

**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<sup>-1</sup> – 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  $^1\text{H}$  – 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.

# РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОЇ БУДОВИ ТА ВЛАСТИВОСТІ ОРГАНІЧНИХ КИСЛОТ

## 1.1. Особливості хімічної будови органічних кислот

Аскорбінова кислота має систематичну номенклатурну назву ІЮПАК (5R)-[(1S)-1,2-дигідроксиетил]-3,4-дигідроксифуран-2(5H)-он.

Аскорбінова кислота — органічна сполука формули  $C_6H_8O_6$ . Вона мала назву – гексуронова кислота. Речовина представляє собою білий порошок, іноді, з жовтуватим відтінком. Легко розчиняється у воді, утворює слабокислі розчини. Аскорбінова кислота відноситься до м'яких відновників. Молекула існує у формі двох енантіомерів (оптичні ізомери), ряду D-, L-.

Молекула має спряжену систему, містить гетероциклічний фрагмент фурану, функціональні групи – кето- та гідрокси групи. Має хімічні властивості вступати у реакції заміщення, солеутворення, естерифікації (рис. 1.1.1)

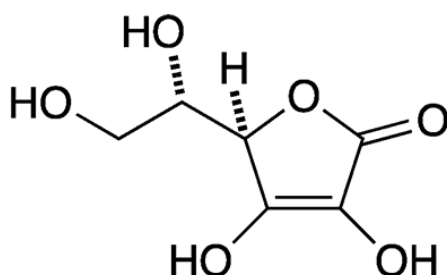


Рисунок 1.1.1. Хімічна формула аскорбінової кислоти.

Аскорбат натрію готується із 131 мг натрію та 1000 мг аскорбінової кислоти (1000 мг аскорбату натрію містить 889 мг аскорбінової кислоти та 111 мг натрію). Він використовується у якості харчової добавки (номер E E301). Використовується як антиоксидант, регулятор кислотності. Виявлено, що аскорбат натрію викликає цитотоксичну дію на різні злоякісні клітинні лінії, які включають клітини меланоми (рис. 1.1.2)[16-18].

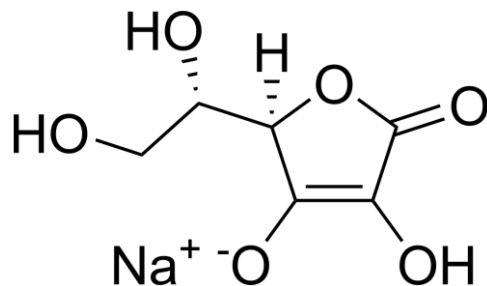


Рисунок 1.1.2. Хімічна формула натрію аскорбату.

Аскорбат натрію (вітамін С) характеризується як агент постійного впливу на клітини злоякісної пухлини, який залежить від стимуляції росту до індукції апоптозу.

Клітини меланому більш чутливі до токсичності вітаміну С, ніж інші пухлинні клітини. Аскорбат натрію зменшує поглинання клітинами заліза клітинами меланому. Рівень внутрішньоклітинного заліза може бути критичним фактором апоптозу, індукованого аскорбатом натрію.

Індукований аскорбатом натрію апоптоз посилюється хелатором заліза, десферіоксаміном (ДФО). Він інгібується донором заліза, цитратом заліза амонію (FAC). Інгібуючий вплив аскорбату натрію на внутрішньоклітинні рівні заліза блокується додаванням трансферину.

Це свідчить про те, що шлях поглинання заліза, який залежить від рецептора трансферину (TfR), може регулюватися аскорбатом натрію.

Клітини, на яких впливає аскорбат натрію, демонструють зниження експресії TfR. Це передуює апоптозу, індукваному аскорбатом натрію.

У сукупності апоптоз ініціюється зниженням експресії TfR. Це призводить до зниження регуляції поглинання заліза та індукції апоптозу. Таким можна описати специфічний механізм індукваного аскорбатом натрію апоптозу. Аскорбат натрію рекомендовано для профілактики рецидиву меланому у людини.

Описано структури аскорбінової кислоти та 6-галоаскорбатів. Аналоги аскорбату 6-гало- структурно подібні до аскорбінової кислоти. Вважається, що

вони транспортуються SVCT.

При втраті одного електрона відбувається утворення вільнорадикальних проміжних сполук аскорбілу і 6-галоаскорбілу. Втрата другого електрона призводить до утворення ДНА. Він утворює гідрат або циклізується до біциклічної гемікетальної форми. Ця форма структурно подібна до глюкози та транспортуються GLUT.

Окислений аналог не здатний циклізуватися, тому не може транспортуватися GLUT (рис. 1.1.3).

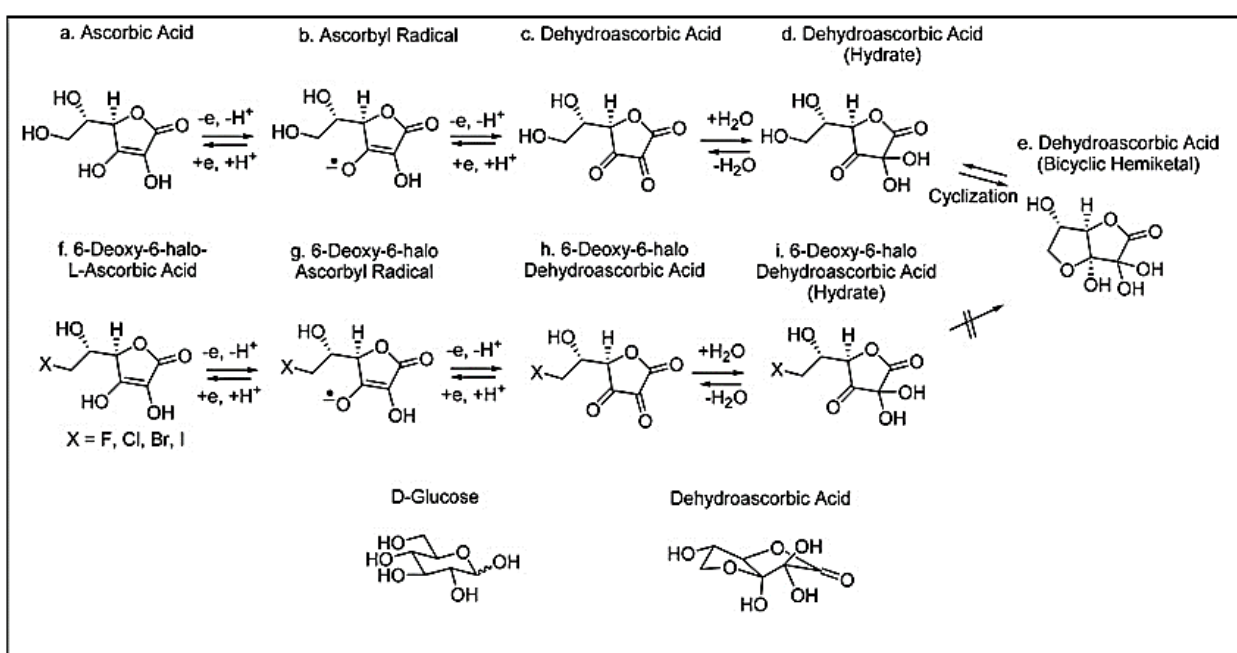


Рисунок 1.1.3. Перебіг перетворень аскорбінової кислоти та 6-галоаскорбатів.

Роблено різні похідні АА, які є безпечними, біологічно активними та стабільними. Гідрофобні попередники АА проходять через клітинну мембрану, потрапляють у клітину шляхом дифузії. Вони можуть бути ферментативно гідролізовані в клітині для регенерації АА.

Аскорбіл 6-О-пальмітат 2-фосфат (тринатрієва сіль) підвищує внутрішньоклітинну концентрацію АА більш ефективно, ніж зовнішня АА у фібробластах шкіри людини (TIG118).

Збільшення внутрішньоклітинної АА зовнішнім АА інгібували форбол 12-мірилат 13-ацетат і глюкоза.

