

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ**  
**НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**  
**ІМЕНІ О. О. БОГОМОЛЬЦЯ**  
**ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ**  
**КАФЕДРА АНАЛІТИЧНОЇ, ФІЗИЧНОЇ ТА КОЛОЇДНОЇХІМІЇ**

**ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

На тему «Кількісне визначення хлоргексидину у розчинах для зовнішнього застосування».

Виконала: здобувачка вищої освіти 6-го курсу, групи 1081Б  
напряму підготовки 226 Фармація, промислова фармація

Майстер Ольга Євгенівна

Керівник: Професор кафедри аналітичної, фізичної та  
колоїдної хімії, кандидат хімічних наук,

Рева Тетяна Дмитрівна

Рецензент: Доцентка кафедри хімії ліків та лікарської  
токсикології, к.фарм.н., Нароха Віолета Петрівна

**Київ – 2026**

## ЗМІСТ

Перелік умовних позначень, символів, скорочень і термінів.	4
Вступ.	5
ОСНОВНА ЧАСТИНА. Розділ 1. Хлоргексидин, синтез, фізико-хімічні властивості, методи ідентифікації та кількісного визначення.	9
1.1. Фізико-хімічні властивості хлоргексидину.	9
1.2. Фармакологічні властивості хлоргексидину.	13
Розділ 2. Експериментальна частина.	15
2.1. Матеріали та методи.	14
2.1.1. Мета дослідження.	14
2.1.2. Об'єкти дослідження.	14
2.1.3. Посуд, прилади та реактиви.	15
2.1.4. Методики УФ – спектрофотометричного визначення та приготування розчинів.	15
Розділ 3. Результати роботи та їх обговорення.	19
3.1. Аналіз спектру поглинання розчину хлоргексидину біглюконату.	19
3.2. Побудова градуювального графіка.	21
3.3.Результати кількісного УФ -спектрофотометричного визначення хлоргексидину у Об'єктах дослідження	23

(Зразках).

3.4. Перевірка внутрішньолабораторної точності методики	25
УФ – спектрофотометричного визначення	
хлоргексидину у Об'єктах дослідження та стабільності	
розчинів.	
Висновки.	28
Список використаних джерел.	29
Додатки.	32
Анотація (Summary).	38

## **ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ**

АР – антисептичні речовини

АП – антисептичні препарати

ЦНС – центральна нервова система

РХ – рідинна хроматографія

ФСЗ – фармакопейний стандартний зразок

ВЕРХ -високоєфективна рідинна хроматографія

ТШХ – тонкошарова хроматографія

ЛЗ – лікарські засоби

РЛФ – рідка лікарська форма

ГГ – градувальний графік

г – грам

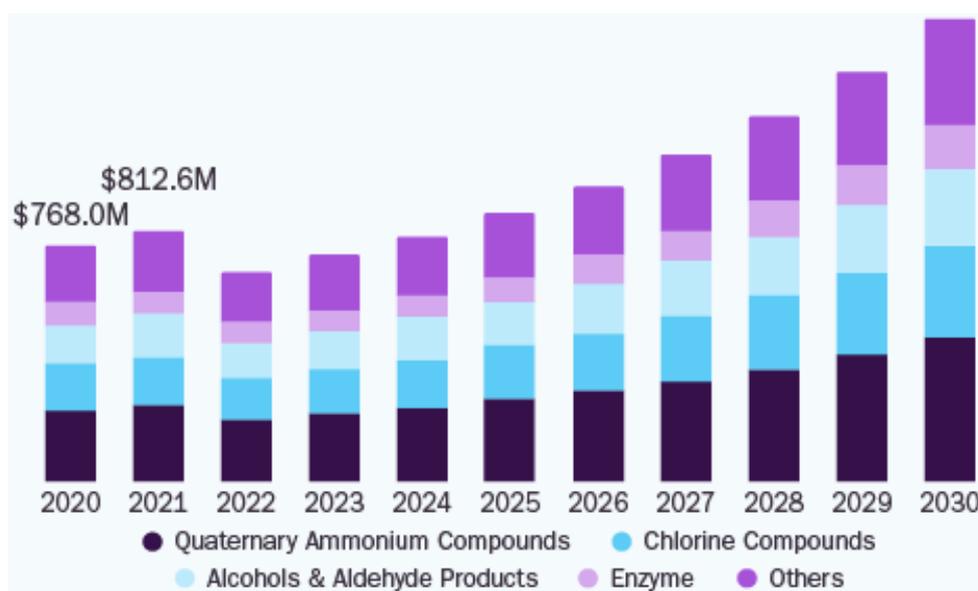
мл – мілілітр

мг- міліграм

нм – нанометр

## ВСТУП

Антисептичними речовинами (АР) називають сполуки хімічного або природного походження [1], що мають проявляти протимікробні властивості. Виробництво антисептичних речовин з кожним роком зростає і у 2030 році, згідно прогнозів ООН, обсяг у виробництві АР буде перебільшувати 2 млрд. доларів [2]:



Сполуки, які проявляють антисептичні властивості, повинні мати:

- Високу протимікробну властивість стосовно різних форм бактерій та мікроорганізмів;
- Низький індекс токсичності для людини та тварини;
- Розчинність у воді;
- Селективність та високу спроможність гальмувати дію мікроорганізмів у присутності інших сторонніх речовин.

Антисептичні препарати (АП) є речовинами, до складу яких входять АР. Антисептичні препарати за своєю природою дуже різноманітні, але, у першу чергу, виділяють:

*Окисники* (гідроген пероксид, калій перманганат тощо). Окисники порушують Red-OX процеси білків та ферментів мікробів;

*Кислоти органічні* (саліцилова, борна, бензойна тощо). Визивають денатурацію білків у клітині мікробів;

*Солі неорганічні* (цинк сульфат, аргентум нітрат тощо). Сприяють денатурації білкових ланцюгів, блокують сульфгідрильні групи ферментів;

*Спирти органічні* (етанол тощо). Блокують ферментативну активність дегідрогеназ;

*Феноли та альдегіди* (резорцин, фенілсаліцилат, тощо). Блокують ферментативну активність дегідрогеназ;

*Органічні барвники* (діамантовий зелений тощо). Викликають лізис та сприяють утворенню небажаних комплексів;

*Нітрофурани* (ліфузол, фуросолідон тощо). Завдяки окисно-відновній взаємодії відбувається відновлення нітрогрупи, ДНК клітини руйнується, знижується клітинне дихання мікроорганізмів;

*Похідні 8-оксихіноліну* (хінозол тощо). В результаті взаємодії утворюються халатні комплекси, які мають можливість посилювати окисні процеси у протоплазмі;

*Детергенти* (мила, етоній тощо). Знижують поверхневий натяг мікроорганізмів, що приводить до руйнування поверхні клітини;

*Дьогті* (іхтамол). Знижують поверхневий натяг мікроорганізмів, що приводить до руйнування поверхні клітини;

*Природні АП* (хлорофіліпт). Знижують поверхневий натяг мікроорганізмів, що приводить до руйнування поверхні клітини;

*Галоїди* (йодин, хлорамін Б, хлоргексидин тощо). Ця група викликає денатурацію білка, окиснення ферментів.

Лікарські засоби, до складу яких входить хлоргексидин, використовують на шкірі. У стоматологічній практиці речовину

використовують для іригації корневих каналів, у косметології – як добавку до кремів, дезодорантів тощо [1].

