



# Розробка методики кількісного визначення діючої речовини в очних краплях «Ангіолін» методом вискоелективної рідинної хроматографії

Л. І. Кучеренко<sup>1</sup>, Р. Р. Акопян<sup>1</sup>, О. О. Портна<sup>1</sup>, О. В. Хромильова<sup>1</sup>, І. В. Павлюк<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна, <sup>2</sup>Запорізький науково-дослідний експертно-криміналістичний центр МВС України

A – концепція та дизайн дослідження; B – збір даних; C – аналіз та інтерпретація даних; D – написання статті; E – редагування статті; F – остаточне затвердження статті

Одне з найпоширеніших захворювань очей – опікова травма, тому актуальним завданням фармації нині є створення нових офтальмологічних лікарських засобів, зокрема очних крапель.

Співробітники кафедри фармацевтичної, органічної та біоорганічної хімії Запорізького державного-медико-фармацевтичного університету під керівництвом професора І. А. Мазура синтезували нову сполуку, похідну 1,2,4-тріазолу – (S)-2,6-діаміногексанову кислоту 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетат. Вона характеризується протизапальною, ранозагоювальною та репаративною активностями.

**Мета роботи** – розроблення методики кількісного визначення діючої речовини в очних краплях «Ангіолін» методом вискоелективної рідинної хроматографії.

**Матеріали та методи.** Для дослідження використали рідинний хроматограф з УФ-детектором, колонку Hypersil ODS C-18, 250 × 4,6 мм із розміром часток 5 мкм.

**Результати.** Встановили, що вміст ангіоліну в 1 % очних краплях в серії 1 відповідає інтервалу 0,985–1,010 г. Отже, за вмістом діючої речовини ця серія відповідає вимогам Державної фармакопеї України.

**Висновки.** У результаті досліджень розроблено методику кількісного визначення діючої речовини в очних краплях «Ангіолін» методом вискоелективної рідинної хроматографії.

**Ключові слова:** очні краплі, похідні 1,2,4-тріазолу, аналіз, стандартизація, кількісне визначення, вискоелективна рідинна хроматографія.

**Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2023. Т. 16, № 3(43). С. 231-235**

## Development of a method of quantitative determination of the active substance in Angiolin eye drops by the method of high-performance liquid chromatography

L. I. Kucherenko, R. R. Akopian, O. O. Portna, O. V. Khromylova, I. V. Pavliuk

One of the most common eye diseases is a burn injury. Hence, one of the pressing challenges in the field of pharmacy today is the development of new ophthalmic medications, specifically eye drops. Researchers from the Department of Pharmaceutical, Organic, and Bioorganic Chemistry at Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, led by Professor I. A. Mazur, have successfully synthesized a novel compound. This compound is a derivative of 1,2,4-triazole, specifically (S)-2,6-diaminohexanoic acid 3-methyl-1,2,4-triazolyl-5-thioacetate. Notably, this compound demonstrates anti-inflammatory, wound-healing, and reparative activities.

**The aim** of the work is to develop a method of quantitative determination of the active substance in Angiolin eye drops by the method of high-performance liquid chromatography.

**Materials and methods.** The research employed a liquid chromatograph equipped with a UV detector. A column Hypersil ODS C-18 measuring 250 by 4.6 millimeters with a particle size of 5 microns was used.

**Results.** It was determined that the angiolin content in the 1 % eye drops in series 1 falls within the range of 0.985 to 1.010 grams. This indicates that, in terms of the active substance content, the studied series complies with the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine.

### ARTICLE INFO



<http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/288356>

UDC 615.457.074:543.544.5.068.7.062  
DOI: 10.14739/2409-2932.2023.3.288356

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice, 2023. 16(3), 231-235

**Key words:** eye drops, 1,2,4-triazole derivatives, analysis, standardization, quantitative determination, high performance liquid chromatography.

\*E-mail: [podium@bigmir.net](mailto:podium@bigmir.net)

Received: 31.08.2023 // Revised: 11.09.2023 // Accepted: 20.09.2023

**Conclusions.** As a result of the conducted research, a method for quantitatively determining the active substance in Angiolin eye drops using high-performance liquid chromatography was developed.

**Key words:** eye drops, 1,2,4-triazole derivatives, analysis, standardization, quantitative determination, high performance liquid chromatography.