Збільшення аскорбіл 6-О-пальмітату 2-фосфату не впливає на поглинання шляхом простої дифузії. Аскорбіл 6-О-пальмітат 2-фосфат перетворюється в АА внутрішньоклітинними ферментами через аскорбіл 6-О-пальмітат і аскорбіл 2-фосфат.

Аскорбіл 3-О-кумарат і аскорбіл 2-О-кумарат були синтезовані для використання їх як багатофункціональних косметичних засобів для інгібування синтезу меланіну та збільшення синтезу колагену.

При 100 мкМ аскорбіл 3-О-кумарат і аскорбіл 2-О-кумарат знижують вміст меланіну в дермальних меланоцитах людини на 65% і 59%.

При 100~300 мкМ сполуки збільшують синтез колагену в дермальних фібробластах людини та вивільнення С-пептиду проколагену типу I. Аскорбіл 2-О-кумарат знижує рівень MMP1. Це вказує на те, що вони можуть регулювати метаболізм колагену кількома механізмами.

3-О-Етил аскорбінова кислота є стабілізованою формою АА. За допомогою єдиного розчинника (гліцерин, пропіленгліколь, 1,2-гександiol) можна покращити її проникнення крізь мембрани.

Сироватка з 3-О-етиласкорбіновою кислотою (30%), молочною кислотою (1%) протестована на біологічну активність у кератиноцитах HaCaT, дермальних фібробластах людини, реконструйованому епідермісі людини та реконструйованому пігментованому епідермісі людини. Виявлено, що вона зменшувала пошкодження ДНК, викликане ультрафіолетовим випромінюванням, синтез меланіну, збільшувала вироблення колагену (рис.1.1.4).

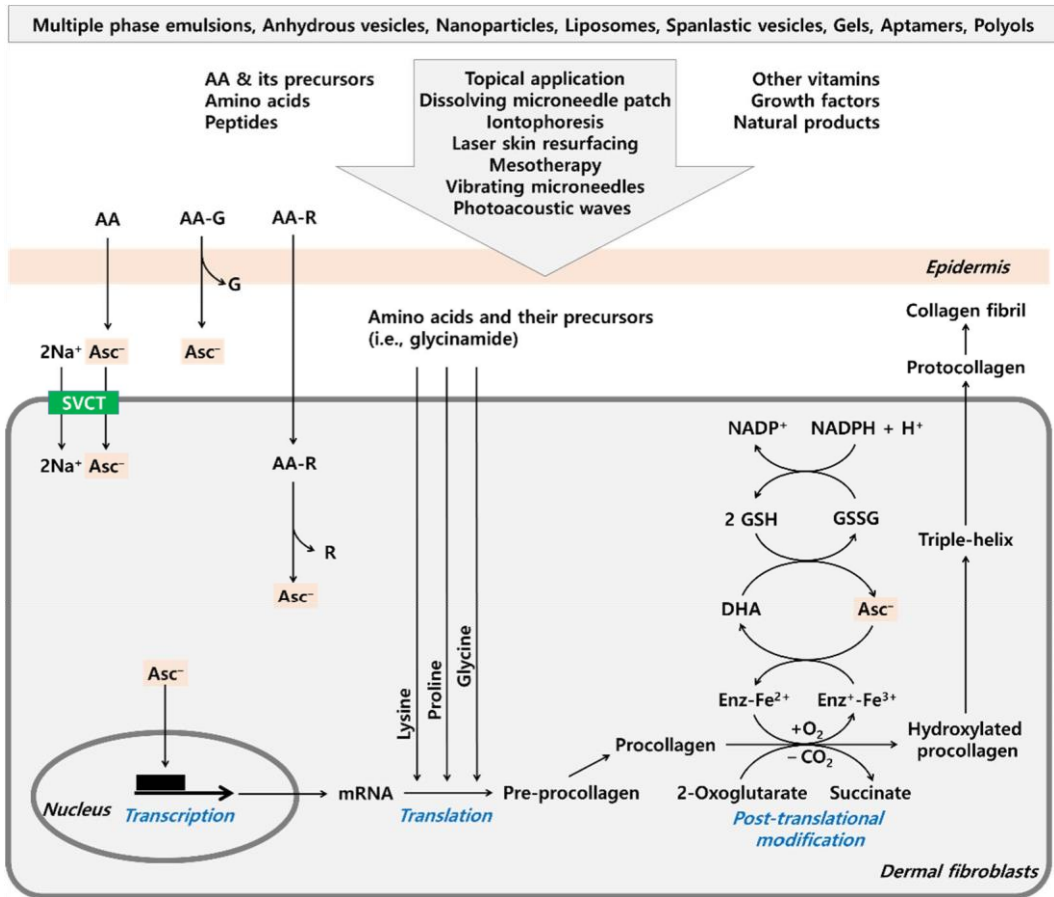


Рисунок 1.1.4. Стратегії для підвищення ефективності АА для збільшення дермального колагену.

АА присутній у вигляді моноаніону аскорбату ( $Asc^-$ ), нейтральне рН. Ефективність АА може бути синергетично посилена комбінованим складом з іншими інгредієнтами: вітаміни, амінокислоти, пептиди, фактори росту та натуральні продукти.

Включення АА в багатофазні емульсії, безводні везикули, наночастинки, спанластичні везикули, гелі підвищує стабільність та її проникнення через шкіру.

Аптамери та поліюли допомагають стабілізувати АА. Глікозиди АА і гідрофобні попередники АА можуть використовуватися замість АА для більшої стабільності та ефективного постачання АА до клітин шкіри.

Глікозиди АА-Г піддаються ферментативному гідролізу, АА

вивільняється під час проходження через шкіру. Якщо АА потрапляє в клітини через сімейство SVCT, гідрофобні попередники АА-Р можуть проникати в клітини шляхом дифузії. Вони перетворюються на АА за допомогою внутрішньоклітинних ферментів.

Під час продукування колагену АА стимулює експресію мРНК генів проколагену на етапі транскрипції. АА посилює гідроксилування проколагену, діючи як кофактор 2-оксоглутарат-залежної діоксигенази.

АА відновлює іони заліза в активних центрах ферменту. Під час цього він окислюється до дегідроаскорбату (DHA).

DHA ферментативно відновлюється до АА в реакції окислення глутатіону (GSH) до дисульфідіду глутатіону (GSSG).

GSSG відновлюється до GSH у реакції окислення нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату гідрогеном (NADPH) до нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату (NADP<sup>+</sup>)[19-23].

Амінокислоти можуть служити будівельними блоками білків на етапі трансляції. Гліцин, пролін і лізин або їх прекурсори можуть сприяти виробленню колагену.

## 1.2. Біологічна активність органічних кислот

У організмі людини АА не синтезується, оскільки не вистачає функціональної гулонолактонооксидази, яка є каталізатором стадії синтезу АА. Таким чином, АА є вітаміном для людини, який необхідно вживати.

Зовнішнє джерело АА та окислена форма дегідроаскорбат (DHA) можуть проникати в клітини через специфічні механізми транспорту. Натрій-залежний транспортер вітаміну С (SVCT) 1 та SVCT 2 опосередковує активний транспорт АА.

Полегшений транспорт DHA опосередковується GLUT 1, GLUT 3 та GLUT 4 сімейства транспорту глюкози.

Гідроліз ДНА призводить до утворення 2,3-дикето-L-гулонат, який гідролізується до оксалату та L-еритрулози, декарбоксилюється з утворенням L-ксилонової кислоти або L-ліксонової кислоти.

АА присутня у формі моноаніону аскорбату ( $\text{Asc}^-$ ) у нейтральному водному розчині. Після окислення АА утворює монодегідроаскорбат і ДНА. АА легко окислюється реакцією з киснем при високих температурах.

АА швидко реагує з різними типами АФК, вільними радикалами, окислюється до аскорбілового радикала. Реакція АК із синглетним киснем утворює ДГК і пероксид водню.

Після поглинання ліпідних радикалів, які опосередковують ланцюгову реакцію перекисного окислення ліпідів у клітинній мембрані,  $\alpha$ -токоферол діє як антиоксидант. При цьому руйнується з розривом ланцюг.