Хлоргексидин є АР, який використовується як діюча речовина у АП вже більше 60 років, сполука проявляє високу ефектну протидію щодо грампозитивних та грамнегативних бактерій, вірусів та грибків. У різноманітних лікарських формах, як правило, хлоргексидин знаходиться у солеподібному вигляді (біглюконаті), Рисунок 1, [3]:

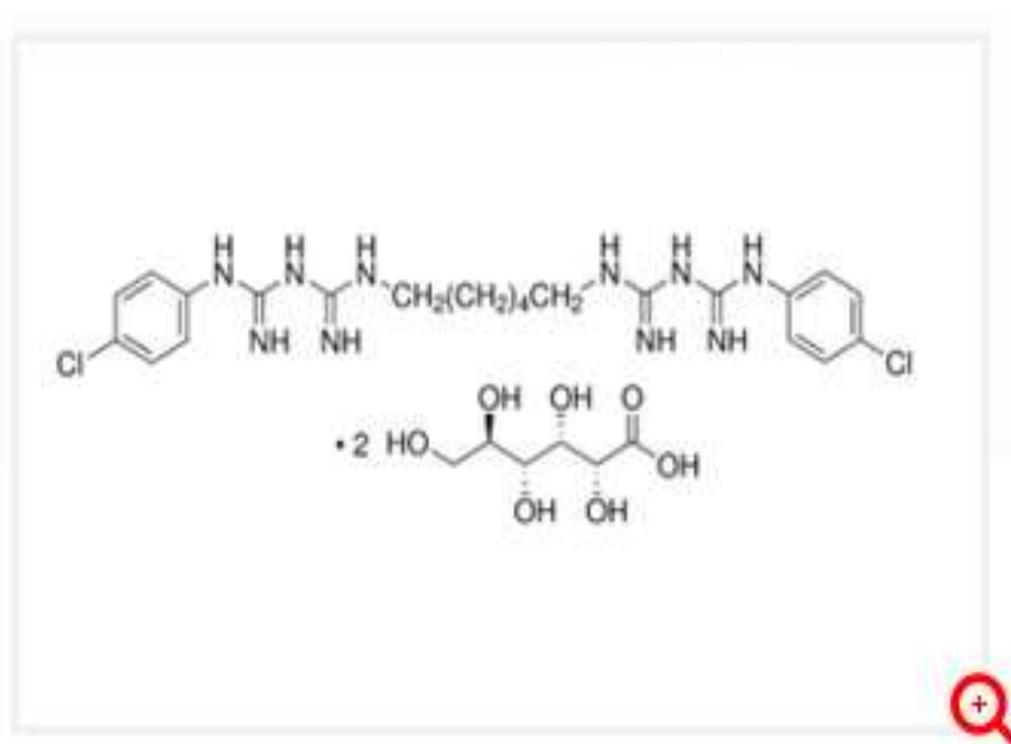


Рисунок 1. Хлоргексидин біглюконат. Фото з сайту [https://www.tnjchem.com/chlorhexidine-digluconate-20-solution-cas-18472-51-0\\_p123.html](https://www.tnjchem.com/chlorhexidine-digluconate-20-solution-cas-18472-51-0_p123.html).

**Актуальність теми:** Застосування антисептичних речовин є найважливішою вимогою підтримки санітарно-гігієнічних умов населення будь якої країни, тому розробка нових методик кількісного визначення антисептичних речовин є актуальним.

**Мета:** Розробити, апробувати та виконати часткову валідацію методики кількісного УФ – спектрофотометричного визначення хлоргексидину у розчинах для зовнішнього застосування.

**Завдання дослідження:**

1. Проаналізувати фізико-хімічні, фармакологічні властивості хлоргексидину та його солей, механізм дії хлоргексидину, метаболізм та токсичність;
2. Виконати аналіз методик ідентифікації та кількісного визначення солей хлоргексидину;
3. Розробити методику кількісного УФ - спектрофотометричного визначення хлоргексидину у розчинах для зовнішнього застосування, виконати її часткову валідацію.

**Методи дослідження:** Бібліосемантичний, УФ - спектрофотометрія.

**Апробація результатів дослідження.** Результати роботи були представлені на VI Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Planta+. Наука, практика та освіта. Київ, Україна, 23 січня 2025 р.

**Структура роботи.** Робота представлена на 38 сторінках, додатків -3, рисунків- 7, таблиць- 5.

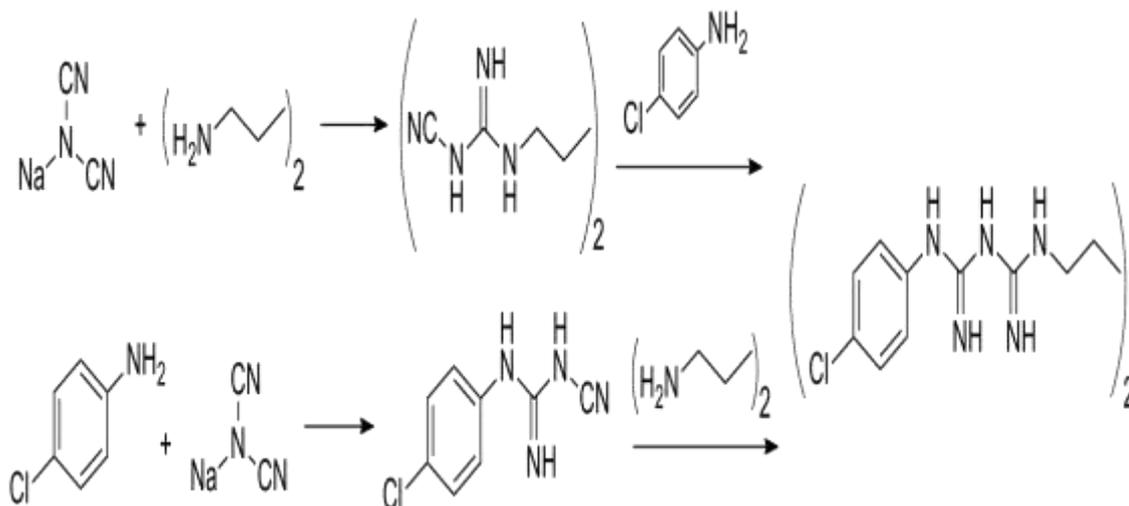
## ОСНОВНА ЧАСТИНА. Розділ 1. Хлоргексидин, синтез, фізико-хімічні властивості, методи ідентифікації та кількісного визначення.

### 1.1. Фізико-хімічні властивості хлоргексидину.

Синтез сполуки хлоргексидин можна описати трьома стадіями [1,3], а саме:

Стадія 1. Взаємодія діаніліну з ціанамідом.

Стадія 2. Продукт попереднього синтезу обробляється хлором, результатом цієї реакції є утворення хлоргексидину:



Стадія 3. Стабільною та зручною формою використання хлоргексидину є солі, отже, наступною стадією буде взаємодія продукту стадії 2 з кислотою (глюконовою, етановою). Хлоргексидин у сольовій формі зберігають у нормальних умовах без доступу вологи у щільно закритому контейнері, враховуючи факт можливого гідролізу солей та утворення 4-хлораніліну [5]. Структурним аналізом встановлено, що хлоргексидин має симетричну будову і його молекула може бути розглянута як синергія двох груп 4-хлорфенілового замісника [1].

*Хлоргексидин ацетат*. Білий кристалічний порошок з температурою плавлення 154<sup>0</sup>С, молярна маса 625,64 г/моль, розчиняється в етанолі у співвідношенні 1:15. При збільшенні вологості проявляє гігроскопічність[1].

*Хлоргексидин гідрохлорид*. Білий або майже білий порошок, температура плавлення становить 261<sup>0</sup>С, молярна маса 578,44 г/моль, обмежено розчиняється у воді та етанолі. Гігроскопічний [1].

*Хлоргексидин біглюконат*. Білий або блідо-жовтий порошок. Молярна маса 897,88 г/моль. Розчиняється у воді та органічних розчинниках [1].

