прямого титрування 1 М розчином натрій гідроксиду.

1.2. Методи отримання

Борна кислота була вперше отримана Вільгельмом Гомбергом у 1702 році з бури шляхом дії мінеральних кислот і отримала назву «заспокійлива сіль Гомберга» («sal sedativum Hombergi»). Проте згадки про її використання сягають часів стародавніх греків, коли вона використовувалась для очищення продуктів харчування, їх консервування їжі та інших видів діяльності [16]:



Також утворюється як побічний продукт гідролізу тригалогенідів бору та диборану [30]:



Промислове виробництво борної кислоти базується на реакції натрій борату або рафінованого кальцій борату (колеманіту) з сульфатною кислотою у водному середовищі [3].

1.3. Сфери застосування

Борна кислота зазвичай використовується в промисловій переробці та виробництві, але також використовується як добавка до фармацевтичних продуктів, косметики, лосьйонів, мила, рідини для полоскання рота, зубної пасти, в'яжучих засобів і засобів для промивання очей. Відомо, що вона виявляє певну антибактеріальну дію проти інфекцій, таких як бактеріальний вагіноз і кандидоз [8, 17].

Так, борна кислота часто входить до складу гомеопатичних препаратів, які використовуються для лікування вагінальних виділень і свербіння. Цей препарат є комбінацією дружніх бактерій, вітаміну Е та невеликої кількості борної кислоти [17].

Зазвичай її використовують у розведених розчинах для лікування пелюшкового висипу, укусів та сонячних опіків [4].

Використовується як ефективний пестицид від тарганів, щурів і мух [17].

Борну кислоту називають хімічною речовиною для басейну, оскільки вона виявилася дуже корисною для обслуговування. Це може допомогти стабілізувати рівень рН води та запобігти проблемам з водоростями. Цей продукт зменшує кількість необхідного хлору в басейні. Суміш може допомогти зберегти воду чистою та блискучою. Вона також використовується для очищення води басейну від грибків [6, 7].

Вона є корисною для лікування різних типів вушних інфекцій у людей і домашніх тварин (зовнішній отит, також званий вухом плавця, є інфекцією зовнішнього слухового проходу). Проте, застосування борної кислоти дітям не рекомендується [4, 8].

Використовується для усунення неприємного запаху ніг. Людина, яка страждає від сильного запаху ніг, може нанести на внутрішню сторону взуття порошок борної кислоти, змішаної з тальком [8].

Борна кислота при змішуванні з дистильованою водою служить спреєм для ран. Розчин має антисептичні властивості, які допомагають у лікуванні

незначних ран, таких як порізи та опіки. Проте є обмеження, оскільки не можна використовувати занадто часто [17].

Пляшки для зразків сечі часто містять борну кислоту як консервант, який підтримує якість зразка під час його транспортування до лабораторії. Прозорі пляшки, як правило, мають невелику кількість порошку борної кислоти на дні. Дослідження показують, що додавання цієї речовини знижує хибнопозитивні результати. Також застосовується для зберігання лейкоцитів в сечі для аналізу [4, 5].

Борна кислота допомагає позбутися від стійких плям на одязі, додаючи її в звичайний пральний порошок під час прання. Вона використовується для видалення бруду та запаху з кухні та ванної кімнати [17].

Завдяки своїм вогнезахисним властивостям борна кислота широко використовується у виробництві меблів, матраців та ізоляції. Борна кислота допомагає захистити деревину від грибків і комах [6].

Має застосування для промислового виробництва скловолокна, побутових скляних виробів і скла, що використовується в рідкокристалічних дисплеях. Щоб виготовити скло з кращою хімічною та високотемпературною стійкістю, на скляні вироби наносять борну кислоту [5, 6, 9, 17].

Борна кислота служить чудовим очисником для всіх типів проблем з цвіллю та комах, таких як мурахи, таргани, товстолибики, блохи та інші [6, 17].

Використовується у виробництві шкіри, а також у ювелірній промисловості в поєднанні з денатурованим спиртом [4-6, 17]. Також набула значення для зварювання флюсу ковалями [17].

Суміш борної кислоти з нафтою або рослинною олією працює як чудове мастило, яке можна використовувати на керамічних або металевих поверхнях. Виробники використовують борну кислоту в різних продуктах, таких як емалі, глазури та фарби [5, 7].

Борна кислота широко використовується для лікування дефіциту бору у рослин [7].

1.4. Фармакологічна дія

Борна кислота не отруйна у дуже малих кількостях, які зустрічаються в природі. Однак вона стає отруйною при ковтанні або вдиханні у великих кількостях. Згідно з даними Агентства з реєстру токсичних речовин і захворювань, мінімальна смертельна доза бору (у вигляді борної кислоти), що проковтнула, становила 2-3 г у немовлят, 5-6 г у дітей і 15-20 г у дорослих [31].

Довготривалий вплив борної кислоти та її високі концентрації можуть призвести до репродуктивних проблем, можливого пошкодження нирок, ендокринних збоїв, підвищення рівня печінкових ферментів, болю в животі, алергічної реакції, відчуття печіння, подразнення, стимуляції та пригніченні центральної нервової системи, діареї, висипу та блювоти [17].

Стверджується, що борна кислота має протигрибкові та антимікробні властивості, подразнює шкіру та може викликати серйозні реакції [17].

Недисоційована борна кислота не накопичується в м'яких тканинах, але накопичується в кістках. Борна кислота досить швидко всмоктується та виводиться з організму з сечею із середнім періодом напіврозпаду 1 день [32].

Відсутні докази того, що борна кислота метаболізується в рослинах або тваринах, можливо, через велику кількість енергії, необхідну для розриву міцного ковалентного зв'язку B–O [17, 32].

