

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я

НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ

О.О.БОГОМОЛЬЦЯ

ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ

хімії ліків та лікарської токсикології

(назва кафедри)

ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему «Інструментальні методи дослідження наявності
незадекларованих АФІ у складі субстанцій аскорбату натрію та
аскорбінової кислоти»

Виконав: здобувач вищої освіти 5 курсу, групи 9807А
напряму підготовки (спеціальності)

226 «Фармація, промислова фармація»

(шифр і назва напряму підготовки, спеціальності)

Фармацевтичний факультет, заочна форма навчання

Освітньо-кваліфікаційний рівень «магістр»

«Фармація»

(назва освітньої програми)

Малюта Наталія Вікторівна

(прізвище та ініціали)

Керівник: проф., д.фарм.н. Вельчинська О.В.

(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Рецензент: доцент, к.фарм.н. Козіко Н.О.

(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Київ – 2023-2024 р.р.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	3
ВСТУП.....	5
ОСНОВНА ЧАСТИНА.....	10
РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОЇ БУДОВИ ТА ВЛАСТИВОСТІ ОРГАНІЧНИХ КИСЛОТ.....	10
1.1. Особливості хімічної будови органічних кислот.....	10
1.2. Біологічна активність органічних кислот.....	15
РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТА ТА ЇЇ СОЛЕЙ.....	19
2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості аскорбінової кислоти та її солей.....	19
РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	26
ВИСНОВКИ.....	36
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	37
SUMMARY.....	40
ДОДАТОК 1.....	41

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

г – грам

ГМДС – гексаметилдисилоксан

ГРХ – газо-рідинна хроматографія

ДФУ – Державна Фармакопея України

ДМСО – диметилсульфоксид

ДМФА – диметилформамід

ІЧ спектр – інфрачервоний спектр

мкл – мікролітр

мкм – мікрометр

мл – мілілітр

ММ – молекулярна маса

НРФ – нерухома рідка фаза

нм – нанометр

РХ – рідинна хроматографія

см⁻¹ – обернений сантиметр

Спектр ПМР – спектр протонно-магнітного резонансу

ТМС – тетраметилсілан

ТГФ – тетрагідрофуран

T. кип. – температура кипіння

T. пл. – температура плавлення

УФ спектр – ультрафіолетовий спектр поглинання

ЯМР ^1H – спектр ядерно-магнітного резонансу протонний

AA – аскорбінова кислота

Alk – алкіл-радикал

Ar – арил-радикал

$^{\circ}\text{C}$ – градуси Цельсія

DFO – десферіоксамін

FAC – цитрат заліза амонію

Hal – галоген

J, Гц – значення константи спин-спінової взаємодії, герци

TfR – трансферин

ВСТУП

Актуальність теми. Аскорбінова кислота (Вітамін С) міститься в рослинах, у листових овочах, плодах, ягодах. 10-12 % сухої маси плодів шипшини – це вміст аскорбінової кислоти. Інші природні джерела аскорбінової кислоти – це солодкий перець, цитрусові, малина, сік грейпфрутів, цибуля, спаржа, капуста, хрін. Серед продуктів тваринного походження аскорбінову кислоту містять молоко та печінка.

Аскорбінова кислота існує у вигляді двох енантіомерів (дзеркальних ізомерів L-, D-). Частіше у природі зустрічається L-ізомер: у харчових продуктах – ягодах та овочах.

Аскорбінова кислота є необхідної поживної речовини для людей та тварин. У разі дефіциту вітаміну С розвивається цинга, яка раніше була основною хворобою моряків. Її використовують як харчову добавку та дієтичну добавку через його антиоксидантні властивості. D-ізомер може бути отримана шляхом хімічного синтезу, але не має істотної біологічної цінності.

Вітамін С є органічною кислотою, структурно подібною до глюкози. Це потужний відновник. Вітамін С всмоктується з шлунково-кишкового тракту, розподіляється внутрішньом'язово.

Концентрація вітаміну С у плазмі крові та загальний запас вітаміну С залежать від споживання продуктів з аскорбіновою кислотою. Вітамін С частково окислюється до активних (дегідроаскорбінова кислота) та неактивних (оксалатна кислота) метаболітів.

Терапевтичне застосування аскорбінової кислоти включає профілактику дефіциту аскорбінової кислоти, лікування цинги, анемії, підкислення сечі при інфекції сечовивідних шляхів. Вітамін С знижує артеріальний тиск, рівень холестерину в організмі, зменшує застуду, є

необхідним при бактеріальних інфекціях. Адекватне споживання вітаміну С може запобігти розвитку раку грудей, шийки матки.

Вітамін С є необхідним для синтезу у організмі колагену – важливого сполучання для здоров'я, для відновлення шкіри, кісток, зубів і хрящів.