Згідно Європейської Фармакопеї (Додаток 1) одним з методів ідентифікації сполук є метод РХ. Нерухомою фазою використовують колонку з октадецилсилікагелем для хроматографії, довжина колонки 0,2 м, діаметр 40 мм, рухомою фазою обирають суміш натрій октосульфонату (2 г сухої солі розчиняють у 120 мл концентрованої етанової кислоти), 270 мл води та 730 мл метанолу. Швидкість пропускання 1 мл/хв, інжекція – 10 мкл. Детектування проводять у межах 220-255 нм.

Ідентифікацію солі хлоргексидину (біглюконату) можна проводити і іншими фізико-хімічними методами оскільки в УФ – області спектра фіксується плече поглинання від 232 нм до 242 нм, Рисунок 2:

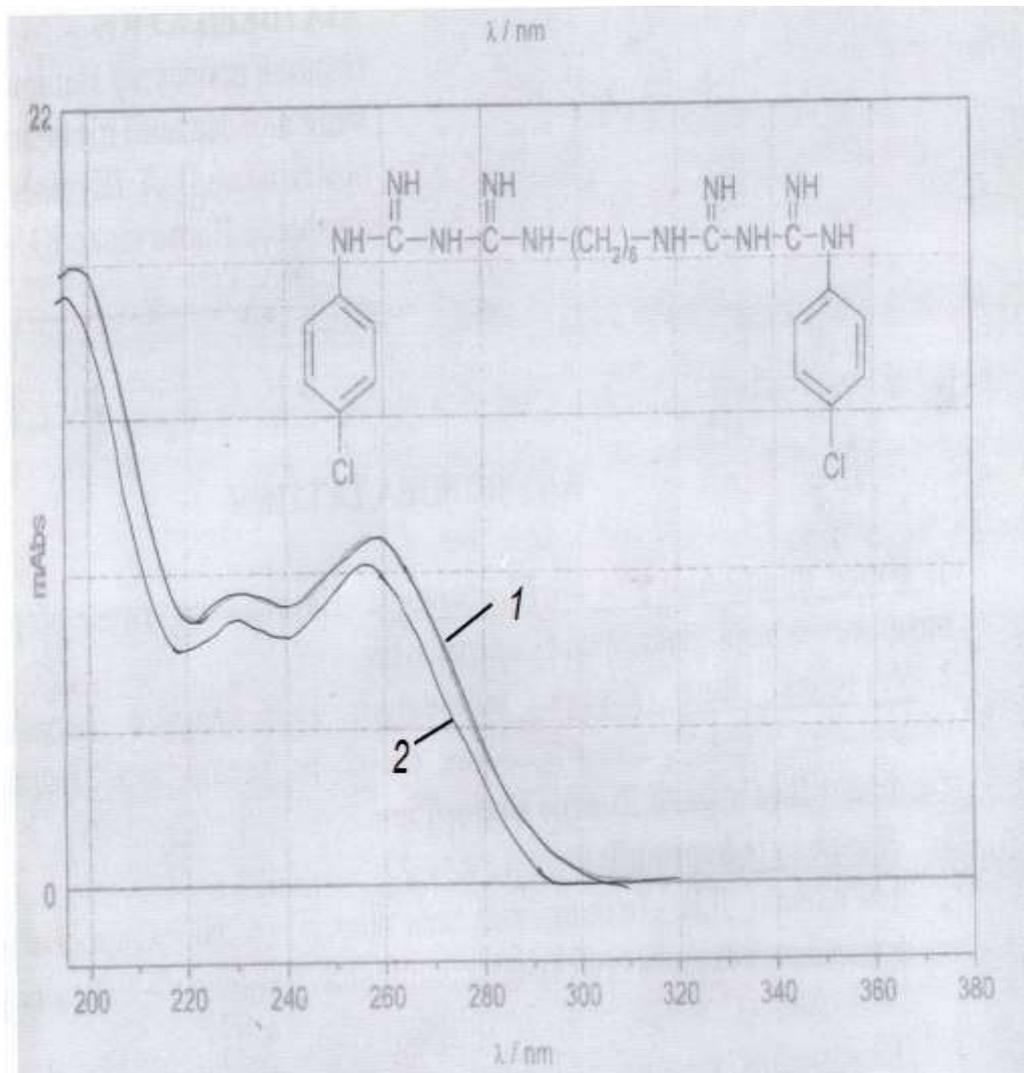


Рисунок 2. Ідентифікація хлоргексидину біглюконату [4].

#### *Кількісне визначення солей хлоргексидину.*

У нормативних документах Європейської фармакопеї кількісно визначення солей хлоргексидину рекомендовано проводити ацидиметричним потенціометричним титруванням у неводному

середовищі, титрант методу – 0,1М НСІО<sub>4</sub>. 1 мл 0,1М розчину НСІО<sub>4</sub> відповідає:

15,64 мг хлоргексидину ацетату;

14,46 мг хлоргексидину гідрохлориду;

22,44 мг хлоргексидину біглюконату.

Аналізуючи методики кількісного визначення хлоргексидину (згідно Європейської Фармакопеї) нами відмічається, що неводне потенціометричне титрування хлоргексидину у розчинах для зовнішнього застосування завдяки низької концентрації діючої речовини не представляється можливим.

Нашими співвітчизниками [4] розроблена та валідована методика кількісного визначення хлоргексидину біглюконату методом УФ – спектрофотометрії. Визначення проводили при довжині хвилі 253 нм однокомпонентним однохвильовим аналізом. Методика дослідження:

Точну наважку аналізованої речовини розчиняють у 50 мл води, струшують. На аналіз відбирають 5 мл приготованого розчину, вміст діючої речовини визначали за стандартними співвідношеннями.

При ретельному аналізі цієї методики ми відмічаємо, що вона є точною, експресною та з низькою собівартістю, тому, при розробці власної УФ – спектрофотометричної методики визначення хлоргексидину у розчинах для зовнішнього застосування, ми спиралися саме на висновки наших українських колег [4].

## 1.2. Фармакологічні властивості хлоргексидину.

Сполука хлоргексидин (Рисунок 3), як і його солі, проявляє яскраво виражену протимікробну властивість, тому, знаходить широке використання у фармацевтичній та медичній практиці [6-13]:

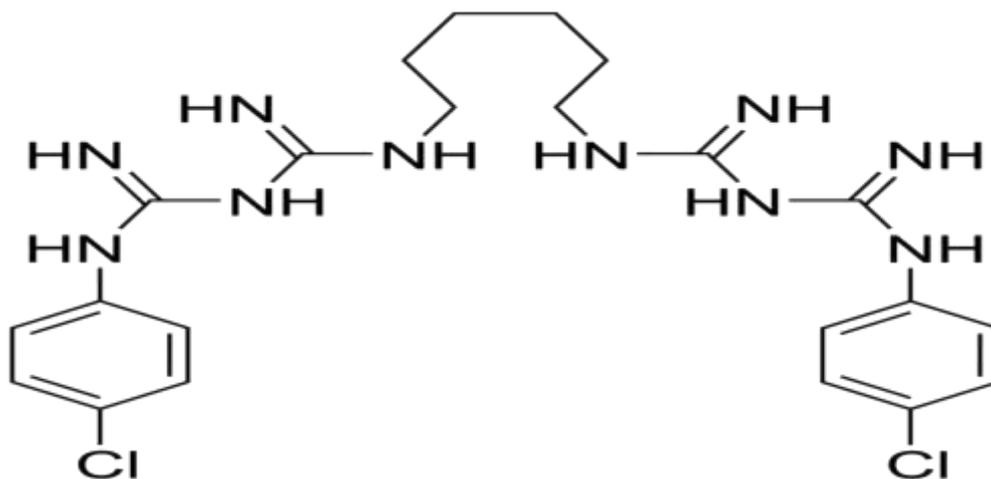


Рисунок 3. Хлоргексидин [1].