Є припущення, що бор можливо має позитивний вплив на метаболізм мінералів (Ca, Mg, P) і вітаміну (D), залучених до формування кісткової тканини, а також рівень естрогену і, можливо, тестостерону в сироватці крові, таким чином запобігаючи або лікуючи остеопороз, підвищуючи когнітивні та психомоторні функції [32].

Борна кислота є відомим інгібітором кількох серинових протеаз, уреаз та гістондеацетилаз. Дослідження показали, що вона може відігравати захисну роль проти раку простати та молочної залози [32].

При фізіологічному рН борна кислота проникає в клітину і гідролізується у вигляді боратного аніону, знижуючи внутрішньоклітинний рН, що призводить до інгібування клітини, а потім до апоптозу [33].

Розділ 2. Матеріали та методи

Мета досліджень полягала у розробці альтернативної методики кількісного визначення борної кислоти в очних 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 [34] і у своєму складі містять борну кислоту.

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

ЛЗ №1 – це протимікробний препарат, який чинить антимікробну дію при місцевому застосуванні щодо більшості грампозитивних та грамнегативних бактерій, у тому числі синьогнійної палички. Основні фізико-хімічні властивості – прозора безбарвна рідина.

Протипоказаннями його застосування є підвищена чутливість до будь-яких інгредієнтів лікарського засобу; порушення функцій нирок. Щодо цього лікарського засобу немає відомих досліджень взаємодії з діючими речовинами, присутніми в лікарському засобі. У разі тривалого застосування препарату (понад один місяць) можуть виникати симптоми хронічної інтоксикації: місцевий набряк тканин, запаморочення, стоматит, екзема, порушення менструального циклу у жінок, анемія, міалгія, судоми, гарячка, порушення функції нирок, електролітний дисбаланс, дегідратація.

ЛЗ №2 – це стерильний розчин для офтальмологічного застосування з фізіологічним рН від втоми і сухості очей, який використовується в офтальмології при захворюваннях передньої поверхні ока як бактеріостатичний і протизапальний засіб, ретинопатії і увеопатії, для промивання очей після впливу факторів забрудненого навколишнього

середовища, гіперінсоляції, морської солі і води, для промивання очей в комплексному лікуванні гострих респіраторних захворювань верхніх дихальних шляхів тощо. Основні фізико-хімічні властивості – розчин.

Протипоказанням його застосування є підвищена чутливість до будь-яких інгредієнтів лікарського засобу. Продукт призначений тільки для офтальмологічного застосування одним пацієнтом із дотриманням умов тимчасового зберігання.

ЛЗ №3 – це засіб від втоми і сухості очей, який використовується в офтальмології у випадку діабетичної ретинопатії, макулодистрофії, ангіопатії та нейропатії різного генезу, для профілактики прогресування катаракти. Основні фізико-хімічні властивості – ізотонічний стерильний розчин з рН 7,0-7,4; без консервантів.

Протипоказанням його застосування є підвищена чутливість до будь-яких інгредієнтів лікарського засобу. Може спричиняти помірне короткочасне печіння та нечіткість бачення.

2.2. Посуд та обладнання

Аналіз досліджуваних лікарських засобів здійснювали за допомогою наступного обладнання:

- хроматографічна система “BISCHOFF CHROMATOGRAPHY” (Додаток 3);
- 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 4);
- колби мірні, циліндри і піпетки класу точності А (Додаток 5);
- колба грушоподібна для відгону розчинників.

2.3. Реактиви

Для аналізу досліджуваних лікарських засобів були використані наступні реактиви:

- борна кислота (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 [11, 12].

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 [11-15].

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 [11-15].

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 [11].

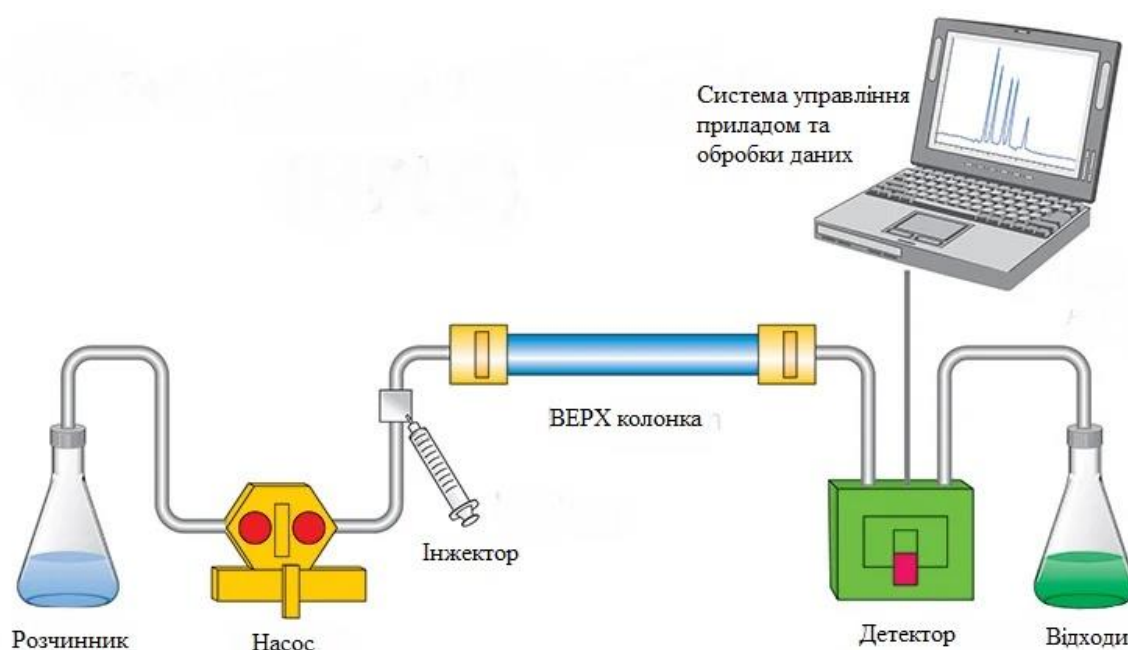


Рис. 1. Схема розташування функціональних блоків рідинного хроматографа

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

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

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

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 [11-15].

