

УДК 577.15 (088.8)

**С.С. Декіна<sup>1</sup>, І.І. Романовська<sup>1</sup>, О.В. Севастьянов<sup>1</sup>,  
Г.В. Мальцев<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України,  
Люстдорфська дор., 86, Одеса, 65080,  
тел. +38(048)7662044, e-mail: s.dekina@gmail.com

<sup>2</sup>ОДО «Інтерхім», Люстдорфська дор., 86, Одеса, 65080  
тел. +38(048) 777 2950

## **АНАЛІЗ КОМПОНЕНТІВ ТАБЛЕТКОВИХ СУМІШЕЙ З ІММОБІЛІЗОВАНИМ ЛІЗОЦИМОМ**

**Мета.** Дослідження впливу компонентів таблеткових сумішей з іммобілізованим лізоцимом на визначення вмісту діючих речовин при створенні біологічно активної добавки. **Методи.** Гідролітичну активність лізоциму визначали спектрофотометрично, використовуючи як субстрат клітини *Micrococcus lysodeikticus* 2665. Вміст білка визначали за методом Лоурі в модифікації Хартрі, кверцетину – із застосуванням хлориду цирконію (IV), біглюконат хлоргексидину – за реакцією з  $\alpha$ -нафтолом і хроматомас-спектрометрично. Таблеткові суміші з іммобілізованим лізоцимом отримували за технологією вологого гранулювання. **Результати.** З використанням методів спектрофотометрії кількісно визначені кверцетин і лізоцим у складі таблетованих сумішей. Показано, що хлоргексидину біглюконат визначається кількісно за відсутності інших компонентів, тоді як додавання інших складових ускладнюють його кількісний аналіз. Так, в присутності лізоциму визначається 80,22% аналіту, кверцетину – 90,52%, маніту – 89,82%, лактози – 30,87%, сахарози – 40,97%, полівінілпіролідону – 91,34%, цитрату кальцію – 52,99%. **Висновки.** Показано, що лізоцим і кверцетин кількісно визначаються в багатокомпонентних таблеткових сумішах з іммобілізованим ферментом. Виявлено, що лізоцим, кверцетин, маніт, полівінілпіролідон, сахароза і лактоза заважають кількісному визначенню хлоргексидину біглюконата методами спектрофотометрії і хроматомас-спектрометрії як в однофакторному, так і в багатофакторному експерименті.

*Ключові слова:* лізоцим, кверцетин, хлоргексидину біглюконат, методи визначення, таблеткові суміші.

Враховуючи зростаючу резистентність мікроорганізмів до антибіотиків, гідролітичний фермент лізоцим (КФ 3.2.1.17), який має антибактеріальну, протизапальну дію і є неспецифічним фактором імунітету, знаходить все більш широке застосування в медицині у різних лікарських формах: ранові покриття, капсули, гелі [6, 14].

Розробка таблетованої форми іммобілізованого лізоциму з застосуванням полімерних матриць для стабілізації ферменту; підсилення його протизапальної і антисептичної дії введенням природного поліфенолу – кверцетину і хлоргексидину біглюконату є актуальним напрямом досліджень в області фармацевтичної біотехнології. Кверцетин є одним з найбільш поширених флавоноїдів з високою терапевтичною активністю, унікальною протизапаль-



ною, капіляропротекторною, антиоксидантною дією [10]. Застосування біотехнологічних підходів іммобілізації лізоциму сприяє стабільності ензиму, пролонгованості дії, забезпечує мукоадгезивні властивості, що подовжують час контакту таблеток зі слизовою оболонкою порожнини рота.

В попередніх дослідженнях [7] були розроблені таблеткові суміші з іммобілізованим лізоцимом і кверцетином з використанням полімерних носіїв різного походження та структури. Аналіз біохімічних і фізико-хімічних властивостей іммобілізованого лізоциму показав переваги використання желатину, натрієвої солі карбоксиметилцелюлози, полівінілпіролідону як матриць. Іммобілізація сприяла розширенню рН-діапазону активності ферменту і підвищенню стабільності в кислому середовищі. Однак слід зазначити, що препарат має багатокомпонентний склад, і визначення всіх діючих речовин у присутності інших, в тому числі допоміжних компонентів, представляє непросте завдання.

**Мета роботи** – дослідження впливу компонентів таблеткових сумішей з лізоцимом на визначення вмісту діючих речовин при створенні біологічно активної добавки.

### Матеріали і методи

У роботі використовували лізоцим білка курячого яйця (КФ 3.2.1.17) («Sigma-Aldrich», Німеччина, М.м. 14,4 кДа, 20000 од/мг), клітини *Micrococcus lysodeikticus* 2665 («Sigma-Aldrich», Німеччина), кверцетин («Sigma-Aldrich», Німеччина), хлоргексидину біглюконат (ООО «Фармація», Україна), желатин, натрієва сіль карбоксиметилцелюлози (РВІ, Бельгія), полівінілпіролідон (Повідон К-17, Zhejiang, Китай). Виготовлення таблеткових сумішей з іммобілізованим лізоцимом методом вологого гранулювання проводили згідно [7].

Активність лізоциму визначали бактеріолітичним методом (субстрат – клітини *Micrococcus lysodeikticus* 2665) [14]. За одиницю активності ензиму приймали таку його кількість, що знижує оптичну густину суспензії клітин на 0,001 за 1 хв. Вміст білка контролювали методом Лоурі-Хартрі [11]. Як контроль використовували грануляти без лізоциму. Кверцетин визначали згідно [1, 9]. Калібрувальну криву будували за кверцетином моногідратом.