Утворений  $\alpha$ -токофероксильний радикал реагує з АА для регенерації  $\alpha$ -токоферолу. В результаті АА окислюється до аскорбілового радикалу.

АА функціонує як істотний кофактор певних металоферментів.

2-Оксоглутарат-залежні діоксигенази мають іони заліза в своїх активних центрах. Реакція потребує молекулярного Оксигену та 2-оксоглутарату у якості ко-субстратів.

Ферменти відіграють важливу роль у метаболізмі колагену та у інших біохімічних процесах: розвиток, регуляція транскрипції, модифікація нуклеїнової кислоти, гормонів, антибіотиків.

У каталітичному процесі ферментів, повертаючи окислений іон заліза у відновлений стан, АК впливає на активність ферменту та різні фізіологічні процеси. Звичайно, в ході цієї реакції АК окислюється. АА можна регенерувати з аскорбілового радикала та ДНА хімічним і ферментативним шляхом. Дві молекули аскорбілового радикалу диспропорційні з утворенням ДНА і АА. Аскорбіловий радикал можна безпосередньо відновити до АК ферментами з монодегідроаскорбатредуктазною активністю з використанням половини еквівалента відновленого нікотинамідаденіндинуклеотиду (НАДН)



+H<sup>+</sup>. ДНА відновлюється до АА ферментами з дегідроаскорбатредуктазною активністю. Це відбувається під час окислення глутатіону (GSH) до глутатіондисульфіді (GSSG).

Колаген синтезується в клітинах. На ранньому етапі гени колагену транскрибуються в мРНК у ядрі. Пре-проколаген транспортується до ендоплазматичного ретикулуму. N-кінцевий сигнальний пептид видаляється. Залишки проліну та лізину гідроксильються.

Специфічні гідроксильні групи залишків лізину глікозилуються галактозою та глюкозою.

Після додаткових модифікацій в апараті Гольджі потрібна спіраль молекул проколагену збирається в секреторні везикули. Звідтіля вона транспортується із клітини.

В якості однієї з посттрансляційних модифікацій білка відбувається гідроксильовання амінокислотних залишків (пролін, лізин, аспарагін, аспарат, гістидин). У випадку колагену вміст проліну та лізину особливо високий. Гідроксильовання цих амінокислотних залишків важливо для стабілізації структури білків колагену.

Гідроксильовання залишків проліну відбувається на атомі  $\gamma$ -С або атомі  $\beta$ -С. Гідроксильовання залишку лізину відбувається на атомі  $\delta$ -С.

Ці реакції каталізуються ферментами проліл-4-гідроксилазою, проліл-3-гідроксилазою та лізил-5-гідроксилазою.

2-оксоглутарат-залежні діоксигенази потребують АА для функціонування.

Дефіцит АА може спричинити дефекти дозрівання колагену.

АА посилює вироблення колагену у фармакологічних дозах.

Показано, що АА вибірково збільшує синтез білка колагену та не збільшує синтез неколагенового білка у фібробластах шкіри людини.

Цей ефект пов'язують з підвищеним рівнем мРНК проколагену типу I та типу III.

Вважається, що про-колаген у клітині, пригнічує трансляцію синтезу проколагену. АА звільняє трансляційне інгібування, сприяючи гідроксилюванню та секреції проколагену.

Це призводить до збільшення транскрипції гена колагену. Можливо, перекисне окислення ліпідів опосередковує збільшення експресії гена колагену, яке стимульоване АА.

Додавання малонового діальдегіду посилює експресію гена колагену та  $\alpha$ -токоферолу, який є антиоксидантом, пригнічувало експресію гена колагену.

Непроникні для клітин хелатори заліза, наприклад, десферіоксамін і етилендіамінтетраоцтова кислота, не зменшують синтез колагену. Вони скасовують опосередковане АА перекисне окислення ліпідів (рис.1.2.1).

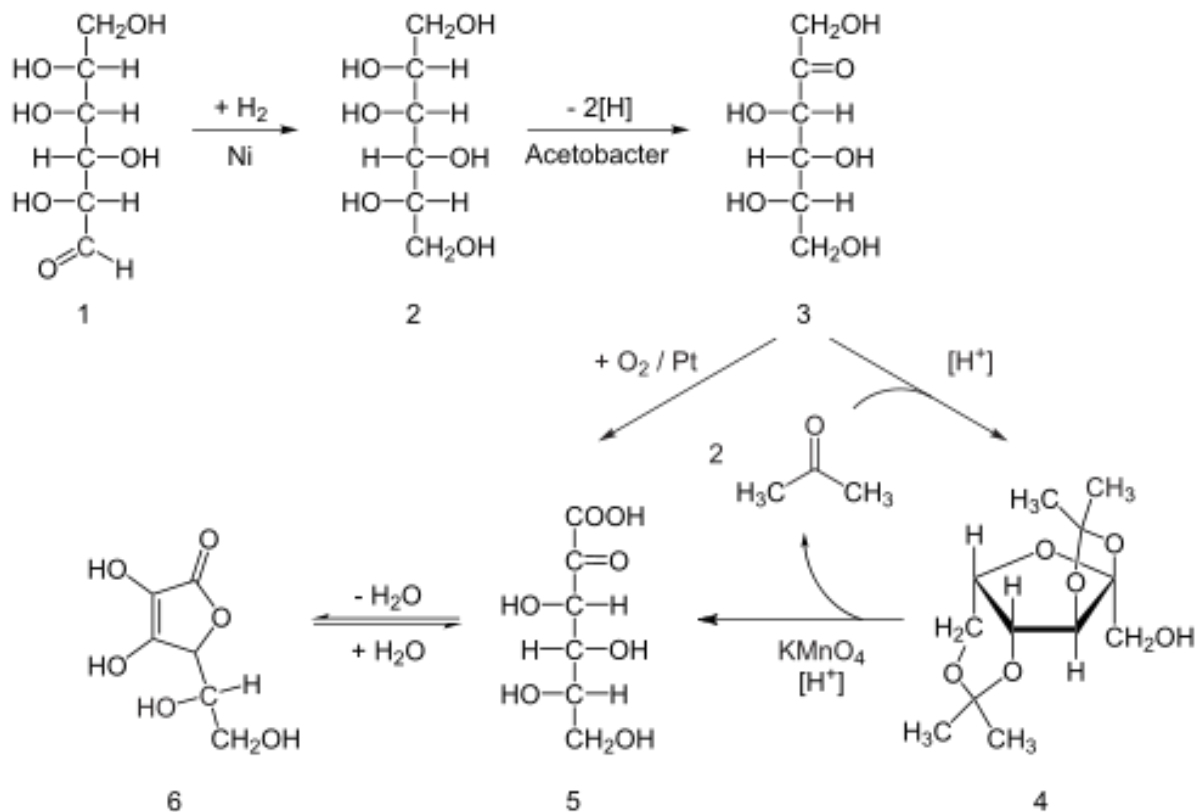


Рисунок 1.2.1. Метаболічні перетворення АА.

## РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТА ТА ЇЇ СОЛЕЙ

### 2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості аскорбінової кислоти та її солей

Аскорбінову кислоту отримують у промисловості з глюкози методом, який розроблено Рейхштейном. Глюкоза каталітично гідрогенізується до сорбіту, який окислюється мікроорганізмом *Acetobacter suboxydans* до сорбози.

Лише одна з шести гідрокси груп окислюється за допомогою цієї ферментативної реакції. Обробка продукту ацетоном у присутності кислотного каталізатора перетворює чотири гідрокси групи на ацеталі.

Незахищена гідрокси група окислюється до карбонової кислоти реакцією з каталітичним окислювачем (гіпохлорит натрію – відбілюючий розчин). Раніше в процесі Рейхштейна використовували перманганат калію як відбілюючий розчин.

Кислотно-каталізований гідроліз продукту виконує подвійну функцію видалення двох ацетальних груп. В процесі лактонізації замикається цикл молекули. На цьому етапі отримують аскорбінову кислоту з виходом більше 90%.