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 [11-15].

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) [11-15].

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 [11-15].

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 [11-15].

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) [11-13]. 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 [11-15].

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 [2, 12, 14]. 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 [12-15].

2.4.1. Вимоги до стандартних розчинів

Визначення вмісту борної кислоти у досліджуваних розчинах здійснюється із використанням стандартних розчинів.

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

2.4.2. Вимоги до робочих розчинів

Аналіз вмісту борної кислоти 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 3) 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 борної кислоти у досліджуваних лікарських засобах здійснювали із дотриманням зазначених у таблиці 1 умов хроматографування.

Таблиця 1. Умови визначення вмісту борної кислоти у досліджуваних лікарських засобах методом високоефективної рідинної хроматографії

Рухома фаза А	ацетонітрил
Рухома фаза В	0,6М етилацетат
рН рухомої фази	5,8
Швидкість рухомої фази	1,0 мл/хв.
Об'єм інжекції	50 мкл
Довжина хвилі детектування	555 нм
Температура термостату колонки	30 °С

Для хроматографічних вимірювань використовували двокомпонентну ацетонітрил-ацетатну рухому фазу із рН 5,8 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 борної кислоти. Так, виявило, що для проведення аналітичних досліджень хроматограф доцільно налаштовувати на параметри довжини хвилі – 555 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 борної кислоти 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.

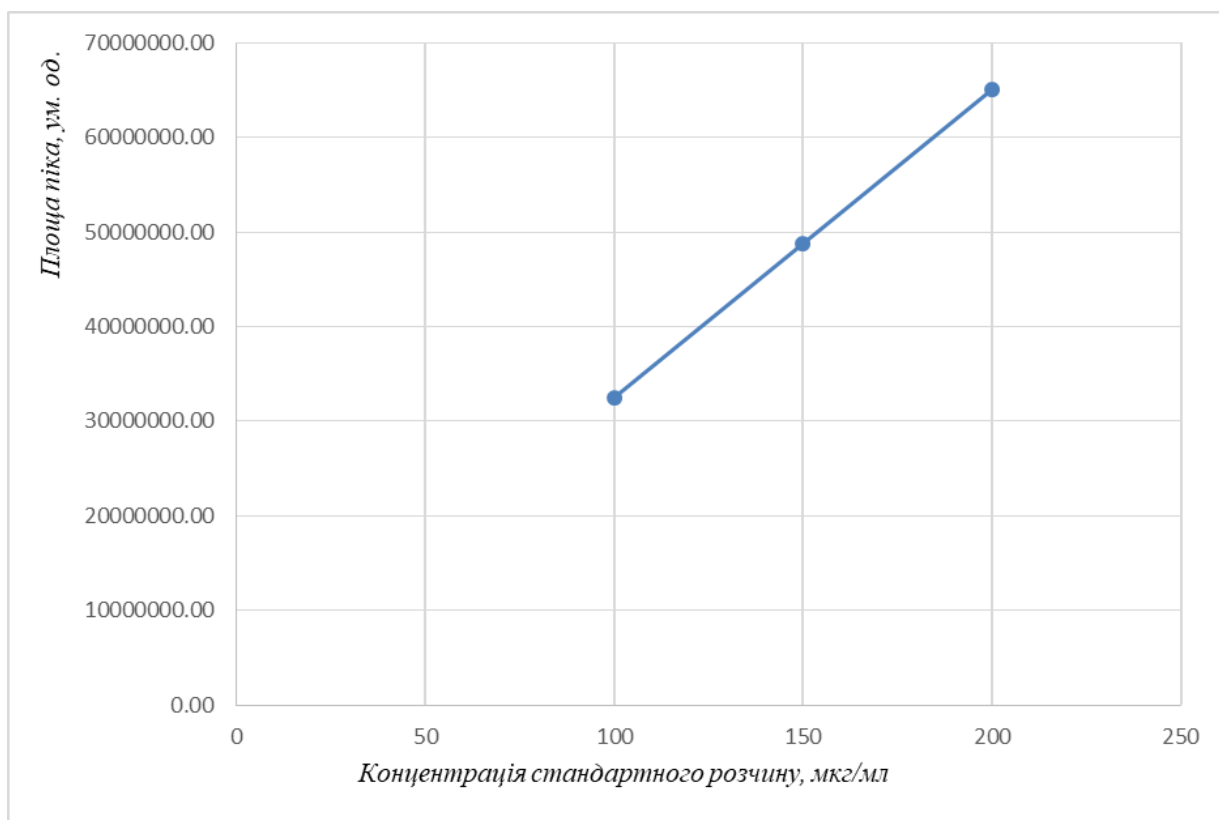
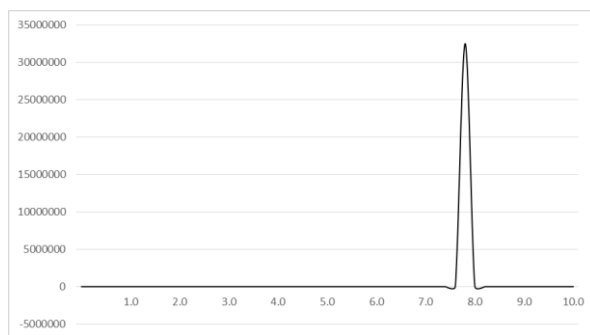