Кількісний аналіз вмісту хлоргексидину біглюконату (ХГБГ) проводили спектрофотометрично згідно [12], а також хроматомас-спектрометричним методом у зразку грануляту D (табл. 1). Дослідження проводилося в комбінованій системі ВЕРХ-МС – рідинний хроматограф 1260 Infinity з діод-матричним детектором і детектором 6530 Accurate Mass Q-TOF (Agilent Technologies, США) в наступних умовах: колонка з неіржавіючої сталі розміром 100 мм × 4,6 мм, заповнена силікагелем октадецилсилільним для хроматографії з розміром частинок 3,5 мкм; рухома фаза: ацетонітрил – метанол – амонійно-форміатний буферний розчин з рН = 4,0 (35:20:45 об/об); швидкість елюювання 0,50 см<sup>3</sup>/хв; температура колонки 35 °С; об'єм інжекції 0,01 см<sup>3</sup>; час проведення аналізу: для градувальних розчинів 5 хв; для досліджуваних розчинів 25 хв; детектування: за іонним струмом (спосіб іонізації – подвійний електро-спрей при атмосферному тиску; температура газоносія – 350 °С; енергія фрагментації – 200 В; тиск розпилювача – 45 psiq; напруга на капіляри – 4500 В);



спектрофотометричне (реєстрація сигналу при довжині хвилі 260 нм).

Для калібрувальної залежності в мірні колби (25,0 см<sup>3</sup>) вносили по 0,50; 0,75; 1,00; 1,25 і 1,50 см<sup>3</sup> 0,05% розчину хлоргексидину біглюконату, доводили водою до мітки і перемішували. Отримані розчини хроматографували в зазначених вище умовах, отримуючи результати по трьох паралельних інжекціях. Для аналізу таблетованої суміші наважку грануляту (58,8 мг) вносили в мірну колбу, місткістю 10,0 см<sup>3</sup>, додавали 6 см<sup>3</sup> води і ставили в УЗ-баню на 2 хв. Потім доводили водою до мітки, перемішували і фільтрували через шприцевий мембранний фільтр ПТБЕ 0,45 мкм, відкидаючи перші 2 см<sup>3</sup> фільтрату. Хроматографували в умовах, зазначених вище в 5 наважках масою 58,8 мг; 61,7 мг; 59,3 мг; 60,4 мг; 58,9 мг. Результати зазначені для наважки 58,8 мг.

Дані експериментів піддавали статистичному опрацюванню згідно [5]. Оцінювали ступінь вірогідності різниці результатів досліджень при кількості повторень n=5. Ймовірність відмінностей між середніми значеннями визначали за критерієм Стюдента на рівні значущості не менше 95% ( $M \pm m$  при  $p \leq 0,05$ ).

### Результати та обговорення

Розробляючи технологію отримання таблеткових сумішей, особливу увагу приділяли методам кількісного аналізу діючих компонентів. Слід зазначити, що чим більше компонентів у складі препарату, тим складніше їх кількісне визначення. Допоміжними компонентами були обрані речовини, що часто використовуються у фармацевтичній промисловості, а саме, лактоза, кальцію цитрату тригідрат (наповнювачі), маніт (дезінтегрант), ароматизатор «лимон» і сахароза (смакові добавки), карбоксиметилцелюлози натрієва сіль (NaКМЦ), полівінілпіролідон (ПВП) і желатин (зв'язуючі речовини і матриці для іммобілізації лізоциму).

Кількісний склад компонентів таблеткових сумішей, що аналізували представлено в табл. 1

Таблиця 1

#### Склад гранулятів з іммобілізованим лізоцимом

Table 1

#### The composition of granules with immobilized lysozyme

Функція компонента	Найменування компонента	Вміст компонентів (мг)				
		Гранулят А	Гранулят В	Гранулят С	Гранулят Д	Гранулят Е
1	2	3	4	5	6	7
Діючі речовини	Лізоцим	10,0	10,0	10,0	10,0	15,0
	Кверцетин	2,0	2,0	2,0	2,0	5,0
	Хлоргексидину біглюконат	2,0	2,0	2,0	2,0	5,0
Наповнювачі	Лактоза	114,9	154,5	160,0	164,1	-
	Кальцію цитрат тригідрат	-	-	-	-	360,0
Деинтегрант	Маніт	17,9	17,9	17,9	17,9	-



## Продовження таблиці

1	2	3	4	5	6	7
Смакові добавки	Ароматизатор «Лимон»	0,6	0,6	0,6	0,6	1,2
	Сахароза	-	-	-	-	3,0
Зв'язуючі речовини*	NaКМЦ	-	-	4,5	0,4	-
	Повідон К-17	50	10	-	-	-
	Желатин	-	-	-	-	210,0
Всього		200,0	200,0	200,0	200,0	600,0

Примітка. \*Для сумішей А, В застосовували повідон К-17 (5% водний розчин полівінілпіролідону); для сумішей С, D – 1,5%, 0,1% водні розчини NaКМЦ, відповідно, для суміші Е – 5% желатин.

Note. \*For mixtures A, B povidone K-17 (5% aqueous solution of polyvinylpyrrolidone) was used; for mixtures C, D – 1.5%, 0.1% aqueous NaCMC solutions, respectively, for mixture E – 5% gelatin.

Кількісне визначення лізоциму полягало в аналізі білка і гідролітичної активності. Слід зазначити, що жодних труднощів при визначенні ензиму не виникало ні в одному з досліджуваних гранулятів. У всіх випадках досліджувані параметри виявлялися кількісно. Результати визначення лізоциму в гранулятах представлені в таблиці 2.

Таблиця 2

## Визначення лізоциму в гранулятах

Table 2

## Determination of lysozyme in granulates

Гранулят*	Вміст білка, мг		Гідролітична активність, од/мг ферменту	
	Внесено	Знайдено	Вихідна	У грануляті
A	10	9,98±0,49 <i>P**&lt;0,05</i>	20000	19000±870 <i>P***&lt;0,05</i>
B	10	9,99±0,51 <i>P**&lt;0,05</i>	20000	19160±900 <i>P***&lt;0,05</i>
C	10	9,98±0,39 <i>P**&lt;0,05</i>	20000	19300±980 <i>P***&lt;0,05</i>
D	10	9,97±0,43 <i>P**&lt;0,05</i>	20000	19830±895 <i>***P&lt;0,05</i>
E	15	14,72±0,65 <i>P**&lt;0,05</i>	20000	19750±920 <i>P***&lt;0,05</i>

Примітка. \*Відповідає грануляту у табл. 1; \*\*ймовірність відмінностей з визначення білка в грануляті; \*\*\*ймовірність відмінностей з визначення гідролітичної активності лізоциму в грануляті.