Клінічними дослідженнями доведено, що препарати з хлоргексидином не мають мутагенного, тератогенного та ембріотоксичного ефекту у розчинах.

Солі ацетат та біглюконат хлоргексидину входять до складу очних крапель, лікарських засобів, які знаходять використання при стерилізації товарів медичного призначення, розповсюджені у стоматологічній практиці (креми, гелі, полоскання), при інфекціях у порожнині рота та горла. Найбільш часто у практиках використовують хлоргексидин біглюконат завдяки його найменшій токсичності [6-13].

З хімічної точки зору, хлоргексидин біглюконат відноситься до катіонного бігуаніду [5]. Завдяки присутності у будові аміногрупи хлоргексидин може проникати у внутрішньоклітинні мембрани різноманітних бактерій, вступає у комплексоутворення з цитоплазмою та змінює функції мембрани (перешкоджає споживанню кисню), що приводить

до загибелі бактеріальної клітини. Однією із властивостей цієї речовини є руйнування ДНК бактерії, що гальмує розмноження клітин. Фармакінетика препаратів особлива тим, що сполука не проникає через інтактну шкіру, не всмоктується шлунково-кишковим трактом. При випадковому ковтанні всмоктуються мінімально і виводиться з організму каловими масами. Препарати з хлоргексидином застосовуються лише зовнішньо шляхом обробки рани або пошкодженої ділянки шкіри, препарати рекомендують використовувати для профілактичних заходів з метою запобігання передачі інфекції. Препарати з хлоргексидином мають протипоказання, не рекомендовано використовувати лікарські засоби при надмірної чутливості пацієнта до хлоргексидину, наявності схильності до алергічних проявів, обробки кон'юнктивиту та ран з високою пошкодженою поверхнею, при хірургічному втручанні на ділянках ЦНС та при черепно-мозкових травмах. При попаданні препарату в очі можливе ушкодження рогівки.

Дія препаратів посилюється із збільшенням температури, при температурі вище  $100^{\circ}\text{C}$  та іонізуючому випромінюванні відмічається його хімічне розкладання. У педіатричній практиці препарати з хлоргексидином не використовуються. Побічними ефектами можуть бути нижче наведені небажані прояви:

*Дерматологічні.* Сухість та свербіж шкіри, дерматити, липкість долоні;

*Стоматологічні.* Забарвлення емалі зубів та відкладання зубного каменю;

*Офтальмологічні.* Ушкодження рогівки, порушення зору.

Не рекомендована одночасна терапія препаратами хлоргексидину та препаратами йоду, з етанолом, бензалконій хлоридом, центримоній бромідом. Хлоргексидин біглюконат є несумісним препаратом з боратами, карбонатами, цитратами, фосфатами, сульфатами оскільки наслідком взаємодії є утворення малорозчинних сполук [6-13].

## Розділ 2. Експериментальна частина.

Випускна кваліфікаційна робота була виконана на базі кафедри аналітичної, фізичної та колоїдної хімії Університету.

### 2.1. Матеріали та методи.

#### 2.1.1. Мета дослідження.

Метою роботи була розробка УФ – спектрофотометричної методики кількісного визначення хлоргексидину у розчинах для зовнішнього застосування, її апробація та часткова валідація.

#### 2.1.2. Об'єкти дослідження.

Об'єктами нашого дослідження ми обрали розчини для зовнішнього застосування хлоргексидин біглюконату концентрації 0,05% (0,5 мг/мл). Розчини випускаються фармацевтичною промисловістю України, Рисунок 4:

Зразок 1



Зразок 2



Рисунок 4. Об'єкти дослідження, фото з сайту <https://tabletki.ua>.

### 2.1.3. Посуд, прилади та реактиви.

1. Хімічний лабораторний посуд класу А (Додаток 2).
2. Терези лабораторні ТВЕ-0,21-0,001-а-2 (Додаток 3).
3. Спектрофотометр SPECORD 200-222 U 214.
4. Фармакопейний стандартний зразок Chlorhexidine digluconate solution, реєстраційний номер 18472-51-0, каталожний номер С0086.

### 2.1.4. Методики УФ – спектрофотометричного визначення та приготування розчинів.

Вимірювання величини оптичної густини  $A$  розведених розчинів Зразків та розведених розчинів ФСЗ проводили при довжині хвилі 253 нм на спектрофотометрі SPECORD 200-222 U 214 (Рисунок 5).

Метод УФ – спектрофотометричного визначення та інструкція користування спектрофотометрами, принципів схеми роботи спектрофотометра зазначено у [14-15]:



Рисунок 5. Спектрофотометр SPECORD 200-222 U 214, фото з сайту <https://img.ua/novini/tehnologiya-specord-60-rokiv>.

Концентрацію аналізованої речовини хлоргексидин у розчинах встановлювали за методом градуювального графіка [14-15]. Метод градуювального графіка при проведенні УФ – спектрофотометричного визначення використовували, спираючись на [14-15].

*Приготування ФСЗ хлоргексидину біглюконату концентрації 1 мг/мл.*

100 мг ФСЗ хлоргексидин біглюконату вміщували у мірну колбу на 100 мл, додавали деіонізовану воду до позначки, струшували.

*Приготування розчинів ФСЗ хлоргексидину біглюконату концентрації 0,05-0,1 мг/мл для побудови градуювального графіка.*

Відбирали певні аліквоти (Таблиця 1), мл, розчину ФСЗ концентрації 1 мг/мл, вміщували у мірні колби на 10 мл, доводили водою до позначки, перемішували:

Таблиця 1. Приготування розведених розчинів ФСЗ хлоргексидину біглюконату.

№	Аліквоти розчину ФСЗ концентрації 1 мг/мл, мл	Концентрація розведених стандартних розчинів, мг/мл
1	0,5	0,05
2	0,6	0,06
3	0,7	0,07
4	0,8	0,08
5	0,9	0,09
6	1,0	0,10

*Приготування розчинів Зразків концентрації 0,08 мг/мл.*

Згідно інструкції для медичного застосування, концентрація діючої речовини у лікарському засобі для зовнішнього застосування 0,5 мг/мл.

Для приготування розчину концентрації 0,08 мг/мл відбирали піпеткою 4 мл лікарського засобу (Зразків 1 та 2, кожний окремо), вміщували у мірну колбу на 25 мл та доводили водою до позначки. Струшували.

### **Розділ 3. Результати роботи та їх обговорення.**

Аналізуючи методики кількісного визначення хлоргексидину та його солей можна зробити висновок, що концентрацію хлоргексидину у розчині можна знайти методом ВЕРХ, ТШХ, ацидиметричним потенціометричним титруванням (Додаток 1) та спектрофотометрією.

Ацидиметричне потенціометричне титрування для знаходження концентрації досліджуваних розчинів Зразків (Європейська фармакопея, Додаток 1) у нашому випадку ми вважали недоцільним, оскільки концентрація досліджуваних розчинів була невеликою ( згідно Європейської Фармакопеї 1 мл 0,1 М розчину  $\text{HClO}_4$  еквівалентно реагує з 22,44 мг хлоргексидину біглюконату).

Метод УФ – спектрофотометричного визначення є сучасним, точним та недорогим, враховуючи цей факт та спираючись на умовиводи українських вчених [4] ми поставили перед собою задачу розробити спектрофотометричне визначення хлоргексидину біглюконату у розчинах для зовнішнього застосування.

При розробці методики нами було враховано, що сполука хлоргексидину біглюконат має здатністю осаджуватися з розчину якщо концентрація діючої речовини перебільшує 0,5 мг/мл, але, якщо концентрація менш ніж вищенаведена, розчини є седиментаційно стійкими.