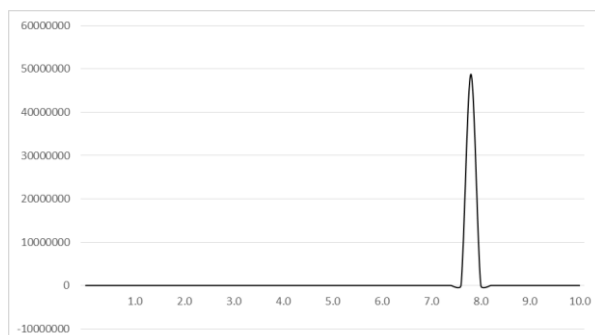
Рис. 2 Калібрувальний графік залежності площі піків стандартних розчинів борної кислоти від їх концентрації

На кожній з хроматограм чітко простежується пік, що вказує вміст борної кислоти у стандартних розчинах.

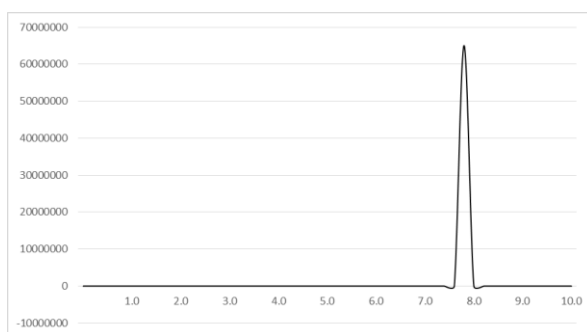
Калібрувальний графік (Рис. 2) був побудований за результатами співставлення концентрацій стандартних розчинів та відповідної площі піка.



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 борної кислоти

Аналіз отриманих даних вказує, що залежність площі піків стандартних розчинів борної кислоти від її концентрації є лінійною з рівнянням регресії, яке дорівнює $y = 325153x + 2836,5$ з коефіцієнтом кореляції $R^2 = 0,9998$. Таким чином, отриманий калібрувальний графік відповідає належним вимогам для вимірювання кількості борної кислоти у досліджуваних розчинах.

3.3. Результати визначення вмісту борної кислоти 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 борна кислота формувала чіткий пік, як і у хроматограмах стандартних розчинів.

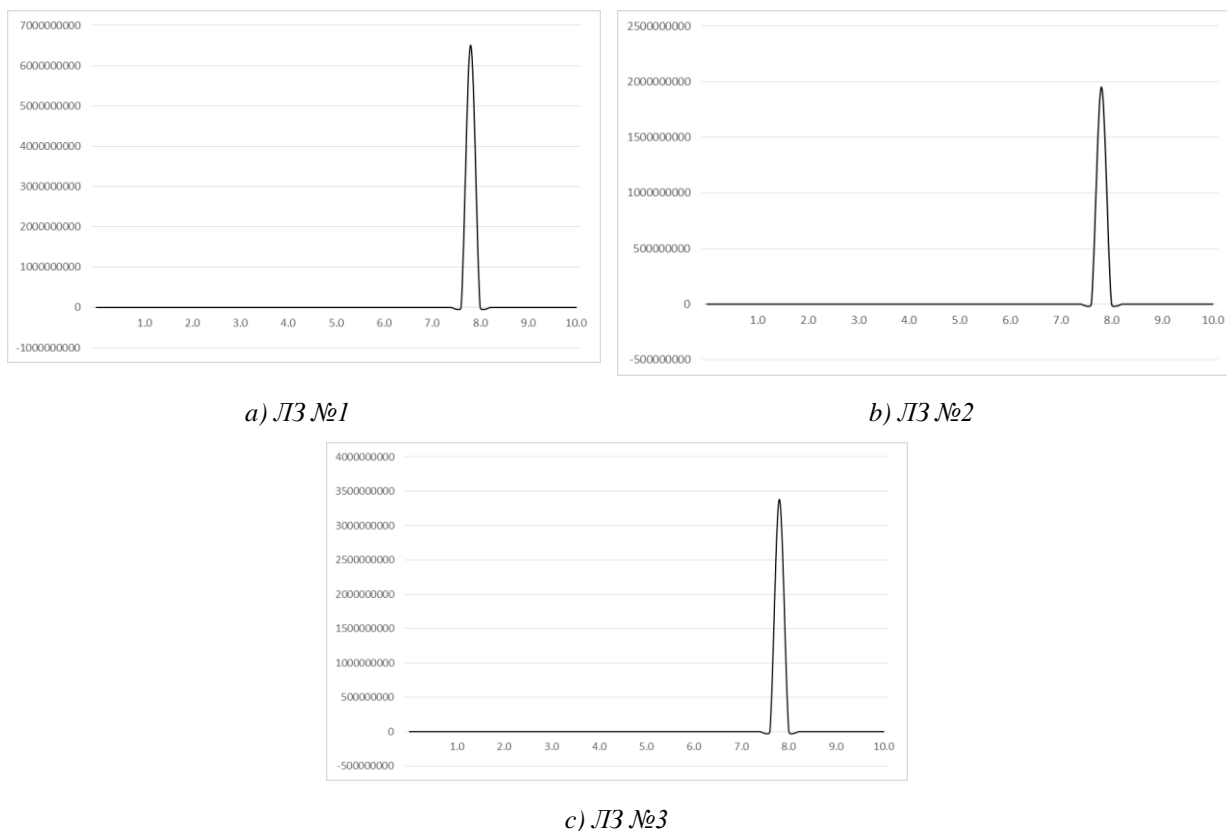


Рис. 4 Хроматограми досліджуваних лікарських засобів

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) борної кислоти у досліджуваних лікарських засобах