Note. \*Corresponds to the granulate number in Table 1; \*\*the significance of differences of protein determination in granulate; \*\*\*the probability of differences on determination of hydrolytic activity of lysozyme in granulate.



З метою кількісного визначення кверцетину використовують комплекс фізико-хімічних методів: хроматографічні, спектрофотометричні, електрохімічні, електрофоретичні й інші методи аналізу [2–4, 13]. Високою специфічністю характеризується метод визначення кверцетину з хлорокисом цирконію [1, 9]. В таблиці 3 наведені результати аналізу вмісту кверцетину в гранулятах різного складу. У всіх випадках кверцетин визначається кількісно, як і лізоцим.

Таблиця 3

## Визначення кверцетину в гранулятах

Table 3

## Determination of quercetin in granules

Гранулят	Вміст кверцетину, мг	
	Внесено	Знайдено
A	2	1,93±0,09 <i>P*</i> <0,05
B	2	1,97±0,08 <i>P*</i> <0,05
C	2	1,96±0,11 <i>P*</i> <0,05
D	2	1,97±0,09 <i>P*</i> <0,05
E	5	4,70±0,15 <i>P*</i> <0,05

Примітка. \*Ймовірність відмінностей з визначення кверцетину в грануляті  
Note. \* Probability of differences for the determination of quercetin in granules

Хлоргексидин – лікарський препарат, антисептик, в готових лікарських формах використовується у вигляді біглюконату (*Chlorhexidini bigluconas*). Для визначення хлоргексидина біглюконату користуються як титриметричними (неводне титрування), так і спектрофотометричними та хроматографічними методами. Оскільки спектрофотометрично за реакцією з  $\alpha$ -нафтолом у таблеткових сумішах хлоргексидину біглюконат визначався тільки на 30,9%, досліджували вплив окремих компонентів на його визначення. В монофакторному експерименті методика аналізу хлоргексидину у гранулятах за роботою Kusaka Y. [12] також не дозволила його кількісно визначити (табл. 4).

Виходячи з даних, наведених в таблиці 4, хлоргексидину біглюконат кількісно визначається за відсутності інших компонентів з високим ступенем достовірності. Однак у складах гранулятів супутні компоненти достовірно впливають на його визначення. Так, в присутності лізоциму визначається 80,22% хлоргексидину біглюконату, кверцетину – 90,52%, маніту – 89,82%, лактози всього лише 30,87%, сахарози – 40,97%, полівінілпіролідону – 91,34%, цитрату Са – 52,99%.

Визначення хлоргексидину біглюконату хроматомас-спектрометричним методом проводили в зразку гранулята D (табл. 1). На рисунках 1 і 2 представлені електронний спектр поглинання і мас-спектр хлоргексидину біглюконату. В УФ-спектрі спостерігається два максимуми при 200 нм і 260 нм.



Таблиця 4

Визначення хлоргексидину в присутності компонентів таблетованих сумішей

Table 4

Determination of chlorhexidine in the presence of the components of tablets mixtures

Сполука	Мольне співвідношення сполука / ХГБГ (внесено сполуки)	Визначений вміст ХГБГ, мкг (%)
ХГБГ за відсутності інших компонентів	– (200 мкг)	195,05±3,74 мкг (100%) P* < 0,05
Лізоцим	3,22·10 <sup>-4</sup> /1 (1 мг)	155,46±3,54 (80,22%) P** < 0,05
Кверцетин	2,96·10 <sup>-2</sup> /1 (1,94 мкг)	176,56±5,64 (90,52%) 0,02 < P** < 0,01
Маніт	45,09/1 (1,785 мг)	175,19±4,01 (89,82%) 0,001 < P** < 0,002
Лактоза·Н <sub>2</sub> О	217,99/1 (17,5 мг)	60,22±1,81 (30,87%) P** < 0,001
Ароматизатор	– (63 мкг)	192,09± (98,48%) P** > 0,1
Повідон К-17 (полівінілпіролідон)	7,92·10 <sup>-3</sup> /1 (30 мкг)	178,15 (91,34%) 0,05 < P** < 0,1
Цитрат Сатетрагідрат, твердий	110,14/1 (14 мг тетрагідрату)	103,15±6,96 (52,99%) P** < 0,05
Сахароза	217,99/1 (2,0 мг)	79,75 ± 6,69 (40,97%) P** < 0,05
Желатин	– (5,0 мг)	465,85±9,49 мкг (93,17%) P** < 0,05

Примітка: P\* – ймовірність відмінностей з визначення ХГБГ за відсутності компоненту суміші, P\*\* – ймовірність відмінностей між визначеннями ХГБГ в присутності компоненту суміші. Мольні відношення були згідно таких у таблеткових сумішах.

Note: P\* – the probability of differences of CHDG definitions in the absence of a component of the mixture; P\*\* – the probability of differences of CHDG definitions in the presence of a component of the mixture. The molar ratios were as in tablet formulations.

У мас-спектрі спостерігаються пік протонованого молекулярного йона хлоргексидину ( $M^+H^+$ ) = 505.2124 m/z, а також піки осколкових йонів.

Градувальний графік залежності площі піка хлоргексидину від концентрації наведено на рис. 3.

Хроматограми відповідних градувальних розчинів наведені на рис. 4.

При перших випробуваннях бралися наважки з розрахунку, що в препараті міститься внесена кількість аналізованої сполуки. Однак при цьому отримували значення площі піка хлоргексидину, що виходять за нижню точку градувального графіка. При наступних випробуваннях наважки брали з таким розрахунком, щоб значення площі піка хлоргексидину перебували в градувальному інтервалі. Хроматограма і мас-спектр хлоргексидину в уже згадуваному грануляті представлені на рис. 5, 6.

У таблиці 5 представлені результати визначення вмісту хлоргексидину біглоконату в грануляті складу № 4.