#### **3.1. Аналіз спектру поглинання розчину хлоргексидину біглюконату.**

Метод УФ – спектрофотометрії відноситься до оптичних методів дослідження і базується на вимірюванні величини абсорбції світла, яке проходить через зразок дослідження. Для знаходження найоптимальнішої хвилі, при значенні якої доцільно проводити визначення аналітичного сигналу (оптичної густини  $A$ ) ми проаналізували залежність  $A = f(\lambda)$ , тобто

вивчили спектр поглинання для ФСЗ з концентрацією 0,08 мг/мл у діапазоні  $\lambda = 240\text{-}270$  нм. Результати представляли графічно, Рисунок 6:

$\lambda$	240	245	250	253	260	265	270
A	0,01	0,02	0,24	0,69	0,21	0,1	0,01

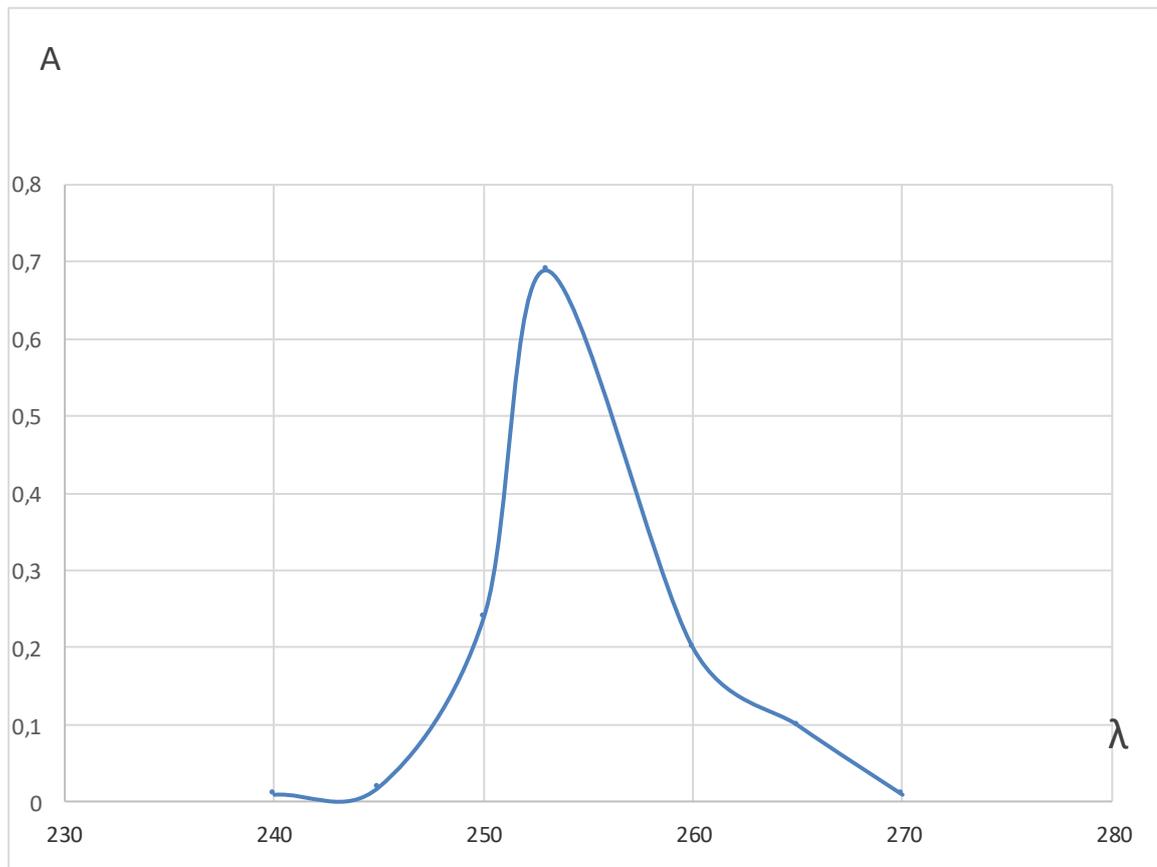


Рисунок 6. Графічна залежність величини абсорбції (оптичної густини A) від довжини хвилі.

Відповідно, максимальна абсорбція спостерігається при 253 нм, тому, усі подальші вимірювання, апробацію та валідацію розробленої методики ми проводили саме при цьому значенні  $\lambda$ .

### 3.2. Побудова градуювального графіка.

Визначення концентрації досліджуваної речовини при виконанні спектрофотометричних досліджень можна здійснювати за методом добавок, методом порівняння та за методом градуювального графіка. При розробці методики ми обрали метод градуювального графіка, тому, наступним кроком розробки нашої методики було визначення оптичної густини  $A$  (величини абсорбції) раніше приготованих розведених фармакопейних стандартних розчинів (п.2.1.4.) та аналіз графічної залежності  $A = f(C)$  на лінійність методом найменших квадратів, Рисунок 7.

Результати вимірювання оптичної густини  $A$  фармакопейних стандартних розведених розчинів представлено у Таблиці 2:

Таблиця 2. Оптична густина  $A$  стандартних розведених розчинів хлоргексидину біглоконату.

№	Концентрація стандартних розведених розчинів, мг/ мл	Оптична густина $A$
1	0,05	0,44
2	0,06	0,52
3	0,07	0,61
4	0,08	0,69
5	0,09	0,78
6	0,10	0,86