Повторення	ЛЗ №1	ЛЗ №2	ЛЗ №3
1	6497327135.08	1953207315.72	3388106986.61
2	6509728475.91	1949365952.59	3384962104.16
3	6506626514.93	1949912210.43	3384647615.91
4	6500468114.43	1952785916.82	3381269403.47
5	6501983328.07	1954855843.83	3380522071.19
6	6502243450.58	1945397779.61	3370056037.65
<i>Середнє</i>	6503062837	1950920837	3381594037
<i>Вміст</i>	20000	6000	10400

Як видно із Табл. 3, середньоарифметичний вміст борної кислоти у досліджуваних лікарських засобах коливався від 6 до 20 мг/мл. Така значна кількість досліджуваної речовини у аналізованих лікарських засобах пояснюється тим, що борна кислота застосовується як діюча 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 [35, 36].

3.4.1. Перевірка специфічності методики

Здатність визначити досліджувану речовину у присутності інших компонентів характеризує її специфічність [35].

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 [35].

Аналіз досліджуваної методики кількісного визначення вказав на її однозначну лінійність (Рис. 2). Ознакою лінійності є значення коефіцієнту кореляції ($R^2 = 0.9998$, що задовольняє вимогам ДФУ) та лінійна функція, яка описується рівнянням: $y = 325153x + 2836,5$.

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 ДФУ [1] та Ph Eur [2] кількісно борну кислоту у субстанції визначають методом прямої алкаліметрії. Алкаліметрія – це метод кількісного визначення кислот, а також солей слабких кислот титруванням їх розчинів лугом певної концентрації [1-3]. Для титрування розчину борної кислоти

застосовують 0,1 М NaOH із розрахунком, що 1 мл 1 М NaOH відповідає 61,8 мг борної кислоти [1, 2].

Алкаліметричний метод кількісного визначення борної кислоти має низку недоліків, а саме:

- похибка титрування може коливатися від 5% до 10%;
- стандартизація титранту;
- присутність індикатора;
- часто відбувається порушення стехіометричності.

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 борної кислоти у досліджуваних лікарських засобах за допомогою методу високоефективної рідинної хроматографії. Було встановлено, що у лікарському засобі ЛЗ №1 кількість борної кислоти становила 20 мг/мл, ЛЗ №2 – 6 мг/мл, а у ЛЗ №3 – 10,4 мг/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 борної кислоти в очних краплях.

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

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Державна фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – друге вид. – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. – Т. 2. – 724 с.
2. European pharmacopoeia. Tenth edition. Strasbourg. 2019.
3. Кислота борна. Фармацевтична енциклопедія [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу:
<https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3497/kislota-borna>.
4. Boric acid. National Library of Medicine [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Boric-Acid>.
5. Boric acid basic information. Chemical book [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу:
https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB8874759_EN.htm.
6. Boric acid. ScienceDirect [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.sciencedirect.com/topics/earth-and-planetary-sciences/boric-acid>.
7. United States Environmental Protection Agency [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу:
https://search.epa.gov/epasearch/?querytext=boric+acid&areaname=&areacontacts=&areasearchurl=&typeofsearch=epa&result_template=#/.
8. DRUGBANK online [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <https://go.drugbank.com/drugs/DB11326>.
9. Boric acid [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_version=2&p_card_id=0991&p_lang=en.
10. Birgul Zumreoglu-Karan, Dursun Ali Kose. Boric acid: a simple molecule of physiologic, therapeutic and prebiotic significance. Pure and Applied Chemistry.

De Gruyter, January 6, 2015 [Электронный ресурс]. – Режим доступа до ресурсу: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/pac-2014-0909/html>.

11. What is HPLC? Chemistry Europe [Электронный ресурс]. – Режим доступа до ресурсу:

https://www.chemistryviews.org/details/education/9464911/What_is_HPLC/.

12. Kazakevich, Yuri; LoBrutto, Rosario, eds. (2007). HPLC for pharmaceutical scientists. Hoboken, NJ: Wiley-Interscience.

13. Levin, Shulamit (January 2004). “Reversed Phase Stationary Phases in Pharmaceutical Sciences”. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. 27 (7–9): 1353–1376 [Электронный ресурс]. – Режим доступа до ресурсу: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/JLC-120030606>.

14. Bayne, Shirley; Carlin, Michelle (2017). Forensic Applications of High Performance Liquid Chromatography (1st ed.). CRC Press.

15. 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 [Электронный ресурс]. – Режим доступа до ресурсу: <https://www.chromatographyonline.com/view/ten-common-sense-corollaries-pharmaceutical-analysis-high-performance-liquid-chromatography>.

16. Ronald Eisler (2007). Eisler's Encyclopedia of Environmentally Hazardous Priority Chemicals. Elsevier. 986 p.

17. What Is Boric Acid Used For? MedicineNet [Электронный ресурс]. – Режим доступа до ресурсу:

https://www.medicinenet.com/what_is_boric_acid_used_for/article.htm.

18. W.W. Ku, R.E. Chapin, R.F. Moseman, R.E. Brink, K.D. Pierce, K.Y. Adams. Toxicol. Appl. Pharmacol. 111, 145 (1991).

19. C.D. Hunt. “Boron” in Encyclopedia of Dietary Supplements, P.M. Coates, M.R. Blackman, G.M. Cragg, M. Levine, J. Moss, J.D. White (Eds.), 2nd. Ed., pp 55–63, CRC Press, New York, USA, (2004).