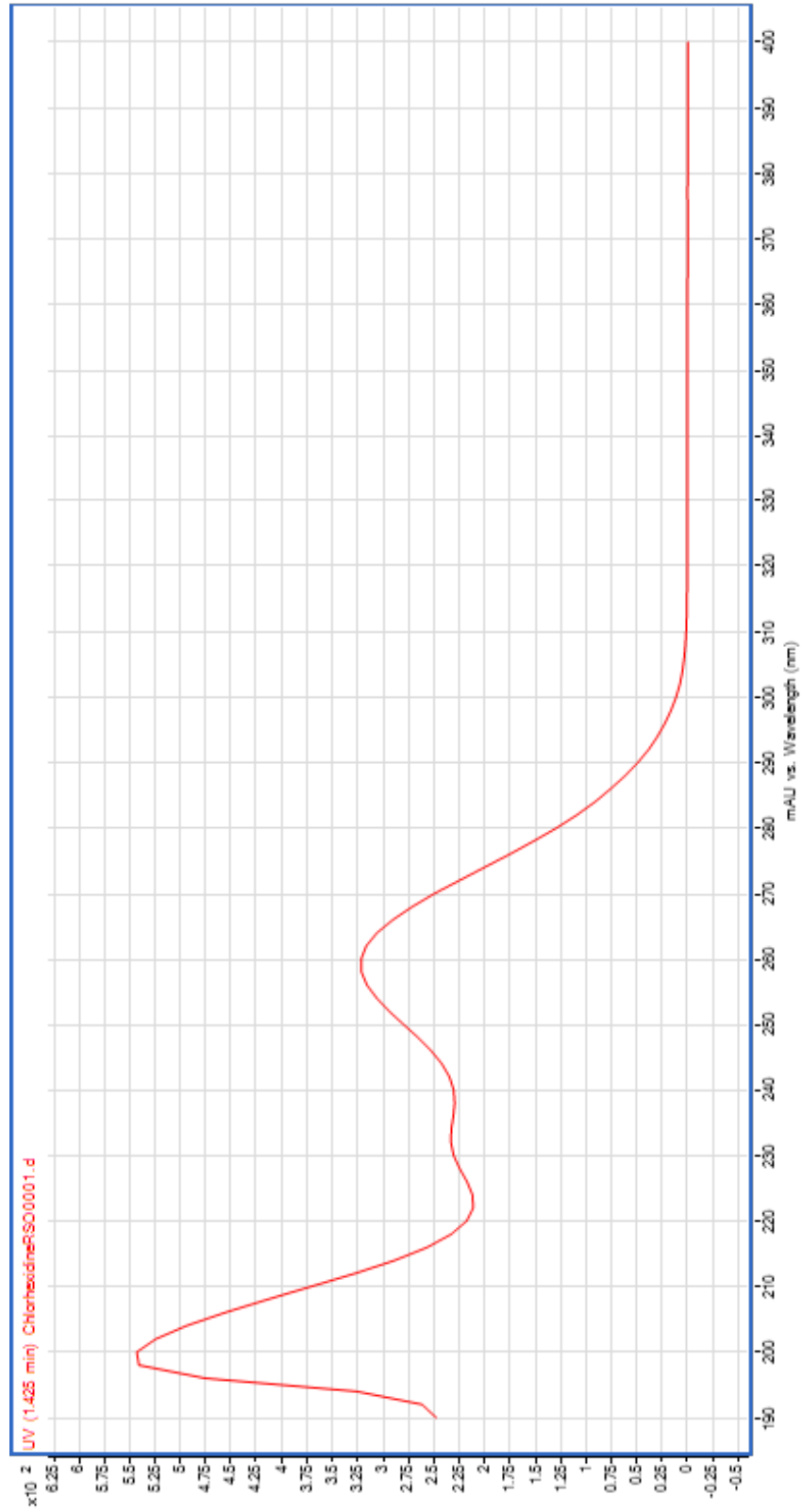


Рис. 1 УФ спектр хлоргексидину біглоконату  
Fig. 1 UV spectrum of the peak chlorhexidine bigluconate