Для визначення аскорбінової кислоти використовують аналітичні методи: титриметричну спектрофотометрію, хроматографію, титриметрію, вольтамперометрію, флуорометрію, потенціометрію. Рідинна хроматографія, капілярний електрофорез і газова хроматографія, також, дуже часто використовується для аналізу вітаміну С.

Ультрафіолетова спектрофотометрія в основному використовується для визначення аскорбінової кислоти, а вітамін С здатний поглинати ультрафіолетові промені.

Було виявлено низку несприятливих наслідків при передозуванні вітаміну С: атеросклероз, камені в нирках, «відворотну цингу», посилення окислювального стресу, надмірне всмоктування заліза, дефіцит вітаміну В12, ерозія зубної емалі.

На сьогодні відсутні надійні наукові докази того, що дози вітаміну С до 10 г/день для дорослих є токсичними [1-3].

Епідеміологічні дані свідчать про те, що споживання фруктів і овочів пов'язане зі зменшенням ризику розвитку більшості видів раку. Можливо, це відбувається через високий вміст вітаміну С [1, 2].

Вітамін С може обмежувати утворення канцерогенів (нітрозаміни), модулювати імунну відповідь [2, 4]. Завдяки своїй антиоксидантній функції послаблює окисне пошкодження, яке призводить до раку [4-7].

Більшість досліджень типу «випадок-контроль» виявили зворотний зв'язок між споживанням вітаміну С та раком легенів, молочної залози, товстої

або прямої кишки, шлунка, ротової порожнини, гортані або глотки та стравоходу. Концентрації вітаміну С у плазмі нижчі у людей з раком, ніж у здорових людей.

Дані проспективних досліджень суперечливі, можливо, через різне споживання вітаміну С у дослідженнях.

За результатами дослідження виявлено, що здоров'я споживання в середньому 205 мг/день вітаміну С з продуктами харчування порівняно із середнім значенням 70 мг/день, призводило до зниження ризику розвитку раку молочної залози (на 63%) серед жінок у пременопаузі. При цьому, всі вони мали сімейний анамнез раку молочної залози.

При споживанні 198 мг/день вітаміну С з продуктами харчування не спостерігали нижчого ризику раку молочної залози серед жінок у постменопаузі. Дослідження показали значно нижчий ризик раку у осіб, які вживали вітамін С щонайменше 80–110 мг/день. Цей діапазон пов'язаний із достатнім насиченням тканин вітаміном С [7-15].

Аскорбінова кислота – є високоактивною хімічною речовиною. Її молекула поліфункціональна. Містить фармакофорні угруповання, функціональні групи – гідрокси групу, кето групу, гетероциклічний фрагмент, подвійний зв'язок.

Субстанцію можна ідентифікувати хімічними методами та інструментальними методами. Оскільки молекули є субактивними, можливе формування у субстанції внутрішньомолекулярних зв'язків за рахунок вільних функціональних груп, реакцій деградації молекули, елімінування атомів або їх заміщення. Під час синтезу субстанції можливе утворення побічних продуктів, утворення супровідних речовин, неприпустимих домішок, які будуть знижувати її якість.

Під час проведення фармацевтичного аналізу субстанції аскорбінової кислоти важливим є введення у аналітичні процедури сучасних інструментальних методів, модифікувати та удосконалювати ті процедури, які рекомендовано Фармакопеями, для підвищення ефективності аналізу.

Актуальним завданням є адаптація умов хроматографування при дослідженні субстанції аскорбінової кислоти та її похідних методом ВЕРХ. Модифікації потребують, також, методики пробопідготовки зразків, методики виконання процедур. Важливо отримати коректні результати щодо якості досліджуваного зразку.

Мета і завдання дослідження. Метою експериментального дослідження є адаптація та модифікація умов хроматографування і методик дослідження методом ВЕРХ зразку субстанції аскорбату натрію з діючою речовиною аскорбінова кислота, які дозволять зробити висновок щодо якості досліджуваних зразків.

Завдання експериментального дослідження:

- адаптувати умови хроматографування методом ВЕРХ субстанції аскорбату натрію з діючою речовиною аскорбінова кислота з метою визначення її чистоти;
- розробити або модифікувати методики хроматографування методом ВЕРХ субстанції аскорбату натрію з діючою речовиною аскорбінова кислота;
- провести інструментальні дослідження випробувальних зразків субстанцій у порівнянні зі стандартними зразками та інтерпретувати результати досліджень.

Методи дослідження. Високоєфективна рідинна хроматографія на хроматографі Agilent 1260 Infinity II з УФ детектором, колонка – Zorbax NH2, 150x4,6x3; комп'ютерний аналіз за програмою OpenLab CDS.

Новизна та значення одержаних результатів. Новизна експериментального дослідження полягає у адаптації та модифікації умов хроматографування, методик досліджень методом ВЕРХ субстанції аскорбату натрію з діючою речовиною аскорбінова кислота з метою підтверження її якості.