20. Sathya S., Pitchai G. James, Indirani R. Boron nutrition of crops in relation to yield and quality. *Agricultural reviews*, 2009. Volume 30, Issue 2. P. 139-144.
21. Erhui Jin, Youfang Gu, Jue Wang, Guangming Jin, Shenghe Li. Effect of Supplementation of Drinking Water with Different Levels of Boron on Performance and Immune Organ Parameters of Broilers. *Italian Journal of Animal Science*. Volume 13, 2014 [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4081/ijas.2014.3152>.
22. Greenwood, Norman N.; Earnshaw, Alan (1997). *Chemistry of the Elements* (2nd ed.). Butterworth-Heinemann. p. 1291.
23. Andrei Rotaru (2017): "Thermal and kinetic study of hexagonal boric acid versus triclinic boric acid in air flow." *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, Volume 127, pages 755–763.
24. Levitin Ye. Ya. *General and inorganic chemistry: Textbook for students of higher schools* / Ye. Ya. Levitin, I.A. Vedernikova. – Kharkiv: Publishing House of NUPH : Golden Pages, 2009. – 360 p.
25. Strohfeldt, A. Katja. *Essentials of inorganic chemistry : for students of pharmacy, pharmaceutical sciences and medicinal chemistry*. School of Pharmacy, University of Reading, UK. 2015 John Wiley & Sons.
26. F. Albert Cotton, Geoffrey Wilkinson, Carlos A. Murillo, and Manfred Bochmann *Advanced inorganic chemistry*. 6-th editioin, 1999.
27. Jolly, W. L. (1984). *Modern Inorganic Chemistry*. McGraw-Hill. p. 198.
28. Загальна та неорганічна хімія: підруч. для студентів вищ. навч. закл. / Є.Я. Левітін, А.М. Бризицька, Р.Г. Ключова; за заг. ред. Є.Я. Левітіна. – 3-тє вид. – Харків: НФаУ: Золоті сторінки, 2017. – 512 с.
29. Brown, Herbert C.; Mead, Edward J.; Shoaf, Charles J. (1956). "Convenient procedures for the preparation of alkyl borate esters". *J. Am. Chem. Soc.* 78 (15): 3613–3614.
30. Housecroft, C. E.; Sharpe, A. G. (2008). "Chapter 13: The Group 13 Elements". *Inorganic Chemistry* (3rd ed.). Pearson. p. 340.

31. Toxicological Profile for Boron. Centers for Disease Control. November 2010. p. 11.

32. Boric acid: a simple molecule of physiologic, therapeutic and prebiotic significance [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу:

<https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/pac-2014-0909/html>.

33. M. Park, Q. Li, N. Shcheynikov, S. Muallen, W. Zeng. Cell Cycle (2005).

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

35. 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.

36. 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 Державної фармакопеї України [1]

Борна кислота

- домішки *A, B*: площа піка кожної домішки не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а) (0.1 %);
- домішки *C, E*: площа піка кожної домішки не має перевищувати 5 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а) (0.5 %);
- домішка *D*: площа піка не має перевищувати 2 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а) (0.2 %);
- домішка *F*: площа піка не має перевищувати 3 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а) (0.3 %);
- неспецифіковані домішки: площа піка кожної домішки не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а) (0.10 %);
- сума домішок: сума площ піків не має перевищувати 10 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а) (1.0 %);
- не враховують: піки, площа яких становить менше 0.5 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (а) (0.05 %).

Втрата в масі при висушуванні (2.2.32). Не більше 0.5 %. 0.500 г субстанції сушать при температурі 105 °С.

Сульфатна зола (2.4.14). Не більше 0.1 %. Визначення проводять з 1.0 г субстанції.

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

0.300 г субстанції розчиняють у 60 мл оцтової кислоти безводної *P* і титрують 0.1 *M* розчином хлорної кислоти потенціометрично (2.2.20).

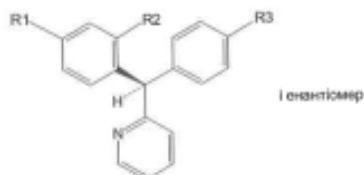
1 мл 0.1 *M* розчину хлорної кислоти відповідає 36.14 мг $C_{12}H_{19}NO_6$.

ЗБЕРІГАННЯ

У захищеному від світла місці.

ДОМІШКИ

Специфіковані домішки: *A, B, C, D, E, F*.



A. $R_1 = R_3 = OH, R_2 = H$: 4,4'-(піридин-2-ілметилен)-дифенол,

B. $R_1 = H, R_2 = R_3 = OH$: 2-[(*RS*)-(4-гідроксифеніл)-(піридин-2-іл)метил]фенол,

C. $R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = O-CO-CH_3$: 4-[(*RS*)-(4-гідроксифеніл)(піридин-2-іл)метил]фенілацетат,

E. $R_1 = H, R_2 = R_3 = O-CO-CH_3$: 2-[(*RS*)-[4-(ацетилокси)-феніл](піридин-2-іл)метил]фенілацетат,

D. невідома структура,

F. невідома структура.

БОРНА КИСЛОТА

Acidum boricum

BORIC ACID

H_2BO_3
[10043-35-3]

М.м. 61.8

Вміст: не менше 99.0 % і не більше 100.5 %.

ВЛАСТИВОСТІ

Опис. Кристалічний порошок білого або майже білого кольору або безбарвні, блискучі, жирні на дотик пластинки, або кристали білого або майже білого кольору.