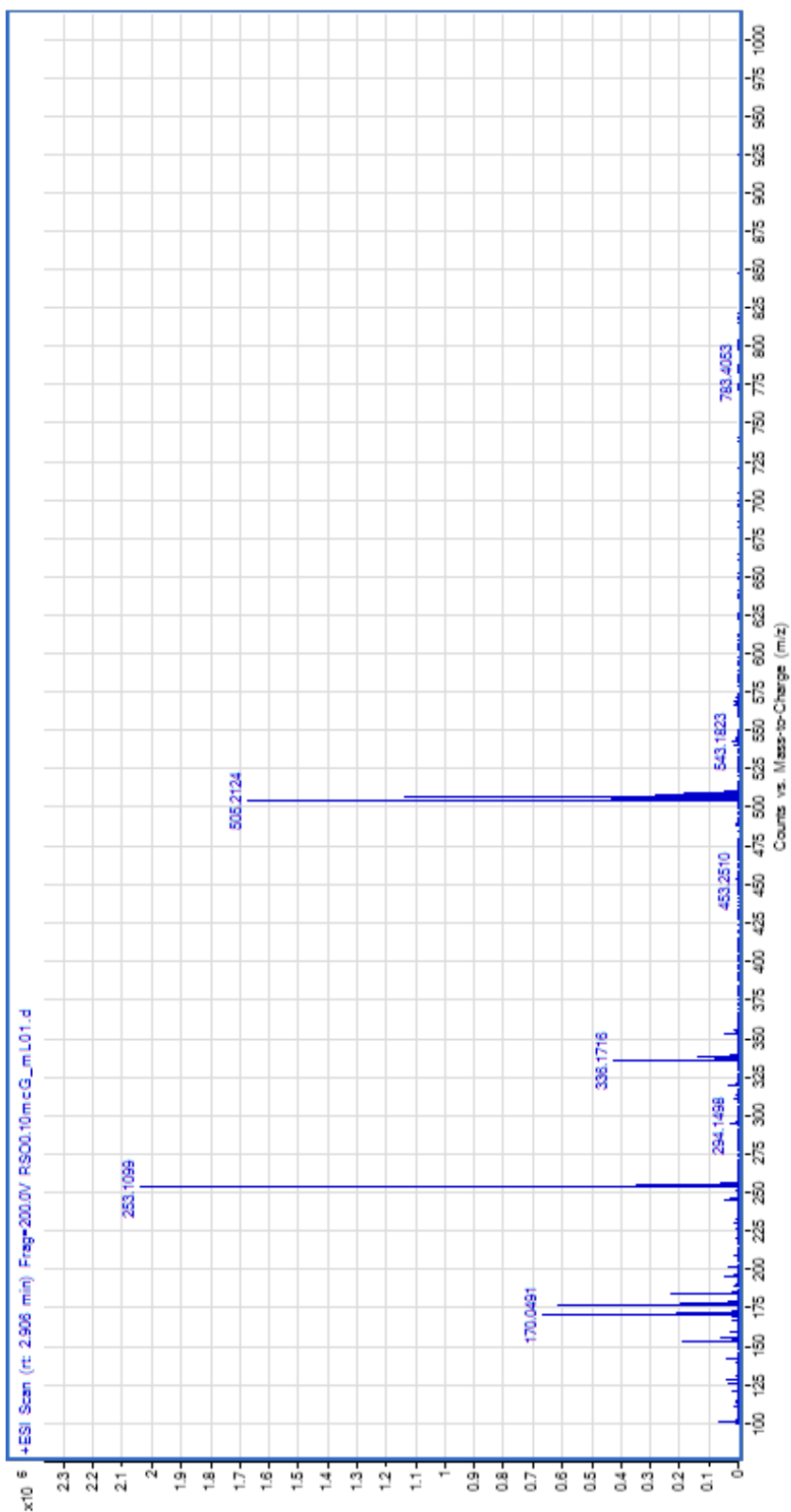


Рис. 2 Мас-спектр хлоргексидину  
Fig. 2 Mass spectrum of chlorhexidine



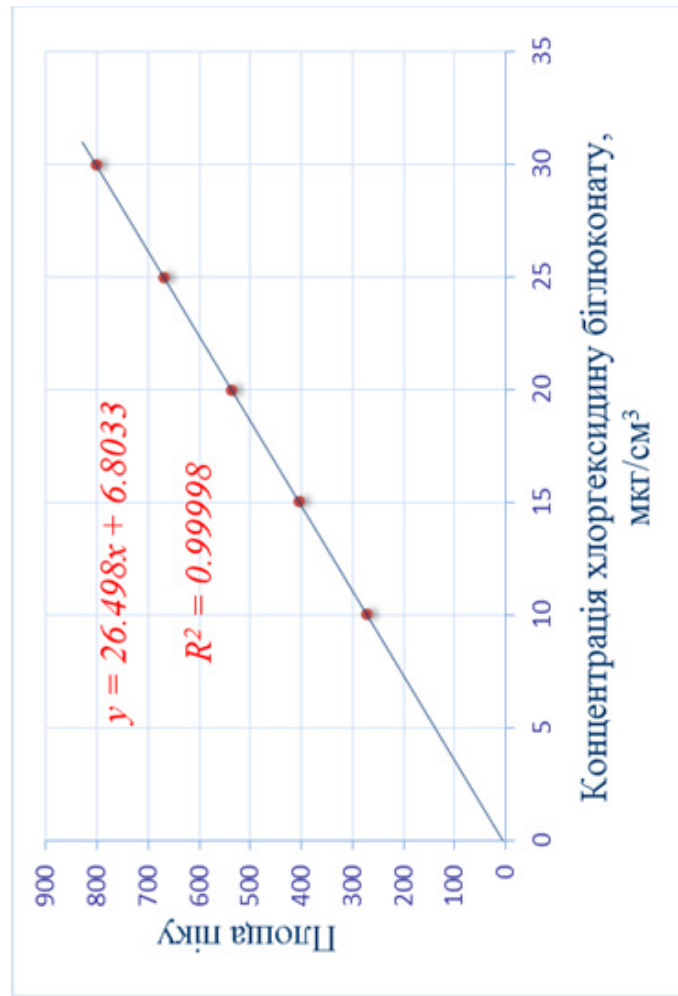
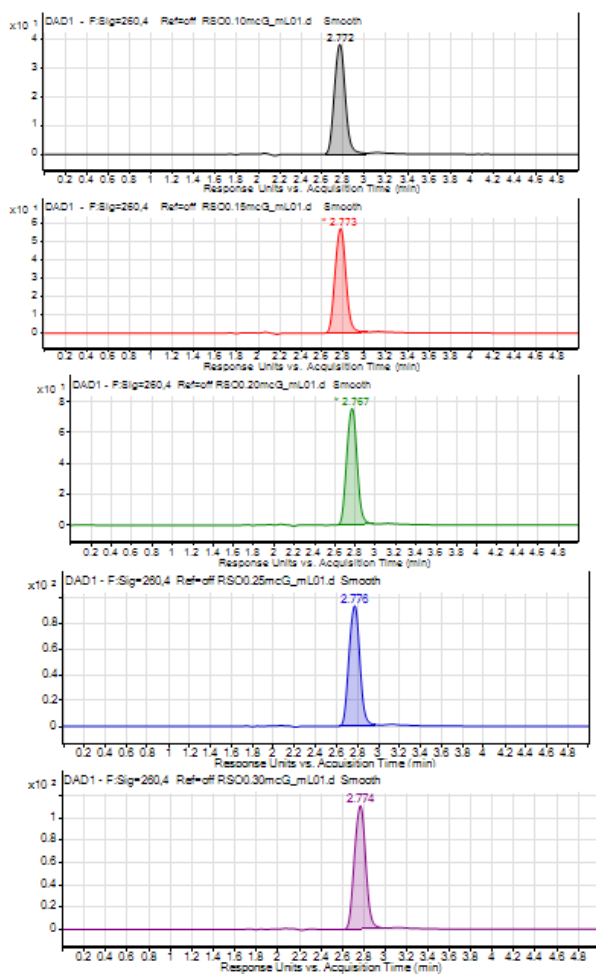