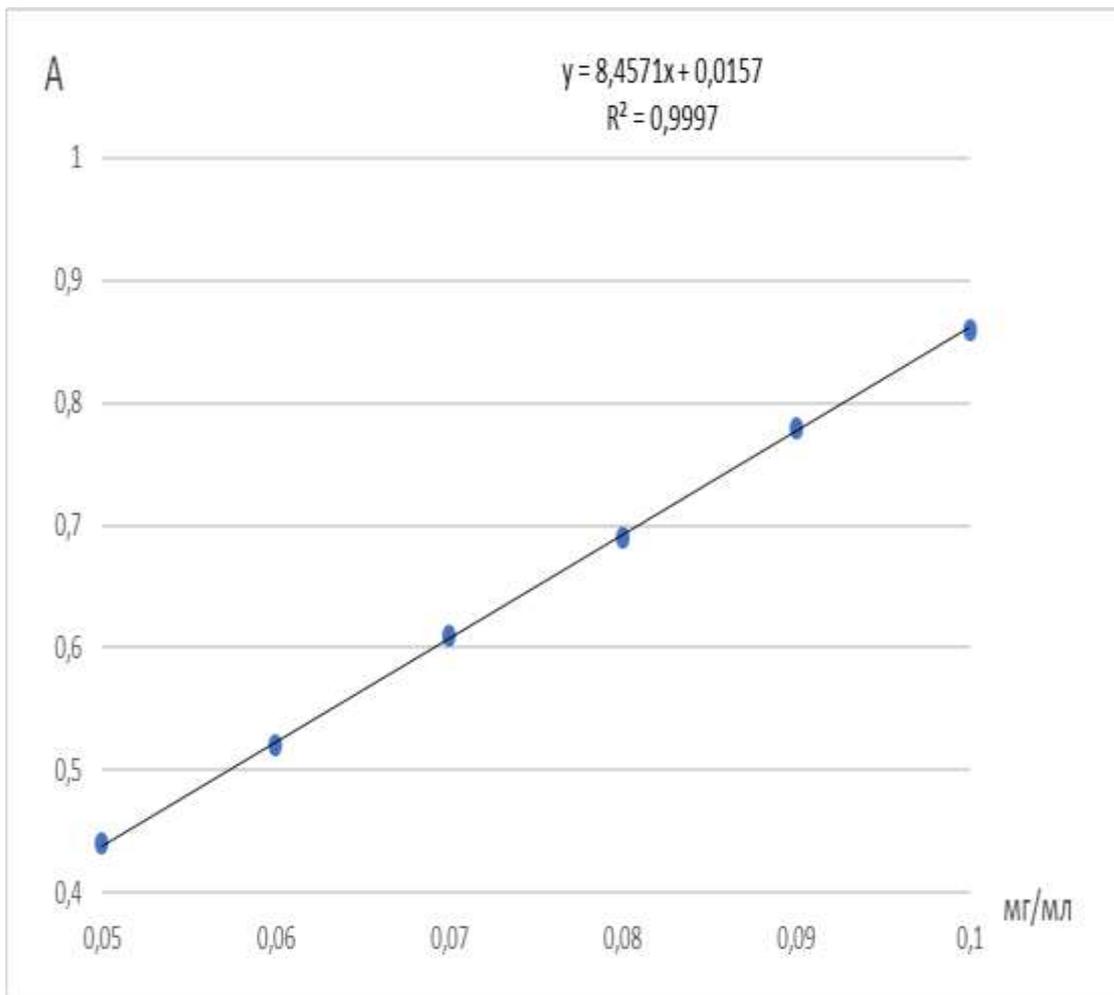


Рисунок 7. Градувальний графік.

Статистична обробка результатів графічної залежності дозволяє зробити висновок, що функція лінійної регресії має вигляд

$$y = 8,4571 \cdot x + 0,0157 \text{ (коефіцієнт кореляції } R^2 = 0,9997\text{)}.$$

Стандартні відхилення та довірчі інтервали для коефіцієнтів лінійної регресії визначали за стандартними формулами згідно ДФУ [16-17]:

$$s_0^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - Y_i)^2}{v} = 8,57189 \cdot 10^{-6}$$

$$s_b^2 = \frac{n \cdot s_0^2}{n \cdot \sum_{i=1}^n x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i)^2} = 0,004898222$$

$$s_a^2 = \frac{s_b^2}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i^2 = 2,89811 \cdot 10^{-5}$$

$$s_b = \sqrt{s_b^2} = 0,069987$$

$$s_a = \sqrt{s_a^2} = 0,005383$$

$$a \pm s_a \cdot t(0,95; 4) = 0,0157 \pm 0,0149$$

$$b \pm s_b \cdot t(0,95; 4) = 8,4571 \pm 0,1943$$

Аналізуючи результати статистичних визначень можна зробити висновок, що методика має лінійність і відповідає вимогам ДФУ [16-17].

### **3.3.Результати кількісного УФ -спектрофотометричного визначення хлоргексидину у Об'єктах дослідження (Зразках).**

Після побудови градуовального графіка та статистичного аналізу лінійної залежності ми вимірювали величину абсорбції (оптичну густину А) у Зразках, за ГГ стандартними методиками знаходили концентрацію хлоргексидину та, враховуючи розведення, визначали концентрацію хлоргестидину у Об'єктах дослідження.

Результати представляли у Таблиці 3:

Таблиця 3. Результати кількісного УФ -спектрофотометричного визначення хлоргексидину у Об'єктах дослідження.

Об'єкти дослідження	Концентрація хлоргексидину, мг/мл, враховуючи розведення	
	Зразок 1	Зразок 2
	0,51	0,52
	0,52	0,50
	0,48	0,49
	0,47	0,49
	0,47	0,48
Середнє значення,	0,49	0,50
Стандартне відхилення, $s$	0,023	0,015
Дисперсія, $s^2$	0,00055	0,00023
Відносне стандартне відхилення, %	4,79	3,06
Довірчий інтервал,	$0,49 \pm 0,029$	$0,50 \pm 0,019$
Відносна похибка середнього значення, %	5,94	3,80

Спираючись на значення стандартного відхилення та відносного стандартного відхилення можна вважати методику задовільною, але наступним кроком апробації методики було вивчення внутрішньолабораторної точності.

### **3.4. Перевірка внутрішньолабораторної точності методики УФ – спектрофотометричного визначення хлоргексидину у Об'єктах дослідження та стабільності розчинів.**

Внутрішньолабораторну точність методики перевіряли на наступний день. Перевірку здійснювали для Зразка 2, умови проведення досліджування не змінювали [16-17]. Результати оцінки внутрішньолабораторної точності наведено у Таблиці 4.

Аналізуючи експериментальні дані, можна зробити висновок, що результати корелюють між собою, величина стандартного відхилення є майже незмінною, відносне стандартне відхилення не перебільшує 3,4%, відносна похибка середнього значення не перебільшує 4,2%, результат вважається задовільним згідно ДФУ [16-17].

Стабільність розчинів хлоргексидину вивчали як функцію величини абсорбції від часу, вимірювання оптичної густини  $A$  проводили через кожні 10 хвилин протягом години, дослідження проводили для фармакопейного стандартного розведеного розчину концентрації 0,08 мг/мл, довжина хвилі вимірювання оптичної густини  $A$  становила 253 нм, результати наведено у Таблиці 5.

Аналіз стабільності розчинів хлоргексидину дозволяє зробити висновок, що значення абсорбції майже не змінюється, RSD, % має значення 0,26, що відповідає вимогам ДФУ [16-17]:

Таблиця 4. Оцінка внутрішньолабораторної точності методики кількісного УФ - спектрофотометричного визначення хлоргексидину у Об'єкті дослідження.

Зразок 2	Концентрація хлоргексидину, мг/мл, враховуючи розведення	
	День 1	День 2
	0,52	0,51
	0,50	0,50
	0,49	0,48
	0,49	0,48
	0,48	0,47
Середнє значення,	0,50	0,49
Стандартне відхилення, $s$	0,015	0,016
Дисперсія, $s^2$	0,00023	0,00027
Відносне стандартне відхилення, %	3,06	3,37
Довірчий інтервал,	$0,50 \pm 0,019$	$0,49 \pm 0,020$
Відносна похибка середнього значення, %	3,80	4,18

Таблиця 5.

Вивчення стабільності розчину хлоргексидину, концентрація розчину 0,08 мг/мл,  $\lambda = 253$  нм.

								Середнє	RSD,%	Довірчий інтервал	Відносна похибка середнього значення	Дисперсія
t, хв.	0	10	20	30	40	50	60					
Оптична густина А	0,691	0,691	0,693	0,694	0,695	0,695	0,695	0,693	0,261	0,693 ± 0,00167	0,242	3,28·10 <sup>-6</sup>

## ВИСНОВКИ

1. В результаті роботи було проаналізовано фізико-хімічні, фармакологічні властивості сполуки хлоргексидин, його солей, механізм дії хлоргексидину, метаболізм та токсичність;
2. Проаналізовано методики ідентифікації та кількісного визначення хлоргексидину та його солей;
3. Розроблена методика кількісного УФ - спектрофотометричного визначення хлоргексидину у розчинах для зовнішнього застосування, виконана її часткова валідація.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/2829/antiseptichni-preparati>.
2. Antiseptics and Disinfectants Market Size Report, 2022- 2030 // [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.grandviewresearch.com/industryanalysis/antiseptics-and-disinfectants-market>. (дата звернення: 11.09.2022).
3. В. М. Брицун, Н.В. Сімурова, І.В. Попова, О.В. Сімуров // Журнал органічної та фармацевтичної хімії. – 2021. – Т. 19, вип. 3 (75). – С. 3 – 14. <https://doi.org/10.24959/ophcj.21.231997> .
4. Davtyan, L. L., Voronkina, A. S., Chubenko O. V., & Trohimchuk, V. V. (2018). Розроблення методик контролю якості стоматологічних лікарських плівок із хлоргексидином, метронідазолом та глюкозаміном. *Фармацевтичний журнал*, (3-4), 92-99. вилучено із <https://pharmj.org.ua/index.php/journal/article/view/113>.
5. Фармацевтична хімія: Підручник. Ред. П.О. Безуглий. – Вінниця: Нова Книга, 2008 – 560с.
6. Довідник лікарських препаратів Компендіум [Електронний ресурс]. - Режим доступу: <https://compendium.com.ua/>
7. Фармакологія за Рангом і Дейлом, пер.9-го англ.вид. у 2-х томах Т.1/Джеймс М.Рітер, Род Флавер, Грем Гендерсон, Юн Конг Лоук,