Розчинність. Розчинна у воді *P*, етанолі (96 %) *P*, легко розчинна у киплячій воді *P* і гліцерині (85 %) *P*.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

A. 0.1 г субстанції, обережно нагріваючи, розчиняють у 5 мл метанолу *P*, додають 0.1 мл сірчаної кислоти *P* і спалюють; полум'я має зелену облямівку.

B. Розчин *S*, приготований як зазначено в розділі «Випробування», є кислотою (2.2.4).

ВИПРОБУВАННЯ

Розчин S. 3.3 г субстанції розчиняють у 80 мл киплячої води дистильованої *P*, охолоджують і доводять об'єм розчину водою, вільною від вуглецю діоксиду, *P* до 100 мл.

Прозорість розчину (2.2.1). Розчин *S* має бути прозорим.

Кольоровість розчину (2.2.2, метод *II*). Розчин *S* має бути безбарвним.

Бромгексину гідрохлорид

pH (2.2.3). Від 3.8 до 4.8. Вимірюють pH розчину S.

Розчинність в етанолі (96 %). 1.0 г субстанції розчиняють у 10 мл киплячого етанолу (96 %) P. Одержаний розчин за ступенем каламутності не має перевищувати еталон II (2.2.1) і має бути безбарвним (2.2.2, метод II).

Органічні речовини. Субстанція не має темніти при прожарюванні до слабого почервоніння.

Сульфати (2.4.13). Не більше 0.045 % (450 ppm).

10 мл розчину S доводять водою дистильованою P до об'єму 15 мл.

Важкі метали (2.4.8, метод A). Не більше 0.0015 % (15 ppm).

12 мл розчину S мають витримувати випробування на важкі метали. Еталон готують із використанням суміші 2.5 мл свинцю еталонного розчину (2 ppm Pb) P і 7.5 мл води P.

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

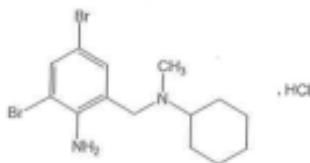
1.000 г субстанції розчиняють при нагріванні в 100 мл води P, що містить 15 г маніту P, і титрують 1 M розчином натрію гідроксиду до рожевого забарвлення, використовуючи як індикатор 0.5 мл фенолфталеїну розчину P.

1 мл 1 M розчину натрію гідроксиду відповідає 61.8 мг H_2BO_3 .

БРОМГЕКСИНУ ГІДРОХЛОРИД

Bromhexini hydrochloridum

BROMHEXINE HYDROCHLORIDE



$C_{14}H_{21}Br_2ClN_2$
[611-75-6]

М.м. 412.6

N-(2-Аміно-3,5-дибромбензил)-*N*-метилциклогексанаміну гідрохлорид.

Вміст: не менше 98.5 % і не більше 101.5 %, у перерахунку на суху речовину.

ВЛАСТИВОСТІ

Опис. Кристалічний порошок білого або майже білого кольору.

Розчинність. Дуже мало розчинний у воді P, мало розчинний в етанолі (96 %) P і метилхлориді P.

Виявляє поліморфізм (5.9).

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Перша ідентифікація: А, Е.

Друга ідентифікація: В, С, D, Е.

А. Абсорбційна спектроскопометрія в інфрачервоній області (2.2.24).

Відповідність: спектру ФСЗ бромгексину гідрохлориду.

У разі різниці одержаних для речовин у твердому стані спектрів окремо розчиняють субстанцію та ФСЗ бромгексину гідрохлориду в метанолі P, упарюють насухо та повторно записують спектри одержаних залишків.

В. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

Випробовуваний розчин. 20 мг субстанції розчиняють у метанолі P і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

Розчин порівняння. 20 мг ФСЗ бромгексину гідрохлориду розчиняють у метанолі P і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

Пластинка: ТШХ пластинка із шаром силікагелю F_{254} P.

Рухома фаза: оцтова кислота льодяна P - вода P - бутанол P (17:17:66).

Об'єм проб: 20 мкл.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 3/4 довжини пластинки.

Висушування: на повітрі.

Виявлення: переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм.

Результати: на хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння, відповідна їй за розміром.

С. Близько 25 мг субстанції розчиняють у суміші 1 мл сірчаної кислоти розведеної P і 50 мл води P. До одержаного розчину додають 2 мл метилхлориду P і 5 мл хлораміну розчину P і струшують; нижній шар забарлюється у коричнювато-жовтий колір.

D. Близько 1 мг субстанції розчиняють у 3 мл 0.1 M розчину хлористоводневої кислоти. Одержаний розчин дає реакцію на первинні ароматичні аміни (2.3.1).

Витяг з Європейської фармакопеї [2]

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 10.0

Botulinum toxin type A for injection



01/2017:0001

BORIC ACID**Acidum boricum**H₃BO₃
[10043-35-3]

M, 61.8

DEFINITION*Content:* 99.0 per cent to 100.5 per cent.**CHARACTERS***Appearance:* white or almost white, crystalline powder, colourless, shiny plates greasy to the touch, or white or almost white crystals.*Solubility:* soluble in water and in ethanol (96 per cent), freely soluble in boiling water and in glycerol (85 per cent).**IDENTIFICATION**

- A. Dissolve 0.1 g by gently heating in 5 mL of *methanol R*, add 0.1 mL of *sulfuric acid R* and ignite the solution. The flame has a green border.
- B. Solution S (see Tests) is acid (2.2.4).