**Current issues in pharmacy and medicine: science and practice, 2023. 16(3), 231-235**

За даними Міністерства охорони здоров'я України, офтальмологічні захворювання в Україні нині посідають шосте місце у структурі захворюваності. Зважаючи на тяжкість наслідків захворювань очей, високі соціальні витрати на компенсацію сліпоти та слабозорості, пацієнти, що мають цей вид патології, потребують постійної профілактики та лікування. Одне з найпоширеніших захворювань очей – опікова травма, що залишається найскладнішою клінічною та соціальною проблемою. За тяжкістю опікова травма органів зору посідає друге місце після проникних поранень у структурі уражень очей – її реєструють у 20,0–42,2 % випадків. Найбільша частка дорослого населення із цією патологією – особи працездатного віку, переважно чоловічої статі. У зв'язку з ситуацією, що склалася, в Україні зростає кількість ушкоджень органа зору, серед них – контузія та опікова травма, що вийшли на перше місце, їх діагностують у 50–64 % випадків.

Перспективним напрямом у сучасній медицині та фармації є створення нових офтальмологічних лікарських засобів, зокрема очних крапель. Саме вони залишаються найпоширенішою в офтальмологічній практиці лікарською формою завдяки традиційності виробництва та зручності застосування.

Особливий інтерес викликають сполуки, синтезовані співробітниками кафедри фармацевтичної, органічної та біоорганічної хімії Запорізького державного медико-фармацевтичного університету під керівництвом професора І. А. Мазура. Так, синтезовано нову сполуку, похідну 1,2,4-тріазолу – (S)-2,6-діаміногексанову кислоту 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетат. Її патентована назва – ангіолін. Сполука характеризується протизапальною, ранозагоювальною та репаративною активностями [1,2,3].

Нині для стандартизації готових лікарських форм і заводського, й аптечного виготовлення все частіше використовують фізико-хімічні методи дослідження. У попередніх дослідженнях розроблено методику кількісного визначення очних крапель «Ангіолін» методом спектрофотометрії. Крім того, вивчивши відомості наукової літератури щодо стандартизації діючих речовин, які входять до складу готових лікарських форм, встановили: все частіше для стандартизації основної діючої речовини та допоміжних речовин використовують метод високо-ефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Цей метод аналізу дає змогу одночасно здійснити якісне та кількісне визначення діючої речовини у лікарських формах [4].

## Мета роботи

Розроблення методики кількісного визначення діючої речовини в очних краплях «Ангіолін» методом високо-ефективної рідинної хроматографії.

## Матеріали та методи дослідження

Для здійснення дослідження виготовили шість серій очних крапель. Як діючу речовину використали субстанцію ангіолін (виробник – Державне підприємство «Завод хімічних реактивів» Науково-технологічного комплексу «Інститут монокристалів» НАН України, серія 2451117) і робочий стандартний зразок ангіоліну (виробник ДП «Завод хімічних реактивів» Науково-технологічного комплексу «Інститут монокристалів» НАН України, Україна).

Як допоміжні речовини використали метилцелюлозу (серія 26101197551, виробник – Вайсенборн, ФРН), натрію хлорид, воду для ін'єкцій.

Дослідження здійснили за допомогою рідинного хроматографа з УФ-детектором. Використали колонку Nupersil ODS C-18, 250 × 4,6 мм із розміром часток 5 мкм.

## Результати

У попередніх дослідженнях розробили методику кількісного визначення очних крапель «Ангіолін» методом спектрофотометрії. Для розроблення методики аналізу очних крапель методом високо-ефективної рідинної хроматографії застосували відому методику кількісного визначення морфолінію тіазатату. Під час роботи отримали низьку кількість теоретичних тарілок і невідповідність симетрії піків, тому зробили висновок, що ця методика недостатньо чутлива, і визначення за нею не можливе [5,6,7,8,9,10].

Надалі для збільшення кількості теоретичних тарілок застосовували різні рухомі фази, зокрема ацетонітрил-буферний розчин 10:90. Під час роботи з ацетонітрил-буферним розчином одержали негативний результат. Крім того, при використанні рухомої фази, де замість калію дигідрофосфату додали літію дигідрофосфат, виявили, що кількість теоретичних тарілок ставала меншою за 2500. Тому запропоновано іншу методику кількісного визначення діючої речовини ангіолін ((S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетату) в очних краплях «Ангіолін» методом високо-ефективної рідинної хроматографії.

Так, розробили методику визначення діючої речовини в 1 % очних краплях «Ангіолін», що наведена далі.

**Випробований розчин.** 5,0 мл лікарського засобу (очні краплі «Ангіолін») доводять водою Р до 50,0 мл, перемішують. 10,0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою до 50,0 мл, перемішують.

**Розчин порівняння (а).** Близько 0,05 г (точна наважка) робочого стандартного зразку ангіоліну розчиняють у воді Р, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 50,0 мл і перемішують.