Розроблено біотехнологічний процес синтезу аскорбінової кислоти з використанням ацетонзахисних груп.

Другий генетично модифікований вид мікробів – мутант *Erwinia* окислює сорбозу до 2-кетоглюконової кислоти (2-KGA). Вона піддається лактонізації із замиканням кільця після дегідратації. Цей метод використовується в процесі виробництва аскорбінової кислоти та забезпечує 70% виробництва аскорбінової кислоти. Одна стадія цього виробництва відноситься до ферментативних перетворень.

Традиційним способом аналізу аскорбінової кислоти є процес титрування окислювачем. Використовують метод йодометрії у присутності індикатора крохмалю. Йод відновлюється аскорбіновою кислотою. Після того, як аскорбінова кислота вступає у реакцію, йод стає надлишковим. Утворюється синьо-чорний комплекс з індикатором крохмалю. Це вказує на досягнення кінцевої крапки титрування.

Аскорбінову кислоту можна обробити йодом у надлишку, провести зворотнє титруванням тіосульфатом натрію. У якості індикатору використовують крохмаль.

У йодометричному методі йод було замінено на йодат з йодидом у розчині кислоти. При електролізі розчину йодистого калію утворюється йод. Він реагує з аскорбіновою кислотою. Закінчення процесу визначається потенціометричним титруванням (за Карлом Фішером). Кількість аскорбінової кислоти розраховується за законом Фарадея.

Використовується N-бромсукцинімід (NBS) як окислювач у присутності йодиду калію та крохмалю. NBS окислює аскорбінову кислоту. Потім NBS вивільняє йод із йодиду калію, який утворює синьо-чорний комплекс із крохмалем.

На рисунку 2.1.1 представлено схему синтезу аскорбінової кислоти.

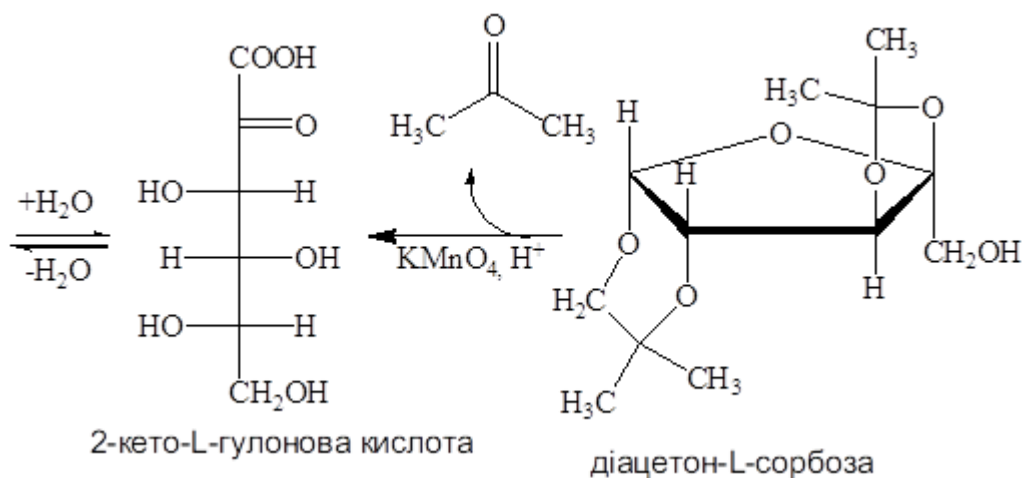


Рисунок 2.1.1. Синтез аскорбінової кислоти.

Аскорбінова кислота за хімічною структурою близька до гексоз. Молекула утворює лактон диенолгулонової кислоти ( $\gamma$ -лактон-2,3-дигідро-L-гулонова кислота). Молекула може окислюватися, перетворюватися в дегідроаскорбінову кислоту ( $\gamma$ -лактон-2,3-дикето-L-гулонова кислота) (рис. 2.1.2).

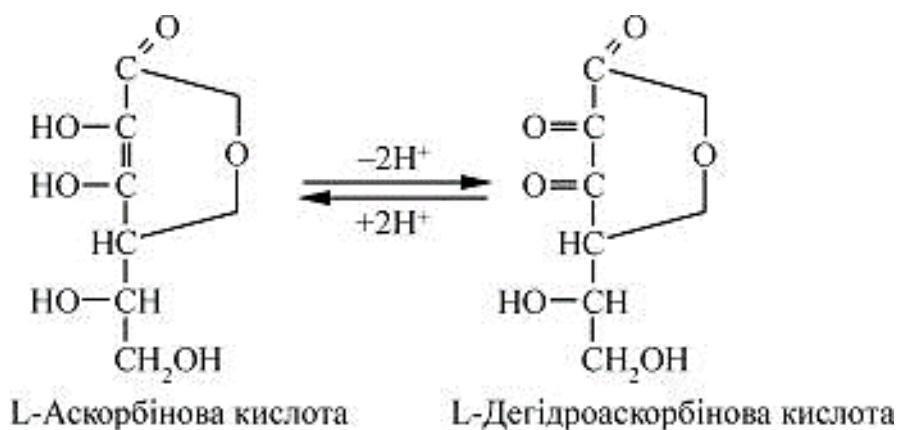


Рисунок 2.1.2. Перетворення аскорбінової кислоти.

На рисунку 2.1.3 представлено схему взаємоперетворення перетворення аскорбінової кислоти, дегідроаскорбінової кислоти та дикетогулонової кислоти.

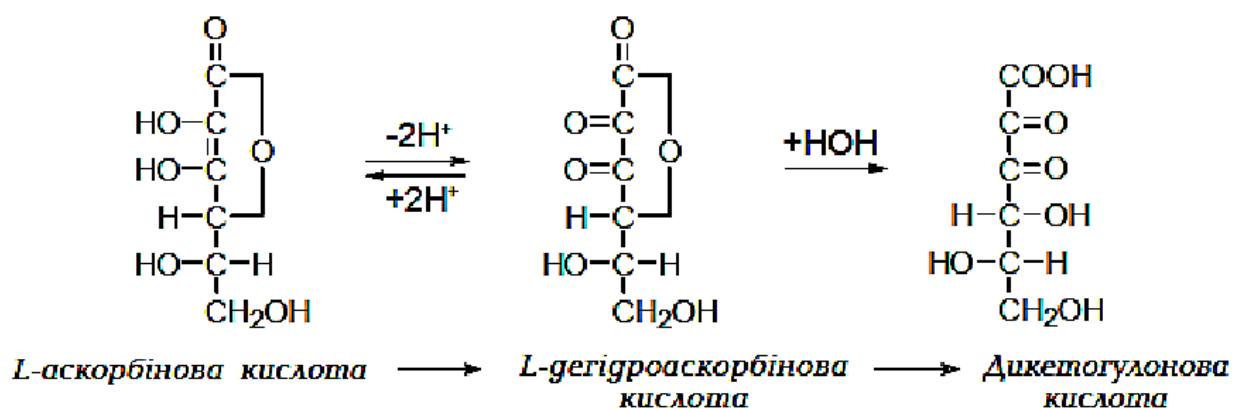


Рисунок 2.1.3. Хімічні властивості аскорбінової кислоти.

УФ-спектри поглинання аскорбінової кислоти, тетрагідробіоптерину та біоптерину показано на рисунку 2.1.4.

Спектр УФ-поглинання аскорбінової кислоти у присутності або відсутності ВН<sub>4</sub> :

Аскорбінова кислота: розчинення в 50 ммоль/л Tris-HCl, рН 7,4 при 200 мкмоль/л кінцевої концентрації.

Спектр поглинання суміші 100 мкмоль/л аскорбінової кислоти і 25 мкмоль/л ВН<sub>4</sub>. Спектр УФ-поглинання тетрагідробіоптерину (ВН<sub>4</sub>) і біоптерину: ВН<sub>4</sub> розчиняють в 50 ммоль/л Tris-HCl, рН 7,4, при 25 мкмоль/л кінцевої концентрації. Сигнали спостерігали між 220 і 340 нм.