TESTS**Solution S.** Dissolve 3.3 g in 80 mL of boiling *distilled water R*, cool and dilute to 100 mL with *carbon dioxide-free water R* prepared from *distilled water R*.**Appearance of solution.** Solution S is clear (2.2.1) and colourless (2.2.2, *Method II*).**pH** (2.2.3): 3.8 to 4.8 for solution S.**Solubility in ethanol (96 per cent).** The solution is not more opalescent than reference suspension II (2.2.1) and is colourless (2.2.2, *Method II*).Dissolve 1.0 g in 10 mL of boiling *ethanol (96 per cent) R*.**Organic matter.** It does not darken on progressive heating to dull redness.**Sulfates** (2.4.13): maximum 450 ppm.Dilute 10 mL of solution S to 15 mL with *distilled water R*.**ASSAY**Dissolve 1.000 g with heating in 100 mL of *water R* containing 15 g of *mannitol R*. Titrate with 1 M *sodium hydroxide*, using 0.5 mL of *phenolphthalein solution R* as indicator, until a pink colour is obtained.1 mL of 1 M *sodium hydroxide* is equivalent to 61.8 mg of H₃BO₃.01/2019:2113
corrected 10.0**BOTULINUM TOXIN TYPE A FOR INJECTION****Toxinum botulinicum A ad iniectabile****DEFINITION**

Botulinum toxin type A for injection is a dried preparation containing purified botulinum neurotoxin type A, which may be present in the form of a complex with haemagglutinins

and non-toxic proteins. Botulinum neurotoxin type A or its haemagglutinin complex is prepared by a suitable purification process of the liquid supernatant from a broth-culture of a suitable strain of *Clostridium botulinum* type A.

The purified complexes consist of several proteins and can be of various sizes. The largest complex (relative molecular mass of about 900 000) consists of a 150 000 relative molecular mass neurotoxin, a 130 000 relative molecular mass non-toxic protein and various haemagglutinins ranging between relative molecular mass 14 000 and 43 000. The purified toxin moiety is composed of only the same 150 000 relative molecular mass neurotoxin as is found in the 900 000 relative molecular mass neurotoxin complex, which is initially produced as a single chain and further cleaved (nicked) by endogenous proteases into a fully active, disulfide-linked, 54 000 relative molecular mass light chain and a 97 000 relative molecular mass heavy chain.

The preparation is reconstituted before use, as stated on the label.

PRODUCTION**GENERAL PROVISIONS**

Production of the toxin is based on seed cultures, managed in a defined seed-lot system in which the ability to produce toxin is conserved. The production method must be shown to yield consistently product of activity and profile comparable to that of lots shown in clinical studies to be of adequate safety and efficacy.

The production method and stability of the finished product and relevant intermediates are evaluated using the tests below. Such tests include the specific toxin activity per milligram of protein of purified toxin in an appropriate functional model of toxin activity and may be supported by tests confirming the presence of botulinum toxin type A, and, if appropriate, associated non-toxic proteins.

BACTERIAL SEED LOTSA highly toxigenic strain of *C. botulinum* of known toxin type A and confirmed absence of genes encoding other botulinum toxins (particularly botulinum toxin types B and F), with known origin and history, is grown using suitable media. The bacterial strain, used for the master seed lot, shall be identified by historical records that include information on its origin and the tests used to characterise the strain. These will include morphological, cultural, biochemical, genetic and serological properties of the strain. The master seed lot and the working seed lot, where applicable, must be demonstrated to have identical profiles. Only a seed lot that complies with the following requirements may be used.**Identification.** Each seed lot is identified as containing pure cultures of *C. botulinum* type A bacteria with no extraneous bacterial or fungal contamination.**Microbial purity.** Each seed lot complies with the requirements for absence of contaminating micro-organisms. The purity of bacterial cultures is verified by methods of suitable sensitivity. These may include inoculation into suitable media and examination of colony morphology.**Phenotypic parameters.** Each seed lot must have a known fatty acid profile, sugar fermentation profile (glucose, lactose, mannose, etc.) and proteolytic activity and must demonstrate relevant lipase, lecithinase and gelatinase activity.**Genetic purity.** Each seed lot must have information on the toxin gene sequence and comply with requirements for the absence of other genes encoding other toxin serotypes.**Production of active toxin.** A bacterial strain producing a high yield of active toxin, as determined by an acute toxicity assay, is suitable. Seed lots demonstrate a capability of producing at least a minimum toxicity level appropriate for the manufacturing process and scale.Monographs
B

General Notices (1) apply to all monographs and other texts

1993

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

Angelina Kurylyak


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 N800109


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

Kuryliak Anhelina

QUANTITATIVE DETERMINATION OF BORIC ACID IN EYE DROPS
BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Department of analytical, physical and colloidal chemistry

Scientific supervisor: Tymoshchuk Olga

Keywords: boric acid, eye drops, method of high-performance liquid chromatography, HPLC, quantitative analysis

Introduction. Boric acid is widely used in medicine, in particular in pharmacy. By nature, it is a weak inorganic acid. For medical purposes, it is used as an antiseptic for minor burns or cuts, for the treatment of acne, prevention of mycosis of the feet, and sometimes in ointments and dressings. In a very diluted solution, it is used for washing the eyes, treating some types of otitis externa. Boric acid is quickly absorbed and excreted from the body in the urine with an average half-life of one day. It has low toxicity when applied to the skin and moderately toxic when inhaled. For quantitative determination, only the method of direct titration with 1 M sodium hydroxide solution is indicated.

Materials and methods. The subject of research was boric acid, 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 boric acid 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. 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 boric acid in the studied medicinal products ranged from 20 to 6 mg/ml. Such a significant amount of the investigated substance in the analyzed medicinal products is explained by the fact that boric acid is used as an active 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 boric acid in the eye drops.