- Девід Мак К,юон, Гемфрі П Ранг; наук.ред.перекл. Ганна Зайченко, Микола Хайтович.-К.ВСВ ”Медицина“, 2021-588 с.
8. Фармакологія з основами патології / Колесник Ю.М.,Чекман І.С., Беленічев І.Ф., Горчакова Н.О., Нагорна О.О., Бухтіярова Н.В., Моргунцова С.А., Зайченко Г.В. : підручник. Вінниця: Нова книга, 2021. – 572 с.
9. Побічна дія ліків: підручник для студентів вищих навчальних закладів медичної освіти/Беленічев І.Ф., Горчакова Н.О., Бухтіярова Н.В, Самура Т.А., Бухтіярова Т.А., Нагорна О.О., Моргунцова С.А., Єгоров А.А., Риженко О.В., Тихоновський О.В. Запоріжський державний медичний Університет. Вінниця: Нова книга, 2021. – 360 с.
- 10.Фармакологія. Підручник для медичних і стоматологічного факультетів Вищих медичних навчальних закладів освіти. І.С.Чекман, В.М.Бобирьов, В.В.Кресюн, В.В.Годован, Н.О.Горчакова, Л.І.Казак, Т.В.Кава, Г.Ю.ОстровськаТ.А.Петрова, Л.М.Рябушко Вінниця: Нова книга, 2020. – 472 с.
- 11.Довідник еквівалентності лікарських засобів Rxindex Спеціалізоване медичне видання / за ред І.А. Зупанця, В.П. Черних 4 вид. Перероблене К.: Фармацевт практик- 2020. – 2033 с.
- 12.Pharmacology / [M. A. Clark, R. Finkel, J. A. Rey et al.]. – [7th ed.]. – Baltimore : Lippincott Williams & Wilkins, 2018. – 638 p.

13. [www.pharma-center.com.ua](http://www.pharma-center.com.ua). веб-сайт ДЦФ МОЗ України [web-page]  
URL.
14. Практикум з аналітичної хімії. Навч. Посіб. Для студ. вищ. навч. закл. / В.В.Болотов, Ю.В.Сич, О.М.Свєчнікова та ін.; За аг. Ред.. В.В.Болотова. - Х: Вид-во НФаУ: Золоті сторінки.2003.- 240с.
15. Аналітична хімія. Підручник для вищих навчальних закладів / А.С. Алемасова, В.М. Зайцев, Л.Я. Єнальєва, Н.Д. Щепіна, С.М. Гождзінський / Під ред. В.М. Зайцева. – Донецьк: ДонНУ, 2009. – 415 с.
16. 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.
17. Георгіянц В.А. Валідація аналітичних методик у фармації : теорія, нормативні аспекти, проблеми практики. В.А. Георгіянц, О.А. Євтіфєєва. *Фармацевтичний часопис*. 2007. №2. С.13 – 18.

## ДОДАТКИ

## Додаток 1. Витяг з Європейської фармакопеї.

## Chlorhexidine diacetate

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 8.0

– stationary phase: octadecylsilyl silica gel for chromatography R (5 µm).

Mobile phase: acetonitrile R, water R (50:50 V/V).

Flow rate: 1.0 mL/min.

Detection: spectrophotometer at 254 nm.

Injection: 10 µL.

Run time: 6 times the retention time of chlordiazepoxide.

Relative retention with reference to chlordiazepoxide (retention time = about 3.6 min): impurity A = about 0.7; impurity B = about 2.3; impurity C = about 3.9.

System suitability: reference solution (b):

– resolution: minimum 5.0 between the peaks due to impurity A and chlordiazepoxide.

Limits:

- impurities A, B: for each impurity, not more than the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.2 per cent),
- impurity C: not more than the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (c) (0.2 per cent),
- unspecified impurities: for each impurity, not more than 0.5 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.10 per cent),
- total: not more than 2.5 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.5 per cent),
- disregard limit: 0.25 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.05 per cent).

**Loss on drying** (2.2.32): maximum 0.5 per cent, determined on 1.000 g by drying in vacuo at 60 °C for 4 h.

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

## ASSAY

Dissolve 0.250 g in 50 mL of water R. Titrate with 0.1 M silver nitrate, determining the end-point potentiometrically (2.2.20).

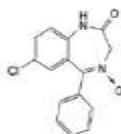
1 mL of 0.1 M silver nitrate is equivalent to 33.62 mg of  $C_{26}H_{38}Cl_2N_{10}O_4$ .

## STORAGE

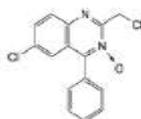
Protected from light.

## IMPURITIES

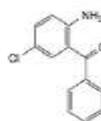
Specified impurities: A, B, C.



A. 7-chloro-5-phenyl-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepin-2-one 4-oxide.



B. 6-chloro-2-(chloromethyl)-4-phenylquinazoline 3-oxide.

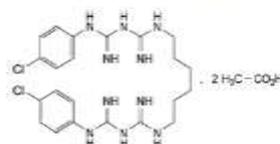


C. (2-amino-5-chlorophenyl)phenylmethanone (aminochlorobenzophenone).

01/2008:0657  
corrected 7.0

## CHLORHEXIDINE DIACETATE

## Chlorhexidini diacetatas



$C_{26}H_{38}Cl_2N_{10}O_4$   
[56-95-1]

$M_r$  625.6

## DEFINITION

1,1'-(Hexane-1,6-diyl)bis[5-(4-chlorophenyl)biguanide] diacetate.

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

## CHARACTERS

Appearance: white or almost white, microcrystalline powder.

Solubility: sparingly soluble in water, soluble in ethanol (96 per cent), slightly soluble in glycerol and in propylene glycol.

## IDENTIFICATION

First identification: A.

Second identification: B, C, D.

A. Infrared absorption spectrophotometry (2.2.24).

Comparison: chlorhexidine diacetate CRS.

B. Dissolve about 5 mg in 5 mL of a warm 10 g/L solution of cetrimide R and add 1 mL of strong sodium hydroxide solution R and 1 mL of bromine water R. A deep red colour is produced.

C. Dissolve 0.3 g in 10 mL of a mixture of equal volumes of hydrochloric acid R and water R. Add 40 mL of water R, filter if necessary and cool in iced water. Make alkaline to titan yellow paper R by adding dropwise, and with stirring, strong sodium hydroxide solution R and add 1 mL in excess. Filter, wash the precipitate with water R until the washings are free from alkali and recrystallise from ethanol (70 per cent V/V) R. Dry at 100-105 °C. The residue melts (2.2.14) at 132 °C to 136 °C.