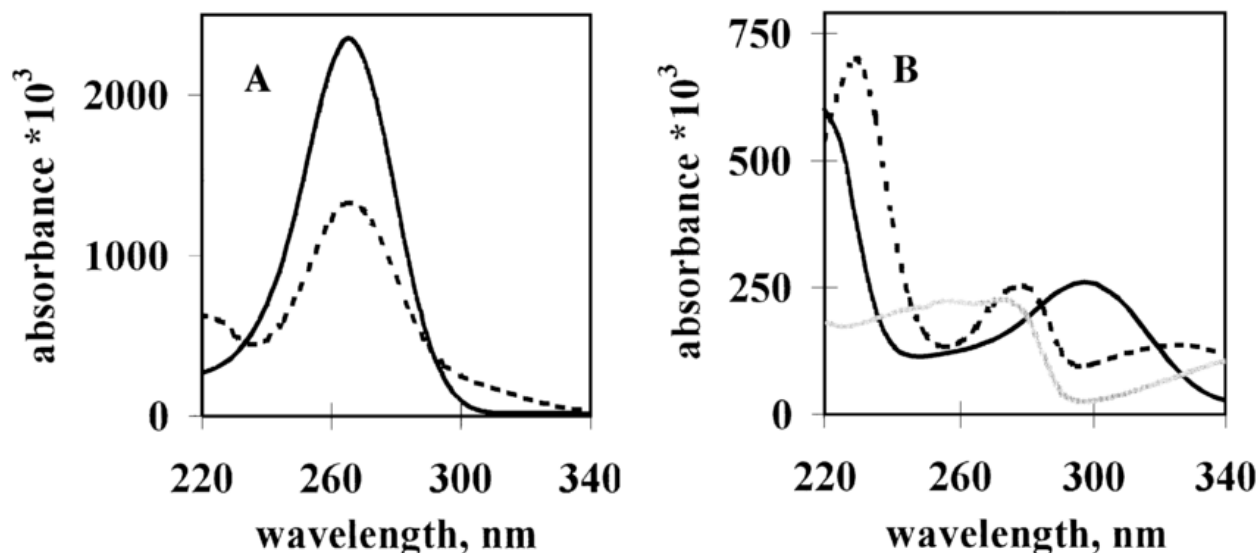


Рисунок 2.1.4. УФ-спектр аскорбінової кислоти, тетрагідробіоптерину та біоптерину.

ІЧ-Спектр чистої L-аскорбінової кислоти: валентні коливання подвійного зв'язку C=C та енол-гідроксилу спостерігалися при 1674 см<sup>-1</sup>, 1322 см<sup>-1</sup>, 3311,88 см<sup>-1</sup>, 1635,01 см<sup>-1</sup>, 1567,45 см<sup>-1</sup>, 1377,59 см<sup>-1</sup> (рис. 2.1.5). Піки відповідають гідрокси групі, деформаціям C-H груп, -CH<sub>2</sub> груп, -CH<sub>3</sub> груп в аліфатичних фрагментах молекули.

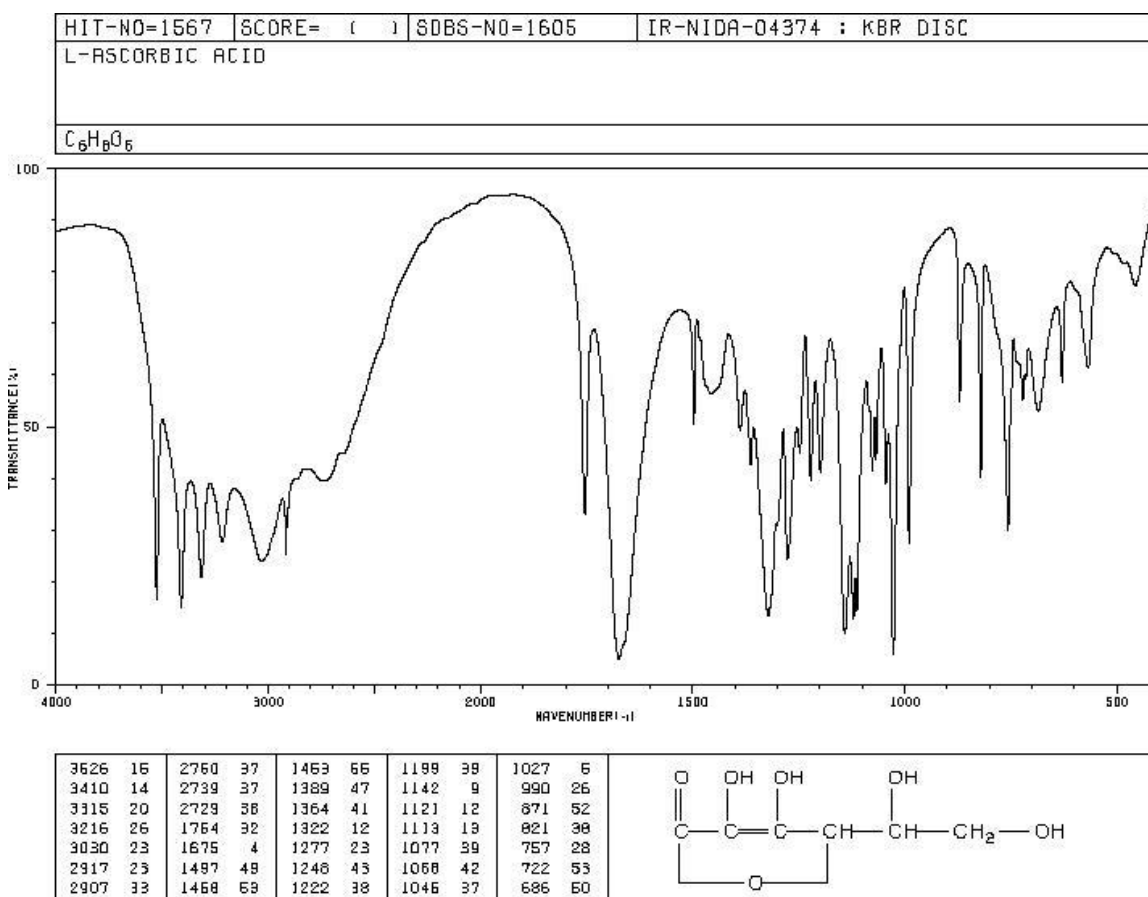


Рисунок 2.1.5. ІЧ-спектр аскорбінової кислоти.

Якщо розглядати Аскорбінову кислоту та аскорбат натрію як субстанції для проведення фармацевтичного аналізу, то ДФУ регламентує аналіз аскорбінової кислоти [24].

Аскорбінова кислота – це кристалічний порошок білого або майже білого кольору, або безбарвні кристали. Речовина змінює колір під впливом повітря та вологи. М.м. 176,1 (безводна речовина).

Її хімічна номенклатурна назва за ІЮПАК – (5R)-[(1S)-1,2-дигідроксиетил]-3,4-дигідроксифуран-2(5H)-он (рис.2.1.6).

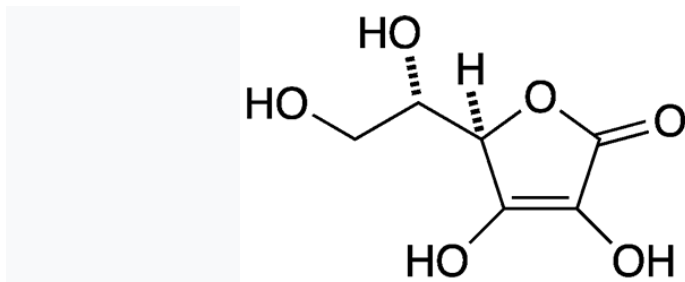


Рисунок 2.1.6. Хімічна формула аскорбінової кислоти.

Аскорбінова кислота (аскорбат натрію). Чистота 99,0-100,5% (суха речовина).

Розчинність. Субстанція легко розчинна у воді *P*, помірно розчинна у етанолі (96%) *P*. Температура плавлення 190°C.