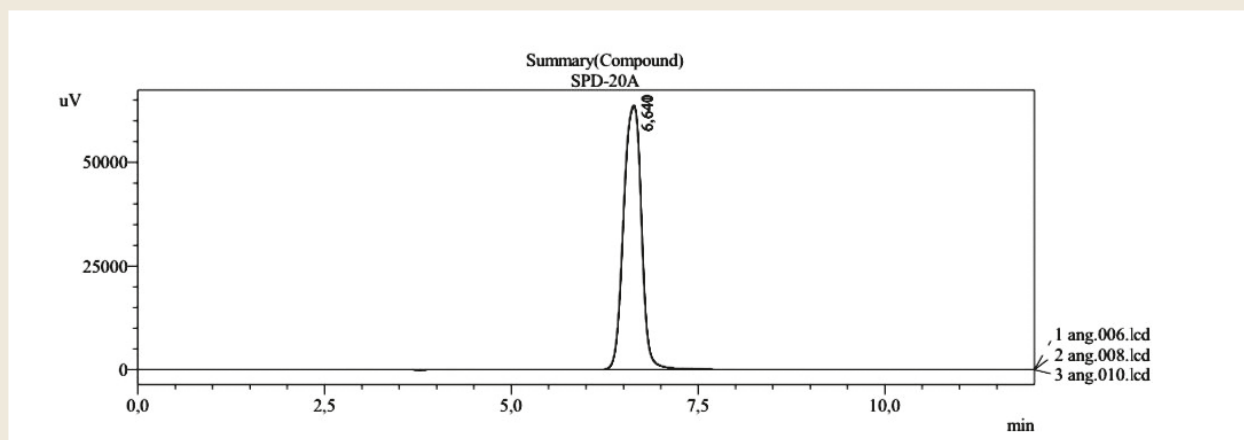


Рис. 1. Хроматограма робочого стандартного зразка ангіоліну.

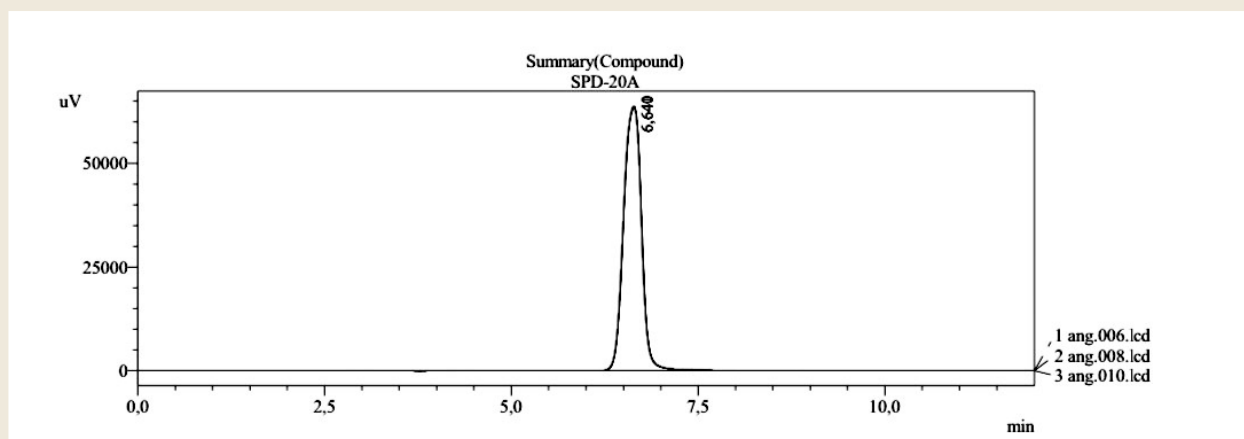


Рис. 2. Хроматограма 1 % очних крапель «Ангіолін» (серія № 1).

**Розчин порівняння (b).** 10,0 мл розчину порівняння (a) доводять рухомою фазою до 50,0 мл і перемішують.

Хроматографування здійснюють на рідинному хроматографі з УФ-детектором за таких умов:

- колонка Hypersil ODS C-18 250 × 4,6 мм з розміром часток 5 мкм або аналогічна, що відповідає вимогам тесту «Перевірка придатності хроматографічної системи»;
- рухома фаза: суміш ацетонітрил Р – фосфатний буферний розчин рН 3,0 (5:95), дегазована будь-яким методом. Фосфатний буферний розчин готують так: 2,0 г калію дигідрофосфату безводного Р розчиняють у 1000 мл води Р, безперервно перемішуючи, додають фосфорну кислоту, розведену Р, до одержання розчину з рН 3,0;
- швидкість рухомої фази – 1,0 мл/хв;
- температура колонки – 300 °С;
- детектування – спектрофотометричне за довжини хвилі 246 нм;
- об'єм проби, що вводять – 20 мкл.