D. It gives reaction (a) of acetates (2.3.1).

## TESTS

**Chloroaniline:** maximum 500 ppm.

Dissolve 0.20 g in 25 mL of water R with shaking if necessary. Add 1 mL of hydrochloric acid R and dilute to 30 mL with water R. Add rapidly and with thorough mixing after each addition: 2.5 mL of dilute hydrochloric acid R, 0.35 mL of sodium nitrite solution R, 2 mL of a 50 g/L solution of ammonium sulfamate R, 5 mL of a 1.0 g/L solution of naphthylethylenediamine dihydrochloride R and 1 mL of ethanol (96 per cent) R, dilute to 50.0 mL with water R and allow to stand for 30 min. Any reddish-blue colour in the solution is not more intense than that in a standard prepared at the same time and in the same manner, using a mixture of 10.0 mL of a 0.010 g/L solution of chloroaniline R in dilute

hydrochloric acid R and 20 mL of dilute hydrochloric acid R instead of the solution of the substance to be examined.

**Related substances.** Liquid chromatography (2.2.29).

**Test solution.** Dissolve 0.200 g of the substance to be examined in the mobile phase and dilute to 100 mL with the mobile phase.

**Reference solution (a).** Dissolve 15 mg of chlorhexidine for performance test CRS in the mobile phase and dilute to 10.0 mL with the mobile phase.

**Reference solution (b).** Dilute 2.5 mL of the test solution to 100 mL with the mobile phase.

**Reference solution (c).** Dilute 2.0 mL of reference solution (b) to 10 mL with the mobile phase. Dilute 1.0 mL of this solution to 10 mL with the mobile phase.

**Column:**

- size:  $l = 0.2$  m,  $\varnothing = 4$  mm;
- stationary phase: octadecylsilyl silica gel for chromatography R (5  $\mu$ m).

**Mobile phase:** solution of 2.0 g of sodium octanesulfonate R in a mixture of 120 mL of glacial acetic acid R, 270 mL of water R and 730 mL of methanol R.

**Flow rate:** 1.0 mL/min.

**Detection:** spectrophotometer at 254 nm.

**Equilibration:** with the mobile phase for at least 1 h.

**Injection:** 10  $\mu$ L.

**Run time:** 6 times the retention time of chlorhexidine.

**System suitability; reference solution (a):**

- the chromatogram obtained is similar to the chromatogram supplied with chlorhexidine for performance test CRS in that the peaks due to impurity A and impurity B precede that due to chlorhexidine; if necessary, adjust the concentration of acetic acid in the mobile phase (increasing the concentration decreases the retention times).

**Limits:**

- total: not more than the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (2.5 per cent);
- disregard limit: the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (c) (0.05 per cent); disregard any peak with a relative retention time with reference to chlorhexidine of 0.25 or less.

**Loss on drying** (2.2.32): maximum 3.5 per cent, determined on 1.000 g by drying in an oven at 105 °C.

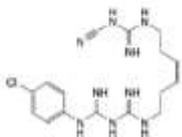
**Sulfated ash** (2.4.14): maximum 0.15 per cent, determined on 1.0 g.

**ASSAY**

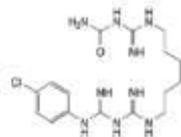
Dissolve 0.140 g in 100 mL of anhydrous acetic acid R and titrate with 0.1 M perchloric acid. Determine the end-point potentiometrically (2.2.20).

1 mL of 0.1 M perchloric acid is equivalent to 15.64 mg of  $C_{26}H_{44}Cl_2N_{12}O_{14}$ .

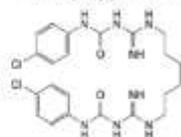
**IMPURITIES**



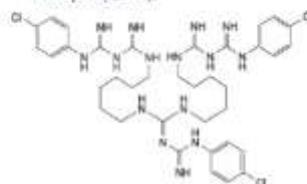
A. 1-(4-chlorophenyl)-5-[6-[[[4-cyanocarbamimidoyl]amino]hexyl]biguanide].



B. [6-[[[4-chlorophenyl]carbamimidoyl]carbamimidoyl]amino]hexyl]carbamimidoyl]urea.



C. 1,1'-(hexane-1,6-diylbis[iminocarbonimidoyl])bis[3-(4-chlorophenyl)urea].

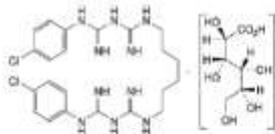


D. 1,1'-[[[4-chlorophenyl]carbamimidoyl]imino]methylene]bis[imino(hexane-1,6-diyl)]bis[5-(4-chlorophenyl)biguanide].

07/2013:0658

## CHLORHEXIDINE DIGLUCONATE SOLUTION

### Chlorhexidini digluconatis solutio



$C_{26}H_{44}Cl_2N_{12}O_{14}$   
[18472-51-0]

M, 838

**DEFINITION**

Aqueous solution of 1,1'-(hexane-1,6-diyl)bis[5-(4-chlorophenyl)biguanide] di- $\beta$ -gluconate.

**Content:** 190 g/L to 210 g/L.

**CHARACTERS**

**Appearance:** almost colourless or pale-yellowish liquid.

**Solubility:** miscible with water, with not more than 3 parts of acetone and with not more than 5 parts of ethanol (96 per cent).

**IDENTIFICATION**

**First identification:** A, B.

**Second identification:** B, C, D.

**A.** Infrared absorption spectrophotometry (2.2.24).

**Preparation:** to 1 mL, add 40 mL of water R, cool in iced water, make alkaline to titan yellow paper R by adding dropwise, and with stirring, strong sodium hydroxide

Додаток 2. Хімічний лабораторний посуд, фото з сайту  
[https://www.systopt.com.ua/article-vydy-laboratornogo-posudu-ta-jogo-pryznachennya?srsltid=AfmBOopGlaE1sYcNjrWjZg5yHwIJc9Pj\\_yYcrj0jH928p7qTie-qTDPF](https://www.systopt.com.ua/article-vydy-laboratornogo-posudu-ta-jogo-pryznachennya?srsltid=AfmBOopGlaE1sYcNjrWjZg5yHwIJc9Pj_yYcrj0jH928p7qTie-qTDPF)



Додаток 3. Терези лабораторні ТВЕ-0,21-0,001-а-2,  
фото з сайту  
[https://metrolog.com.ua/ua/product/laboratornie\\_vesi\\_tve02100012](https://metrolog.com.ua/ua/product/laboratornie_vesi_tve02100012)



### Анотація (Summary)

**Introduction.** Chlorhexidine is an antiseptic substance , which is part of various medicines, is in a salt-like form, most often in the form of bigluconate.

**Purpose of the study.** To develop a UV-spectrophotometric method for the quantitative determination of the API chlorhexidine in an aqueous solution.

**Research methods.** UV-spectrophotometry.

**Results.** The professional literature presents numerous methods for the quantitative determination of this API, but researchers mainly recommend finding the concentration of chlorhexidine by chromatographic methods (HPLC, TLC, LC). As objects of the study, we chose liquid dosage forms containing chlorhexidine bigluconate (the concentration of the active substance according to the instructions for medical use was 0.5 mg/ml). Based on previous scientific developments of Ukrainian scientists , spectrophotometric determinations were performed at a wavelength of 253 nm on a spectrophotometer of the SPECORD 200-222 U 214 brand. The concentration of the API was determined by the method of a calibration graph previously constructed for diluted standard solutions (the concentration of the solutions was within the range of 0.05-0.1 mg/ml, chlorhexidine bigluconate PSZ was used to prepare the solutions), the linear regression function had the form  $y = 8.4571 \cdot x + 0.0157$ . Chlorhexidine bigluconate solutions for the experimental part of the work were prepared by well-known standard methods of preparation and dilution of solutions . The method was checked for intra-laboratory accuracy. The stability of a chlorhexidine solution

with a concentration of 0.08 mg/ml was studied as a function of optical density A versus time for 60 minutes.

Conclusions. A method for quantitative UV-spectrophotometric determination of the API chlorhexidine bigluconate in a liquid dosage form has been developed, tested, and partially validated; the relative error of the average value does not exceed 5%.