Рис. 3. Градууювальний графік залежності площі піка хлоргексидину від його концентрації при довжині хвилі 260 нм  
Fig. 3. The calibration graph of the dependence of the peak area of chlorhexidine at wavelength of 260 nm





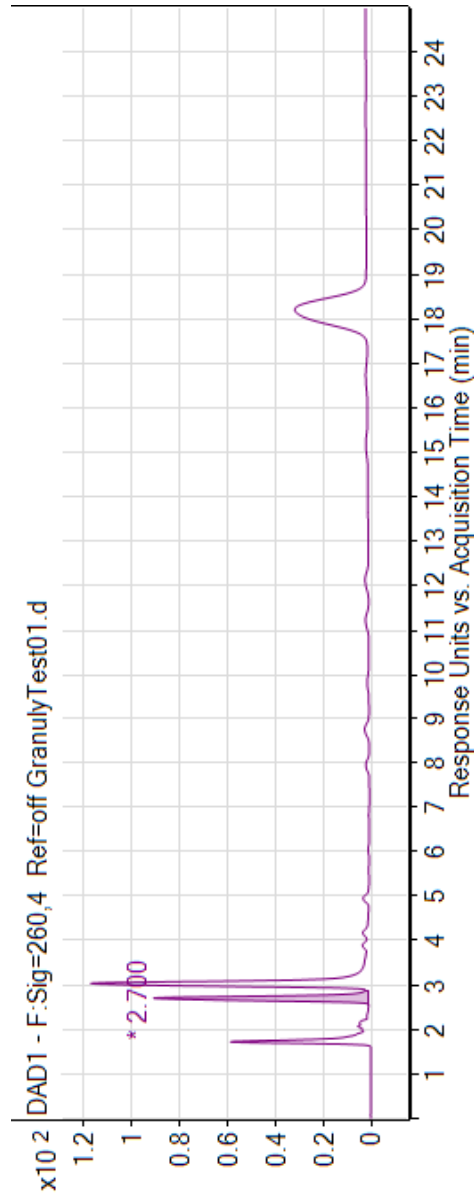
**Integration Peak List**

Peak	Start	RT	End	Height	Area
1	2.636	2.772	3.014	38.17	272.89
2	2.633	2.773	3.027	57.27	404.94
3	2.633	2.767	2.973	75.25	534.78
4	2.631	2.776	2.964	93.15	667.17
5	2.625	2.774	2.975	100.72	804.20