Хроматографують випробовуваний розчин і розчин порівняння (b), одержуючи не менше ніж три хроматограми для кожного.

Зразки хроматограм, що отримали, наведено на рис. 1 і 2.

Вміст ангіоліну в 1 % очних краплях (лікарському засобі) в відсотках розраховують за формулою:

$$X = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 50 \cdot 10 \cdot 50 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot 5 \cdot 50 \cdot 10 \cdot 50 \cdot 100} = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot P \cdot 100 \%}{S_0 \times 500},$$

де  $S_1$  – середнє значення площ піків ангіоліну, розраховане за хроматограмами випробовуваного розчину;

$S_0$  – середнє значення площ піків ангіоліну, розраховане за хроматограмами порівняння (b);

$m_0$  – наважка СЗ ангіоліну, мг;

$P$  – вміст ангіоліну у стандартному зразку, який наведений у сертифікаті, %.

Результати кількісного визначення очних крапель (серія 1) наведено в таблиці 1.

### Обговорення

Під час роботи встановили, що вміст ангіоліну в 1 % очних краплях в серії 1 відповідає інтервалу 0,985–1,010 г. Тобто за вмістом діючої речовини серія, яку дослідили, відповідає вимогам Державної фармакопеї України.

Надалі проаналізували інші 5 серій очних крапель «Ангіолін», які також відповідали фармакопейним ви-

Таблиця 1. Кількісне визначення 1 % очних крапель «Ангіолін» у серії 1 методом ВЕРХ

Наважка, г, мл	Площа піка, S	Середня площа піка	Відсотковий вміст	Статистика
5,0 мл	1001542	1016703	0,9850	X = 0,998983 S <sup>2</sup> = 0,000108 S = 0,010391 δX = 0,010393
5,0 мл	1004502	1016703	0,9880	
5,0 мл	1014669	1016703	0,9998	
5,0 мл	1016804	1016703	1,0001	
5,0 мл	1026870	1016703	1,0100	
5,0 мл	1026870	1016703	1,0100	
0,0552 г	1051782	1053753	1,0007	

могам за вмістом діючої речовини, а кількість діючої речовини відповідала інтервалу 0,985–1,010 г. Згідно з результатами, що одержали, методика кількісного визначення діючої речовини в 1 % очних краплях є відтворюваною, надалі після валідації може бути застосована під час стандартизації розробленої лікарської форми.

## Висновки

1. Під час роботи виготовили очні краплі «Ангіолін», які містять діючу речовину ангіолін і допоміжні речовини: натрію хлорид, метилцелюлозу, воду для ін'єкцій.

2. Встановили оптимальні умови для розроблення методики кількісного визначення діючої речовини в очних краплях «Ангіолін» методом високоефективної рідинної хроматографії.

3. У результаті досліджень розробили методку кількісного визначення діючої речовини в очних краплях «Ангіолін» методом високоефективної рідинної хроматографії.

**Перспективи подальших досліджень.** Надалі плануємо валідацію розробленої методики кількісного визначення очних крапель «Ангіолін» за такими показниками: специфічність, лінійність, діапазон застосування, точність, правильність і робастність.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

**Conflicts of interest:** authors have no conflict of interest to declare.

## Відомості про авторів:

Кучеренко Л. І., д-р фарм. наук, професор, зав. каф. фармацевтичної, органічної та біоорганічної хімії, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0003-2229-0232](https://orcid.org/0000-0003-2229-0232)

Акопян Р. Р., д-р філософії, асистент каф. фармацевтичної, органічної та біоорганічної хімії, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0002-8076-4304](https://orcid.org/0000-0002-8076-4304)

Портна О. О., канд. фарм. наук, доцент каф. фармацевтичної, органічної та біоорганічної хімії, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0002-4752-1888](https://orcid.org/0000-0002-4752-1888)

Хромильова О. В., д-р фарм. наук, доцент каф. фармацевтичної, органічної та біоорганічної хімії, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0002-5274-9676](https://orcid.org/0000-0002-5274-9676)

Павлюк І. В., канд. біол. наук, старший судовий експерт сектора дослідження наркотичних засобів, психотропних речовин та їх аналогів і прекурсорів відділу досліджень матеріалів і виробів, Запорізький науково-дослідний експертно-криміналістичний центр МВС України.