За ДФУ Аскорбінову кислоту ідентифікують:

- методом абсорбційної ІЧ-спектрофотометрії (2.2.24), відповідністю спектру ФСЗ аскорбінової кислоти;
- методом абсорбційної УФ-спектрофотометрії (2.2.25), відповідністю спектру ФСЗ аскорбінової кислоти;
- визначення рН (2.2.23): 2.12.6;
- визначення питомого показника поглинання: 545-585.

Ідентифікацію супровідних домішок субстанції Ципрофлоксацину гідрохлорид проводять методом РХ (2.2.29).

*Рухома фаза:* фосфатний буферний розчин – ацетонітрил *P1* (25 : 75, V/V).

*Фосфатний буферний розчин:* 6,8 г калію дигідрофосфату *P* розчиняють у воді *P*, доводять до об'єму 175 мл водою *P*, фільтрують, доводять до об'єму 1000 водою *P*.

*Випробувальний розчин:* 0,500 г субстанції у рухомій фазі розчиняють, доводять до об'єму 10,0 мл рухомою фазою.



Розчини порівняння готують у рухомій фазі.

УФ-детектування при 210 нм.

Специфіковані домішки – С (D-сорбосонова кислота), D (метил-D-сорбосонат, Е (оксалатна кислота).

Неспецифіковані домішки: А, F, G, H.

Ліміти на вміст домішок (за ДФУ):

Домішки С, D – 0.15%

Домішки, окрім домішок С, D – 0.05%.

Крім перелічених методів використовують метод атомно-абсорбційної спектрометрії.

### РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Державна Фармакопея України [24] висуває певні вимоги до фармацевтичного аналізу субстанції Аскорбінова кислота.

В даній роботі дослідження субстанції аскорбату натрію з діючою речовиною аскорбінова кислота, опираючись на фармакопейні методи, виконується та описується вперше.

Субстанція аскорбінової кислоти має різну розчинність у органічних та неорганічних розчинниках: легко розчинна у воді *P*, помірно розчинна у етанолі (96%) *P*.

Температура плавлення 190°C.

Чистота. 99.0-100.5% (суха речовина).

Споріднені сполуки досліджуються методом рідинної хроматографії (РХ) (2.2.29).

Субстанцію розчиняють у рухомій фазі розчиняють, доводять до об'єму 10,0 мл рухомою фазою.

*Рухома фаза:* фосфатний буферний розчин – ацетонітрил *P1* (25 : 75, V/V).

Серед регламентованих ДФУ специфікованих домішок субстанції аскорбінової кислоти 3 речовин: С (D-сорбосонова кислота), D (метил-D-сорбосонат, E (оксалатна кислота).

ДФУ встановлюються ліміти на домішки:

Домішки С, D – 0.15%

Домішки, окрім домішок С, D – 0.05%.

Для неспецифікованих домішок ліміт 0.10%, разом – 0.5%.

Контроль специфікованих та неспецифікованих домішок виконується методом РХ.

Нами проведено хроматографічне дослідження за допомогою методу

ВЕРХ субстанції субстанції аскорбату натрію з діючою речовиною аскорбінова кислота з метою адаптування та модифікації умов хроматографування та методик проведення процедур.

### **Матеріали та методи.**

Для проведення інструментальних досліджень використовували хроматограф Agilent 1260 Infinity II з УФ детектором, колонка – Zorbax NH2 з розмірами 150x4,6x3.

#### Умови хроматографування:

- потік – 0,6 мл/хв
- детектування – УФ при 210 нм
- об'єм інжекції – 20 мкл
- температура колонки – 25°C
- температура зразка – кімнатна
- *Рухома фаза:* фосфатний буферний розчин – ацетонітрил P1 (25 : 75, V/V).

#### ***Або у іншому варіанті:***

- *рухома фаза А* – 6,8 г калію дигідрофосфату розчиняють у 1000 мл води P
- *рухома фаза В* – ацетонітрил P
- *рухома фаза* – фосфатний буферний розчин (фаза А) та ацетонітрил (фаза В) у співвідношенні 25:75 (V/V).

Час хроматографування – 60 хв.

*Методика приготування випробувального розчину:*

Приготування випробувального розчину – розчиняють в 10 мл рухомої фази А 0,500 г субстанції.

*Методика приготування розчину порівняння (а):*

Приготування розчину порівняння (а) – розчиняють в 5мл рухомій фазі А фармакопейний стандартний зразок Державної Фармакопеї України аскорбінової кислоти домішки С.

*Методика приготування розчину порівняння (b):*

Приготування розчину порівняння (b) – розчиняють в 7,5мл рухомій фазі А фармакопейний стандартний зразок Державної Фармакопеї України аскорбінової кислоти домішки D, та додають 2,5 мл розчину порівняння (а).

*Методика приготування розчину порівняння (c):*

Приготування розчину порівняння (c) – 1,0 випробуваного розчину доводять до об'єму 200,0 мл рухомою фазою. Змішують 1,0 мл отриманого розчину і 1,0 мл розчину порівняння (а).

При проведенні комп'ютерного аналізу використовували програму OpenLab CDS.

Для визначення сторонніх домішок методом ВЕРХ використовували реактиви:

- ацетонітрил (чистоти для ВЕРХ),
- вода (чистоти для ВЕРХ),
- калію дигідрофосфат.

### Отримані результати.

При дослідженні стандартних зразківДФУ – розчинів порівняння, розчинів досліджуваного зразку отримано наступні результати (табл. 3.1-3.3).

*Придатність системи:*

- співвідношення сигнал/шум для пікамдомішки С на хроматограмах розчину порівняння в становить не менше 2,0;
- ступінь розділення між піками аскорбінової кислоти та домішки С на хроматограмах розчину порівняння С складає не менше 3,0.

Таблиця 3.1. Розчин стандартний В.

Розчин В								
	Домішка D		Аскорбінова к-та		Домішка С		сигнал/ шум	R
	RT	Area	RT	Area	RT	Area		
	5,269	105,156	11,315	388,511	20,018	87,594	187,4	10,9
	5,273	105,235	11,447	391,584	19,688	87,578	172,7	10,5
	5,277	105,700	11,521	392,785	19,432	87,754	183,6	10,1
<b>Середнє</b>	<b>5,273</b>	<b>105,364</b>	<b>11,428</b>	<b>390,960</b>	<b>19,713</b>	<b>87,642</b>	<b>181,2</b>	<b>10,5</b>

Таблиця 3.2. Розчин стандартний С.

Розчин С		
	Аскорбінова к-та	
	RT	Area
	11,547	2398,772
	11,548	2489,676
	11,572	2460,337
<b>Середнє</b>	<b>11,556</b>	<b>2449,595</b>

*Розчини стандартні:*

*Аскорбінова кислота, стандарт В:*

- значення  $R_t$  знаходиться в інтервалі 11,315-11,521 хв;
- середнє значення  $R_t$  стандартів знаходиться в інтервалі 11,428 хв;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 388,511-392,785;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 390,960;

*Домішка D, стандарт В:*

- значення  $R_t$  знаходиться в інтервалі 5,269-5,277 хв;
- середнє значення  $R_t$  стандартів знаходиться в інтервалі 5,273 хв;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 105,156-105,700;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 105,364;

*Домішка С, стандарт В:*

- значення  $R_t$  знаходиться в інтервалі 19,432-20,018 хв;
- середнє значення  $R_t$  стандартів знаходиться в інтервалі 19,713 хв;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 87,578-87,754;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 87,642;

*Аскорбінова кислота, стандарт С:*

- значення  $R_t$  знаходиться в інтервалі 11,547-11,572 хв;
- середнє значення  $R_t$  стандартів знаходиться в інтервалі 11,556 хв;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 2398,772-2489,676;

- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 2449,595 (рис.3.1, 3.2);

Хроматограми представлено на рисунках 3.1, 3.2.