**Рис. 4. Хроматограми градувальних розчинів**

**Fig. 4. Chromatograms of calibration solutions**





Integration Peak List

Peak	Start	RT	End	Height	Area
1	2.55	2.70	2.89	89.90	605.10

Рис. 5. Хромотограма випробуваного розчину

Fig. 5. Chromatogram of the test solution



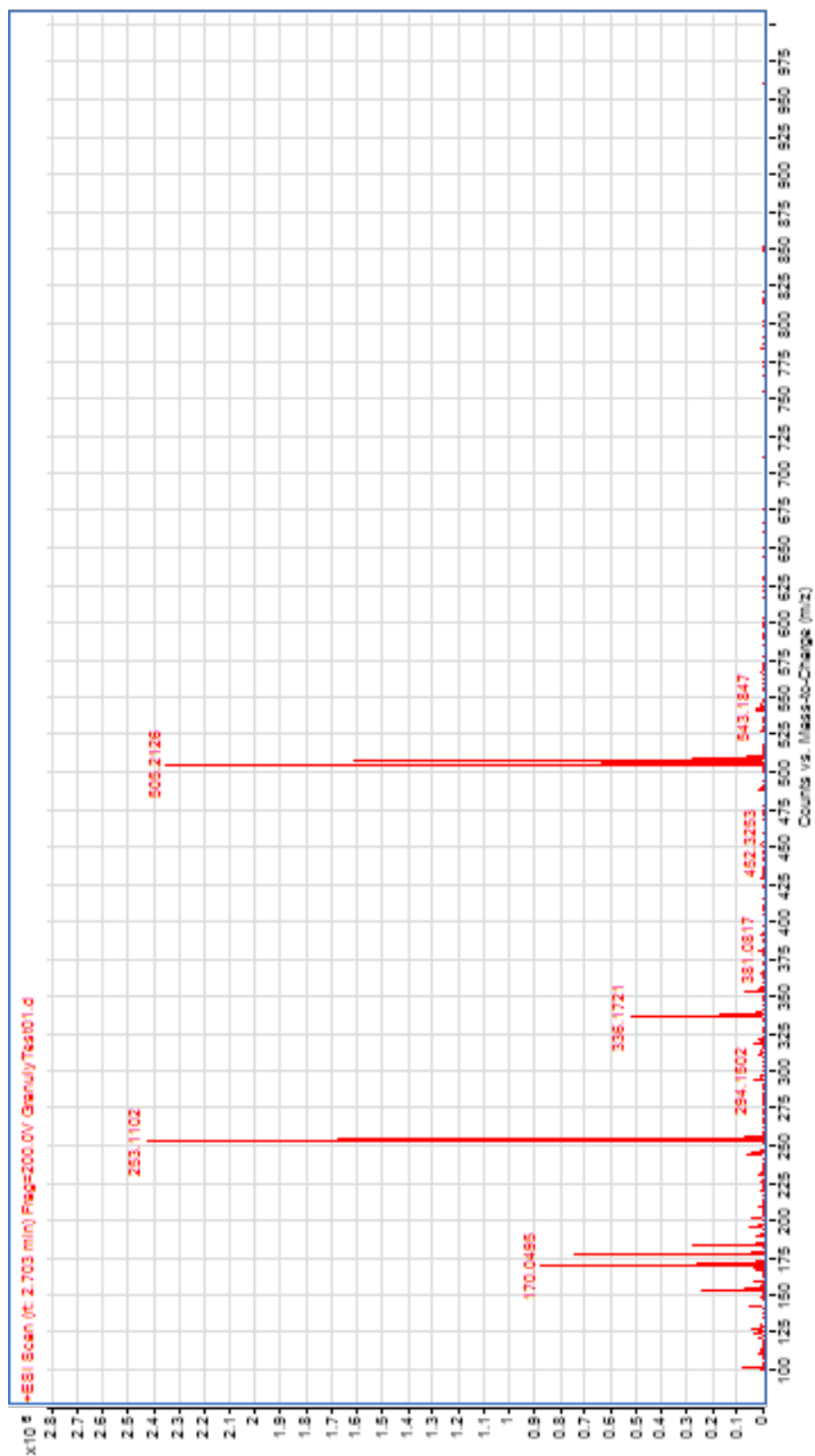


Рис. 6. Мас-спектр аналітичного піка з RT = 2.7 хв на хроматограмі випробуваного розчину

Fig. 6. Mass-spectrum of the analytical peak with RT = 2.7 min on the chromatogram of the test solution

Таблица 5

Результати визначення вмісту хлоргексидину біглюконату в гранулі D

Table 5

The results of determining the content of chlorhexidine bigluconate in granulate D

Маса наважки грануляту, мг	Площа піка	Вміст ХГБГ, мг на 1 г грануляту	Середнє значення вмісту ХГБГ, мг/1 г грануляту	Визначено ХГБГ від його вмісту в грануляті, %
58,80	605,10	3,84	3,82±0,36 P<0,05	38,20
	600,79	3,81		
	602,52	3,82		

Примітка: P – ймовірність відмінностей з визначення вмісту ХГБГ в грануляті D при n=5.  
Note: P – probability of differences to determine the content of CHDG in the granulate D at n=5

Специфічність даної методики аналізу доведено поділом хроматографічних зон і ідентифікацією зони аналізованого компонента за допомогою мас-спектра.

Отримані результати хроматомас-спектрометрії узгоджуються з результатами спектрофотометричного аналізу: хлоргексидину біглюконат визначається у грануляті D на 38,2 і 30,9%, відповідно, що може бути наслідком міжмолекулярних взаємодій компонентів. У зв'язку з цим на даному етапі досліджень кількісне визначення хлоргексидину біглюконату у таблетованій суміші є проблематичним.

Показано, що лізоцим і кверцетин кількісно визначаються в багатокомпонентних таблеткових сумішах з іммобілізованим ензимом. Виявлено, що лізоцим, кверцетин, маніт, полівінілпіролідон, сахароза і лактоза заважають кількісному визначенню хлоргексидина біглюконата методами спектрофотометрії і хроматомас-спектрометрії як в однофакторному, так і в багатофакторному експериментах.

С.С. Декина<sup>1</sup>, И.И. Романовская<sup>1</sup>, О.В. Севастьянов<sup>1</sup>,  
Г.В. Мальцев<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины,  
Люстдорфская дор., 86, Одесса, 65080,  
тел. +38(048)766 20 44, e-mail: s.dekina@gmail.com

<sup>2</sup>ОДО «Интерхим», Люстдорфская дор., 86, Одесса, 65080  
тел. +38 (048) 777 2950

## АНАЛИЗ КОМПОНЕНТОВ ТАБЛЕТОЧНЫХ СМЕСЕЙ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМ ЛИЗОЦИМОМ

### Реферат

**Цель.** Исследование влияния компонентов таблеточных смесей с иммобилизованным лизоцимом на определение содержания действующих веществ при создании биологически активной добавки. **Методы.** Гидролитическую



активность лизоцима определяли спектрофотометрически, используя в качестве субстрата клетки *Micrococcus lysodeikticus* 2665. Содержание белка определяли по методу Лоури в модификации Хартри, кверцетин – с применением хлорида циркония (IV), хлоргексидина биглюконат по реакции с  $\alpha$ -нафтолом спектрофотометрически и хромато-масс-спектрометрически. Таблеточные смеси получали по технологии влажного гранулирования.

**Результаты.** С использованием методов спектрофотометрии количественно определены кверцетин и лизоцим в составе таблетированных смесей. Показано, что хлоргексидина биглюконат определяется количественно при отсутствии других компонентов, тогда как их добавление усложняют его количественный анализ. Так, в присутствии лизоцима определяется 80,22% аналита, кверцетин – 90,52%, маннита – 89,82%, лактозы – 30,87%, сахарозы – 40,97%, поливинилпирролидона – 91,34%, цитрата кальция – 52,99%.

**Выводы.** Показано, что лизоцим и кверцетин количественно определяются в многокомпонентных таблеточных смесях с иммобилизованным энзимом. Обнаружено, что лизоцим, кверцетин, манит, поливинилпирролидон, сахароза и лактоза мешают количественному определению хлоргексидина биглюконата методами спектрофотометрии и хромато-масс-спектрометрии как в однофакторном, так и в многофакторном эксперименте.

*Ключевые слова:* лизоцим, кверцетин, хлоргексидинабиглюконат, методы определения, таблеточные смеси.

**S.S. Dekina<sup>1</sup>, I.I. Romanovska<sup>1</sup>, O.V. Sevastyanov<sup>1</sup>,  
G.V. Maltsev<sup>2</sup>**

A.V. Bogatsky's Physico-chemical institute NAS of Ukraine,  
86, Lustdorfskador., Odesa, Ukraine, 65080,  
tel. (48) 765 94 31, e-mail: s.dekina@gmail.com

<sup>2</sup>«InterChem SLC», 86, Lustdorfska dor., Odesa, 65080  
tel. +38 (048) 777 2950