Апробація результатів дослідження. Результат досліджень апробовано на Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Запорізький Фармацевтичний Форум-2023», 23-24 листопада 2023 року.

Публікації: За матеріалами дослідження подані до публікації 1 тези доповіді.

Структура роботи: загальну кількість сторінок – 41, кількість розділів – 3, кількість додатків – 1, кількість використаних джерел – 24.

20. M. Jankowska, N. Szupryczynska, A. Debska-Slizien, *et al.*. Dietary intake of vitamins in different Options of treatment in chronic kidney disease: is there a deficiency? *Transpl Proc*, 48 (2016), pp. 1427-1430.
21. Y. Wang, Y. Zheng, P. Chen, *et al.* The weak correlation between serum vitamin levels and chronic kidney disease in hospitalized patients: a cross-sectional study. *BMC Nephrol*, 22 (2021), p. 292.
22. S. Bataille, J.F. Landrier, J. Astier, *et al.* Plasma retinol concentration is mainly Driven by transthyretin in hemodialysis patients. *J Ren Nutr*, 27 (2017), pp. 395-401.
23. Yong Chool Boo. Ascorbic Acid (Vitamin C) as a Cosmeceutical to Increase Dermal Collagen for Skin Antiaging Purposes: Emerging Combination Therapies. *Antioxidants*. *Antioxidants*. 2022, 11, 1663. <https://doi.org/10.3390/antiox11091663>.
24. Державна Фармакопея України. 2-ге вид., у 3-х т. Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». Х.: Укр. наук. фармакоп. центр якості лік. засобів. 2014. Т. 2. С. 61-63.

SUMMARY

Malyuta Nataliya
INSTRUMENTAL METHODS OF RESEARCHING THE PRESENCE OF UNDECLARED APIs IN THE COMPOSITION OF SODIUM ASCORBATE AND ASCORBIC ACID SUBSTANCES

The department of medicinal chemistry and toxicology

Scientific supervisor: professor, doctor of pharm.sciences Welchinska Olena.

Keywords: ascorbic acid, sodium ascorbate, HPLC, admixture.

Introduction. Ascorbic acid is an essential nutrient for humans and animals. In the case of

vitamin C deficiency, scurvy develops, which used to be the main disease of sailors. It is used as a food additive and dietary supplement due to its antioxidant properties. The D-isomer can be obtained by chemical synthesis, but has no significant biological value. Vitamin C is an organic acid structurally similar to glucose. It is a powerful restorer. Vitamin C is absorbed from the gastrointestinal tract, distributed intramuscularly. During the pharmaceutical analysis of the ascorbic acid substance, it is important to introduce modern instrumental methods into the analytical procedures, to modify and improve those procedures recommended by the Pharmacopoeia, in order to increase the efficiency of the analysis. An urgent task is the adaptation of chromatographic conditions in the study of the substance of ascorbic acid and its derivatives by the HPLC method. Modifications are also needed in the methods of sample preparation, methods of performing procedures. It is important to obtain correct results regarding the quality of the sample being tested.

Materials and methods. Research object are ascorbic acid, standard samples. Research subject: implementation of HPLC method to pharmaceutical analysis of ascorbic acid. Methods: HPLC (Agilent 1260 Infinity II chromatograph with UV detector), column Zorbax NH₂, 150x4,6x3; computer analysis using the OpenLab CDS program.

Results. The conditions of HPLC chromatography of the sodium ascorbate substance with the active substance ascorbic acid were adapted in order to determine its purity: instead of using the mobile phase: phosphate buffer solution - acetonitrile P1 (25 : 75, V/V) (according to DFU), a new system was developed, and namely: mobile phase A - 6.8 g of potassium dihydrogen phosphate is dissolved in 1000 ml of water R, mobile phase B - acetonitrile R, mobile phase - phosphate buffer solution (phase A) and acetonitrile (phase B) in a ratio of 25:75 (V/ V). Developed and modified methods of HPLC chromatography of the substance sodium ascorbate with the active substance ascorbic acid: the substance under study was dissolved in mobile phase A.

Conclusions. Using the HPLC method, no specified impurity C was found in the composition of the studied sample, but 4 unacceptable impurities were detected: imp1 (R_t=2.984 min), imp2 (R_t=3.641 min), imp3 (R_t=7.744 min), imp4 (R_t =14.523 min).

ДОДАТОК 1

Публікації, участь у роботі конференцій, симпозіумів.

Вельчинська Олена, *Малюта Наталія*,
Зелена Яна, Чала Аліна. Характеристика лікарських
форм ліків із модифікованим вивільненням: фізико-
хімічні параметри. Всеукраїнська науково-практична
конференція з міжнародною участю «Запорізький
Фармацевтичний Форум-2023», 23-24 листопада 2023
року, стор. 23.



FIP Symposium, Digital Event «Learnings from Policy
leaders in Pharmacy around the World» 08.12.2023, The
Netherland (Online educational activity). Certificate.