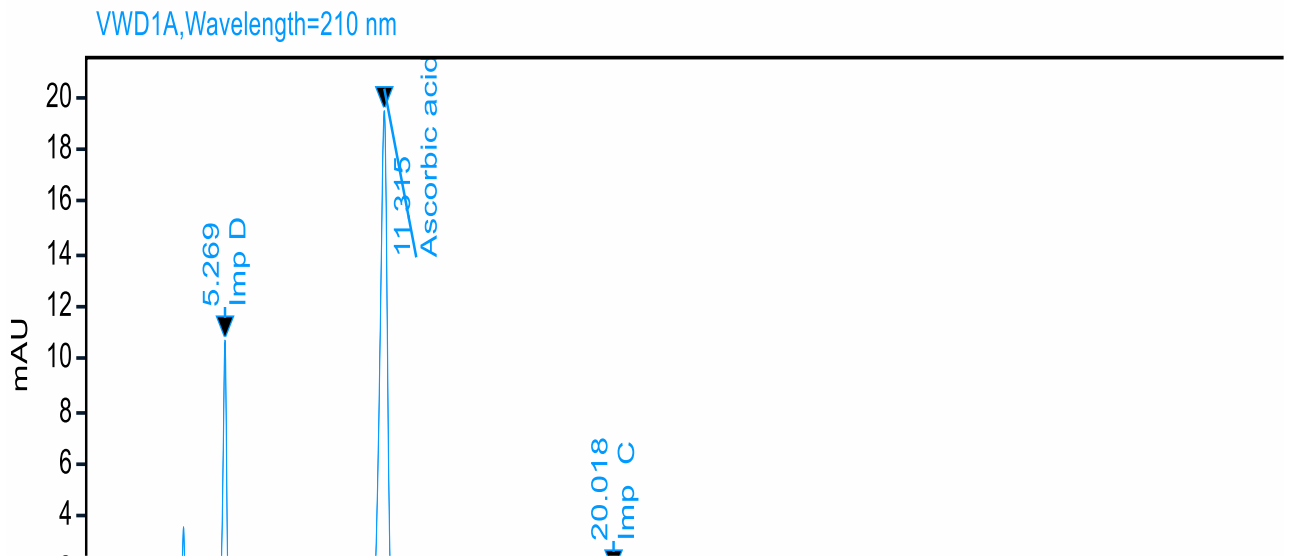


Рисунок 3.1. Хроматограма стандартного зразку В: аскорбінова кислота (Rt=11,315 хв), домішка D (Rt=5,269 хв), домішка C (Rt=20,018 хв).

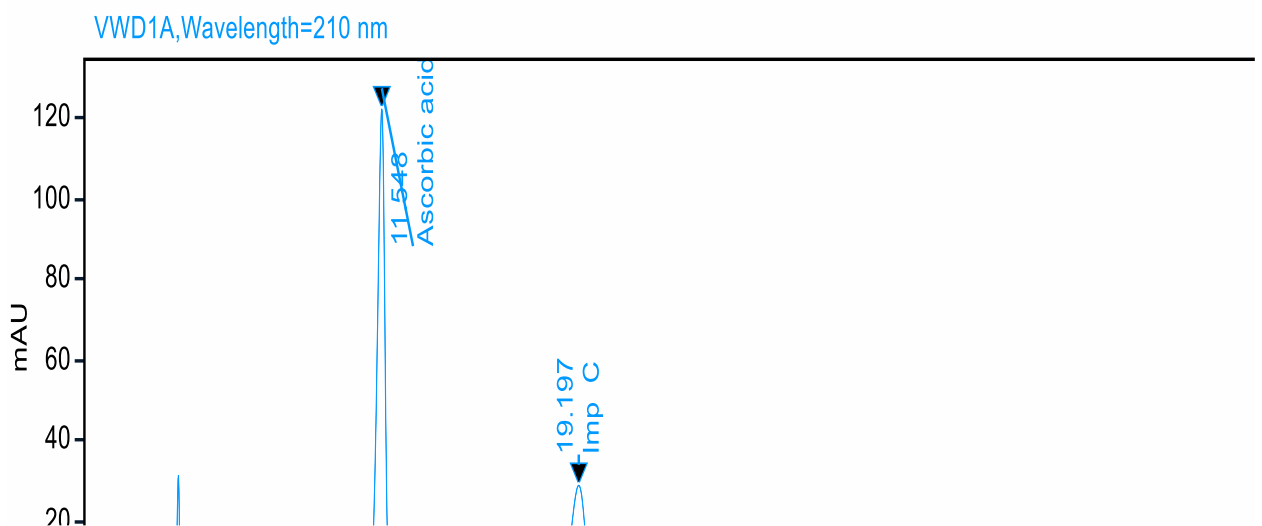


Рисунок 3.2. Хроматограма стандартного зразку С: аскорбінова кислота (Rt=11,546 хв), неідентифікована домішка (Rt=3,869 хв), домішка C (Rt=19,197 хв).

Таблиця 3.3. Розчин досліджуваного зразку.

Зразок								
	Imp 1		Imp 2		Домішка D		Imp 3	
	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area
		3,005	79,144	3,650	317,408	5,343	139,128	7,723
	2,984	82,261	3,641	326,689	5,356	145,505	7,744	880,268
	2,982	83,693	3,634	335,025	5,364	151,755	7,741	747,218
<b>Середнє</b>	<b>2,990</b>	<b>81,699</b>	<b>3,642</b>	<b>326,374</b>	<b>5,354</b>	<b>145,463</b>	-	-

Зразок (продовження)					
Аскорбінова к-та		Imp 4		Домішка C	
RT	Area	RT	Area	RT	Area
12,018	311647,069	14,452	181,514	-	-
12,397	313282,193	14,523	202,349	-	-
12,341	317075,906	14,310	236,318	-	-
<b>12,252</b>	<b>314001,723</b>	<b>14,428</b>	<b>206,727</b>	-	-

Розчини стандартні:

Аскорбінова кислота, зразок:

- значення Rt знаходиться в інтервалі 12,018-12,341 хв;
- середнє значення Rt стандартів знаходиться в інтервалі 12,252 хв;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 311647,069-317075,906;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 314001,723;

Домішка D, зразок:

- значення Rt знаходиться в інтервалі 5,343-5,364 хв;
- середнє значення Rt стандартів знаходиться в інтервалі 5,354 хв;



- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 139,128-151,755;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 145,463;

*Домішка С, зразок: -*

*Домішка І, зразок:*

- значення  $R_t$  знаходиться в інтервалі 2,982-3,005 хв;
- середнє значення  $R_t$  стандартів знаходиться в інтервалі 2,990 хв;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 79,144-83,693;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 81,699;

*Домішка 2, зразок:*

- значення  $R_t$  знаходиться в інтервалі 3,634-3,650 хв;
- середнє значення  $R_t$  стандартів знаходиться в інтервалі 3,642 хв;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 317,408-335,025;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 326,374;

*Домішка 3, зразок:*

- значення  $R_t$  знаходиться в інтервалі 7,723-7,744 хв;
- середнє значення  $R_t$  стандартів знаходиться в інтервалі 7,735 хв;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 596,211-880,268;

*Домішка 4, зразок:*

- значення  $R_t$  знаходиться в інтервалі 14,310-14,523 хв;
- середнє значення  $R_t$  стандартів знаходиться в інтервалі 14,428 хв;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 181,514-236,318;

- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 206,727 (рис. 3.3).