## ANALYSIS OF THE COMPONENTS OF TABLET MIXTURES WITH IMMOBILIZED LYSOZYME

### Summary

**Aim.** Study of the effect of the tablet mixtures components with immobilized lysozyme on the determination of active substances for dietary supplement creation. **Methods.** Activity of egg white lysozyme was determined by the bacteriolytic method with *Micrococcus lysodeikticus* 2665 as substrate. Protein content was determined by the Lowry-Hartree method, quercetin using zirconium (IV) chloride, chlorhexidine digluconate by the reaction with  $\alpha$ -naphthol and chromatography-mass-spectrometrically. Tablet mixtures were prepared using wet granulation technology. **Results.** Quercetin and lysozyme are quantified in the composition of tablet mixtures by the spectrophotometry methods. It was shown that chlorhexidine digluconate is determined quantitatively in the absence of other components, while their addition complicates its quantitative analysis. So, in the presence of lysozyme, 80.22% of analyte is determined, quercetin – 90.52%, mannitol – 89.82%, lactose – 30.87%, sucrose by 40.97%, polyvinylpyrrolidone – 91.34%, calcium citrate – 52.99%. **Conclusions.** The methods for the quantitative analysis of the active components of tablet mixtures: lysozyme, quercetin and chlorhexidine



*digluconate are determined. It was found that lysozyme, quercetin, mannitol, polyvinylpyrrolidone, sucrose and lactose interfere with the quantitative determination of chlorhexidine digluconate by spectrophotometry and the chromatographic mass spectrometry methods in both one-factor and multivariate experiments.*

*Key words: lysozyme, quercetin, chlorhexidine digluconate, determination methods, tablet mixtures.*

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Георгиевский В. П., Комиссаренко Н.Ф., Дмитрук С.Е. Биологически активные вещества лекарственных растений. – Новосибирск: Наука, 1990. – 144 с.
2. Дмитриенко С.Г., Кудринская В.А., Аняри В.В. Методы выделения, концентрирования и определения кверцетина // Журн. аналит. химии. – 2012. – Т. 67, № 4. – С. 340–353.
3. Карцова Л.А., Алексеева А.В. Хроматографические и электрофоретические методы определения полифенольных соединений // Журн. аналит. химии. – 2008. – Т. 63. – № 11. – С. 1126–1136.
4. Коренман И.М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. – М.: Книга по требованию, 2014. – 339 с.
5. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: Морион, 2000. – 320 с.
6. Решетов И.В., Юданова Т.Н., Маторин О.В. Пленочное покрытие, содержащее хлоргексидин и лизоцим, для лечения ран // Химико-фармацевтический журнал. – 2004. – Т. 38, № 7. – С. 41–43.
7. Романовська І.І., Декіна С.С., Севастьянов О.В., Рогожа Є.О. Таблеткові суміші, що містять іммобілізований лизоцим і кверцетин: отримання, властивості // Медична та клінічна хімія. – 2017. – Т. 19, № 2. – С. 19–24.
8. Фармацевтические и медико-биологические аспекты лекарств: В 2 т./ Под ред. Перцев И.М. – Харьков: УкрФА, 1999. – Т. 1. – 461 с.
9. Grimaldi F.S., White C.E. Quercetin as colorimetric reagent for determination of zirconium // Analytical Chemistry. – 1953. – Т. 25, № 12. – С. 1886–1890.
10. Formica J.V., Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids // Food and chemical toxicology. – 1995. – Т. 33, № 12. – С. 1061–1080.
11. Hartree E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response // Analytical Biochemistry. – 1972. – V. 48, № 2. – P. 422–427.
12. Kusaka Y., Aoki M. Colorimetric determination of chlorhexidine // Yakuzaigaku. 1966. – Vol. 26, № 1. – P. 58.
13. Shikiba Y., Ogura H., Yamazaki Y. Quantitative analysis of flavonoids. // Journal of pharmaceutical sciences. – 1968. – Vol. 57, № 4. – P. 705–706.
14. Shugar D. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme // Biochimica et biophysica acta. – 1952. – Vol. 8. – P. 302–309.





## References

1. Georgievsky VP, Komissarenko NF, Dmitruk SE. Biologically active substances of medicinal plants. Novosibirsk: Science, 1990. 144p. [in Russian].
2. Dmitrienko SG, Kudrinskaya VA, Apyari VV. Methods of isolation, concentration and determination of quercetin. Zh. analyte. chemistry. 2012; 67(4): 340-353. [in Russian].
3. Kartsova LA, Alekseeva AV. Chromatographic and electrophoretic methods for the determination of polyphenolic compounds. Zh. analyte. chemistry. 2008; 63(11): 1126-1136. [in Russian].
4. Korenman IM. Photometric analysis: Methods for determination of organic compounds M.: Book on Demand, 2014. 339 p. [in Russian].
5. Lapach SN, Chubenko AV, Babich PN. Statistical methods in biomedical research using Excel. K.: Morion, 2000. 320 p. [in Russian].
6. Reshetov IV, Yudanov TN, Matorin OV. A film coating containing chlorhexidine and lysozyme for the treatment of wounds. Chemical and Pharmaceutical Journal. 2004; 38(7): 41-43. [in Russian].
7. Romanov'ska II, Dekina SS, Sevast'yanov OV, Rohozha YO. Tablet mixtures containing immobilized lysozyme and quercetin: production, properties. Medychna ta klinichna khimiya. 2017; 19(2): 19-24. [in Ukrainian].
8. Pharmaceutical and biomedical aspects of drugs: 2 t. Ed. Pertsev IM. Kharkov: UkrFA, 1999. I.1. 461 p. [in Russian].
9. Grimaldi FS, White CE. Quercetin as colorimetric reagent for determination of zirconium. Analytical Chemistry. 1953; 25(12): 1886-1890.
10. Formica JV, Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. Food and chemical toxicology. 1995; 33(12): 1061-1080.
11. Hartree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response. Analytical Biochemistry. 1972; 48(2): 422-427.
12. Kusaka Y, Aoki M. Colorimetric determination of chlorhexidine. Yakuzaigaku. 1966; 26(1): 58.
13. Shikiba Y, Ogura H, Yamazaki Y. Quantitative analysis of flavonoids. Journal of pharmaceutical sciences. 1968; 57(4): 705-706.
14. Shugar D. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. Biochimica et biophysica acta. 1952; 8: 302-309.

Стаття надійшла до редакції 13.03.2020 р.