ORCID ID: [0000-0002-6423-8777](https://orcid.org/0000-0002-6423-8777)

## Information about authors:

Kucherenko L. I., PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Pharmaceutical, Organic and Bioorganic Chemistry, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

Akopian R. R., PhD, Assistant of the Department of Pharmaceutical, Organic and Bioorganic Chemistry, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

Portna O. O., PhD, Associate Professor of the Department of Pharmaceutical, Organic and Bioorganic Chemistry, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

Khromylova O. V., PhD, DSc, Associate Professor of the Department of Pharmaceutical, Organic and Bioorganic Chemistry, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

Pavliuk I. V., PhD, Senior Forensic Expert of the Research Sector of Narcotic Drugs, Psychotropic Substances and their Analogues and Precursors of the Materials and Products Research Department, Zaporizhzhia Research Expert and Forensic Center of the Ministry of Internal Affairs of Ukraine.

## References

- Belenichev, I. F., Kucherenko, L. I., Mazur, I. A., Akopyan, R. R., & Portnaya, E. A. (2019). Experimental assessment of the specific activity of a new dosage form of angiolin in cataract modeling. *Biological Markers and Guided Therapy*, 6(1), 113-120. <https://doi.org/10.12988/bmgt.2019.91013>
- Mazur, I. A., Akopian, R. R., Cherkovska, L. H., Pavliuk, I. V., & Skoryna, D. Yu. (2020). Rozrobka metodyky standartyzatsii ochnykh krapel Anhiolin [Development of standardization methods of Angiolin eye drops]. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*, 13(3), 383-387. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2020.3.216214>
- Kucherenko, L. I., Mazur, I. A., Akopian, R. R., Portna, O. O., & Tkachenko, H. I. (2021). Naukove obgruntuvannya kontsentratsii dopomizhnykh rehovyn dla vyhotovlennia ochnykh krapel Anhiolin [Scientific substantiation of the concentration of excipients for the manufacture of eye drops Angiolin]. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*, 14(1), 52-55. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2021.1.226773>
- State Enterprise Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center of Medicines Quality. (2008, February 1). *Derzhavna Farmakopeia Ukrainy. Dopovnennia 2* [The State Pharmacopoeia of Ukraine] (1st ed., Suppl. 1). Kharkiv: State Enterprise Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center of Medicines Quality. [in Ukrainian].
- Grizodub, A. I., Evtifeeva, O. A., Proskurina, K. I., & Bezumova, O. V. (2014). Standartizovannaya protsedura validatsii spektrofotometri-cheskikh metodik kolichestvenno opredeleniya lekarstvennykh sredstv v variante metoda pokazatelya pogloshcheniya. Soobshchenie 1 [A standardized procedure for the validation of spectrophotometric methods for the quantitative determination of drugs in a variant of

- the absorption index method. Message 1]. *Farmakom*, (1), 29-39. [in Russian].
6. State Enterprise Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center of Medicines Quality. (2011). *Derzhavna Farmakopeia Ukrainy. Dopovnennia 4* [The State Pharmacopoeia of Ukraine] (1st ed., Suppl. 4). Kharkiv: State Enterprise Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center of Medicines Quality. [in Ukrainian].
  7. Grizodub, A. I. (2016). *Standartyzovani protsedury validatsii metodyk kontroliu yakosti likarskykh zasobiv* [Standardization of the procedure for validation of methods of quality control of drugs]. State Enterprise "Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center for Drug Quality". [in Ukrainian].
  8. Georgievskiy, G. V. (2013). *Analitychne zabezpechennia syntezy, standartyzatsii ta orhanizatsii vyrobnytstva pokhidnykh 1,2,4-tryazolu ta yikh likarskykh form* [Analytical software for the synthesis, standardization and organization of manufacturing of derivatives of 1,2,4-triazole and their drug dosage forms]. (Doctoral Dissertation, National University of Pharmacy, Kharkiv). [in Ukrainian]. <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0513U001273/>
  9. Pertsev, I. M. (Ed.). (2010). *Dopomizhni rechovyiny v tekhnologii likiv: vplyv na tekhnolohichni, spozhyvchi, ekonomichni kharakterystyky i terapevtychnu efektyvnist*. Kharkiv: Zoloti storinky. [in Ukrainian].
  10. Georgievskii, V. P., Georgievskii, G. V., Zinchenko, A. A., Kulikov, A. Yu., Nazarova, E. S., & Kolisnyk, A. V. (2016). *Khromatograficheskie metody v analiticheskom obespechenii sozdaniya i kontrolya kachestva lekarstvennykh sredstv v Ukraine*. Kharkiv : NTMT. [in Russian].