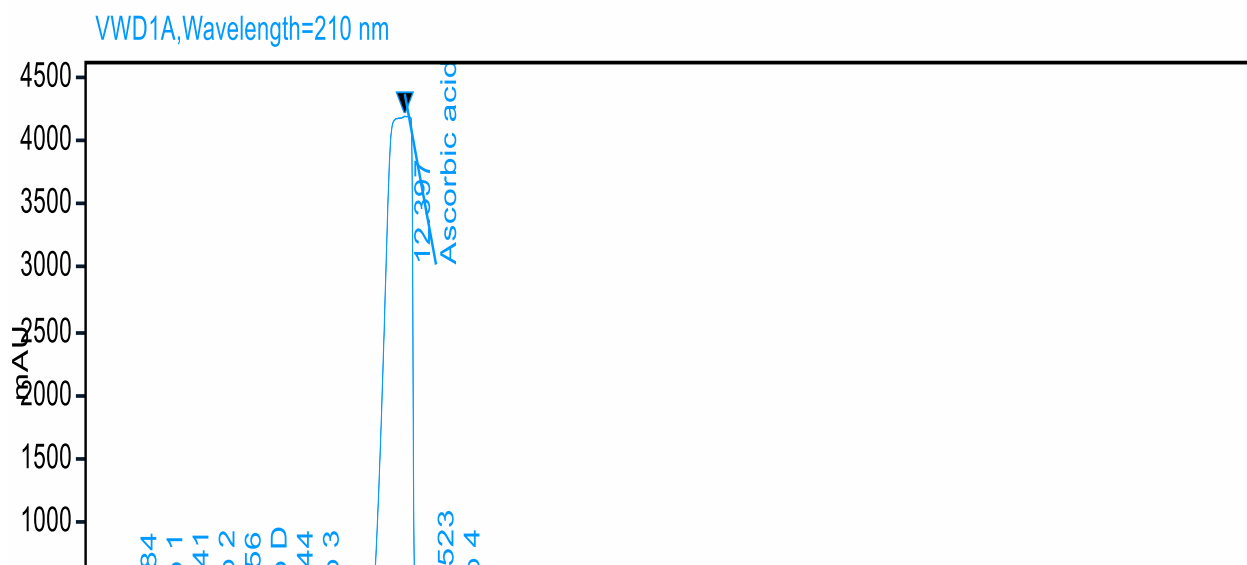


Рисунок 3.3. Хроматограма зразку: аскорбінова кислота ( $R_t=12,301$ хв), домішка D ( $R_t=5,356$  хв), неідентифіковані домішки: imp1 ( $R_t=2,984$  хв), imp2 ( $R_t=3,641$  хв), imp3 ( $R_t=7,744$  хв), imp4 ( $R_t=14,523$  хв).

Таким чином, у досліджуваному зразку субстанції аскорбінової кислоти не виявлено специфікованої домішки С, однак виявлено 4 неприпустимі домішки: imp1 ( $R_t=2,984$  хв), imp2 ( $R_t=3,641$  хв), imp3 ( $R_t=7,744$  хв), imp4 ( $R_t=14,523$  хв).

Аскорбінова кислота (зміни, що відбулися у хроматографічній картині):

Аскорбінова кислота, стандарт В:	Аскорбінова кислота, зразок:
значення $R_t$ знаходиться в інтервалі <b>11,315-11,521 хв;</b>	значення $R_t$ знаходиться в інтервалі <b>12,018-12,341 хв;</b>

<p>середнє значення Rt стандартів знаходиться в інтервалі <b>11,428 хв</b>;</p> <p>площина піка на хроматограмі коливається в інтервалі <b>388,511-392,785</b>;</p> <p>середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку <b>390,960</b>;</p>	<p>середнє значення Rt стандартів знаходиться в інтервалі <b>12,252 хв</b>;</p> <p>площина піка на хроматограмі коливається в інтервалі <b>311647,069-317075,906</b>;</p> <p>середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку <b>314001,723</b>;</p>
--	---

## ВИСНОВКИ

1. Адаптувано умови хроматографування методом ВЕРХ субстанції аскорбату натрію з діючою речовиною аскорбінова кислота з метою визначення її чистоти: *замість використання рухомої фази: фосфатний*

буферний розчин – ацетонітрил *P1* (25 : 75, V/V) (за ДФУ) розроблена нова система, а саме: *рухома фаза А* – 6,8 г калію дигідрофосфату розчиняють у 1000 мл води *P*, *рухома фаза В* – ацетонітрил *P*, *рухома фаза* – фосфатний буферний розчин (фаза А) та ацетонітрил (фаза В) у співвідношенні 25:75 (V/V).

2. Розроблені та модифіковані методики хроматографування методом ВЕРХ субстанції аскорбату натрію з діючою речовиною аскорбінова кислота: досліджувану субстанцію розчиняли у рухомої фазі А.
3. За допомогою ВЕРХ методу знайдено у складі досліджуваного зразку не виявлено специфікованої домішки С, однак виявлено 4 неприпустимі домішки: *imp1* ( $R_t=2,984$  хв), *imp2* ( $R_t=3,641$  хв), *imp3* ( $R_t=7,744$  хв), *imp4* ( $R_t=14,523$  хв).

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Lemons, raw, without peel. *USDA* (англ.). USDA. 4/1/2019. Процит. 2023.
2. Rose Hips, wild (Northern Plains Indians). *USDA* (англ.). USDA. 4/1/2019. Процит. 2023.

3. Currants, european black, raw. *USDA* (англ.). USDA. 4/1/2019. Процит. 2023.
4. Onions, young green, tops only. *USDA* (англ.). USDA. 4/1/2019. Процит. 2023.
5. Anal Parimal Desai, Shuchi Desai. UV Spectroscopic Method for Determination of Vitamin C (Ascorbic Acid) Content in Different Fruits in South Gujarat Region. *Int. J.of Environmental Sciences&Natural Resurces*. V. 21 Issue 2.2019. DOI: [10.19080/IJESNR.2019.21.556056](https://doi.org/10.19080/IJESNR.2019.21.556056)
6. S.M. Joel Kopple, K. Kalantar-Zadeh (Eds.), *Nutritional Management of Renal Disease* (4th edn), Elsevier, Denis Fouque (2021).
7. G. Bjelakovic, D. Nikolova, L.L. Gluud, R.G. Simonetti, C. Gluud. Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various disease. *Cochrane Database Syst Rev* (2008), p. CD007176.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. C. Xu, E.R. Smith, M.K. Tiong, I. Ruderman, N.D. Toussaint. Interventions to Attenuate vascular calcification progression in chronic kidney disease: a systematic review of clinical trials. *J Am Soc Nephrol*, 33 (2022), pp. 1011-1032.

12. J.L. Martel, D.S. Franklin. Vitamin B1 (thiamine). StatPearls, Treasure Island, FL (2019).
13. Angela Yee-Moon Wang, Brandon M. Kistler, Kelly Lambert, Keiichi Sumida, Linda W. Moore, Kamyar Kalantar-Zadeh MD, MPH. Nutrition and Metabolism for Kidney Health and Disease Management: 45 years of Development and Future Directions Under the International Society of Renal Nutrition and Metabolism. *Journal of Renal Nutrition*. V. 33, Is.6, Supplement, November 2023, pp S1-S5.
14. C. Chazot, A. Steiber, J.D. Kopple. Vitamin needs and treatment for chronic kidney disease patients. *J Ren Nutr*, 33 (2023), pp. S21-S29.
15. K.M. Livingstone, O. Ramos Lopez, L. Pérusse, H. Kato, J.M. Ordovas, J.A. Martínez. Precision nutrition: a review of current approaches and future endeavors. *Trends Food Sci Technol*, 128 (2022), pp. 253-264
16. K.E. Bach, J.T. Kelly, S.C. Palmer, S. Khalesi, G.F.M. Strippoli, K.L. Campbell. Healthy dietary patterns and incidence of CKD: a meta-analysis of cohort studies. *Clin J Am Soc Nephrol*, 14 (2019), pp. 1441-1449.
17. S.R. Price, W.E. Mitch, G. Garibotto. Muscle atrophy in CKD: a historical perspective of advancements in its understanding. *J Ren Nutr*, 33 (2023), pp. S88-S92.
18. C. Chazot, A. Steiber, J.D. Kopple. Vitamin metabolism and requirements in kidney disease and kidney failure. S.M. Joel Kopple, K. Kalantar-Zadeh (Eds.), *Nutritional Management of Renal Disease* (4th edn), Elsevier, Denis Fouque (2021).
19. G. Bjelakovic, D. Nikolova, L.L. Gluud, R.G. Simonetti, C. Gluud. Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases. *Cochrane Database Syst Rev* (2008), p. CD007176.

- 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 NH<sub>2</sub>, 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<sub>t</sub>=2.984 min), imp2 (R<sub>t</sub>=3.641 min), imp3 (R<sub>t</sub>=7.744 min), imp4 (R<sub>t</sub> =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.

