

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я  
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ  
О.О.БОГОМОЛЬЦЯ**

**ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ**  
Кафедра хімії ліків та лікарської токсикології

**ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

**на тему: «РОЗРОБКА МЕТОДИКИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТА  
КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ БІОТИНУ МЕТОДОМ  
ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ В  
ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ ТА ДІЄТИЧНИХ ДОБАВКАХ»**

**Виконала:** здобувачка вищої освіти 5 курсу, групи 9801  
226 «Фармація. Промислова фармація»  
Освітньої програми «Фармація»  
Ушакова Софія Сергіївна

**Керівник:** кандидат фармацевтичних наук, доцент  
кафедри хімії ліків та лікарської токсикології,  
Бурмака Олександр Васильович

**Рецензент:** кандидат фармацевтичних наук, доцент кафедри  
аптечної та промислової технології ліків  
Козіко Наталія Олександрівна

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	4
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. Загальна характеристика біотину: хімічна структура, історія відкриття, застосування.....	10
1.1. Застосування біотину для профілактики та лікування захворювань шкіри, волосся та нігтів. Загальний вплив на організм людини.....	10
1.2. Біотин: фізико-хімічні властивості.....	13
1.3. Механізм дії та метаболізм біотину.....	15
1.4. Фармакологічні ефекти, передозування та побічні реакції.....	17
1.5. Ідентифікація та кількісне визначення біотину.....	20
1.6. Метод ВЕРХ.....	21
РОЗДІЛ 2. Розробка методики ідентифікації біотину методом високоефективної рідинної хроматографії. Визначення можливості використання розробленої методики для лікарських засобів та дієтичних добавок.....	25
2.1. Обґрунтування використання методу високоефективної рідинної хроматографії для випробування.....	25
2.2. Характеристика зразків лікарських засобів та дієтичних добавок вибраних для випробування.....	25
2.3. Підготовка випробуваних та стандартних розчинів. Результати розробки способу пробопідготовки.....	27
2.4. Результати експериментального підбору хроматографічної колонки, складу рухомої фази, довжини хвилі детектора для досягнення умов придатності системи.....	30
2.5. Перевірка придатності хроматографічної системи та результати ідентифікації біотину методом ВЕРХ.....	30

2.6. Кількісне визначення досліджуваних зразків.....	47
ВИСНОВКИ.....	50
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	51

## **ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ**

**ВЕРХ** – Високоєфективна рідинна хроматографія

**FDA** - Управління з контролю за якістю харчових продуктів та лікарських засобів США

**ДФУ** – Державна Фармакопея України

**СЗ** – стандартний зразок

## ВСТУП

**Актуальність теми.** За останні 20 років спостерігалось значне зростання поширеності вживання дієтичних добавок. Споживачам пропонується велика кількість продуктів, брендів і рецептур, які поширюються через широкий спектр маркетингових каналів. Вартість світового ринку дієтичних добавок у 2021 році оцінювалась приблизно в 152 мільярди доларів США. Згідно з останнім звітом STASTICA, до 2028 року очікується, що світовий ринок становитиме 300 мільярдів доларів США [5].

В Україні, США та Європейському Союзі дієтичні добавки займають особливу нішу серед харчових продуктів, маючи власне законодавче поле регулювання у сфері харчових продуктів [3,16]. Дієтичні добавки - це концентровані джерела поживних речовин, які вживаються у невеликих кількостях для доповнення раціону харчування. Вони можуть містити білки, жири, вуглеводи, вітаміни та мінерали. Випускаються у різноманітних форматах, таких як капсули, таблетки, пастилки, саше, ампули з рідиною та пляшки для крапельного дозування. Дієтичні добавки не є лікарськими засобами, тому споживаються окремо, як доповнення до звичайного раціону харчування або в комбінаціях з іншими продуктами харчування [4].

На сьогоднішній день, реєстрацію дієтичних добавок відмінено, вони можуть продаватися, виключно на основі сертифікату, виданого виробником. Виробник несе повну відповідальність за якість та безпеку своєї продукції. Закон не передбачає регулярних перевірок дієтичних добавок. Лише у випадку виникнення сумнівів або за скарг споживачів, Держпродспоживслужба може провести лабораторні дослідження продукції. Однак, в Україні немає чіткої нормативної бази, яка б гарантувала якість та безпеку дієтичних добавок.

Оскільки ринок дієтичних добавок зростає та стає більш прибутковим, важливість забезпечення якості продукції лишається актуальною, як і проблеми, пов'язані з цим завданням. Тому заклик до глобальних стандартів

якості та посилення уваги до регуляторних проблем, пов'язаних із дієтичними добавками, є необхідними, оскільки фальсифіковані або неправильно марковані продукти можуть обходити існуючі правила, що призводить до збільшення частоти побічних реакцій, спричинених забруднювачами або домішками в продукті, а не інгредієнтами самих добавок [11].

Недавнє дослідження Національного опитування щодо стану здоров'я та харчування показало, що майже 88% респондентів, які вживали дієтичні добавки, повідомили, що приймають їх для здоров'я шкіри, волосся та нігтів. Найпоширенішими захворюваннями, згаданими в публікаціях, були випадіння волосся (31%), акне (20%), старіння (14%), гіперпігментація (13%) і зморшки (7%)[9]. У центрі цієї тенденції знаходиться біотин, вітамін В-комплексу (також відомий, як вітамін В7), який відіграє важливу роль у метаболізмі вуглеводів, жирів та білків. До складу дієтичних добавок, вітамін В7 переважно входить у дозуваннях 2,5 мг., 5 мг., та 10 мг..

Актуальність дієтичних добавок для шкіри, волосся та нігтів також зросла з 2019 року, від початку пандемії Covid-19. Відомо, що захворювання на коронавірус викликає тяжкі респіраторні ускладнення, проте пацієнти з COVID-19 також відчують різні симптоми, включаючи дерматологічні прояви, такі як часті герпетичні ураження та випадіння волосся. Надмірне випадіння волосся, в свою чергу, може виникати, як реакція на гострий хворобливий процес або з причини аутоімунної етіології [21].

Згідно статистичних даних за 2024 рік випадіння волосся уражає 85% чоловіків і 50% жінок протягом життя. Близько 70% випадків випадіння волосся у людей спричинено генетичною схильністю. Крім того також з віком спостерігається значне погіршення якості нігтьової пластини, причинами цього явища є не лише механічне втручання, але й вікові зміни, як правило ламкість збільшується з віком, вражаючи 19% пацієнтів молодше 60 років і 35% населення старше 60 років. Жінки в постменопаузі особливо схильні до

ламкості нігтів, що частково може бути пов'язано зі зниженням вмісту сульфату холестерину в нігтьовій пластині [6].

Занепокоєння з приводу неправильної ідентифікації інгредієнтів у дієтичних добавках і питань контролю якості залишаються критичними для промисловості та громадськості. Інгредієнти, що використовуються в дієтичних добавках, повинні бути ідентифіковані шляхом застосування відповідних аналітичних методів і розробки еталонних стандартів. Для демонстрації ефективності часто потрібні кілька дослідницьких методологій, починаючи від основних досліджень механізмів дії *in vitro* і закінчуючи дослідженнями на тваринах і людях. Крім того, існує нагальна потреба в більшій кількості і кращих клінічних дослідженнях ефективності та безпеки дієтичних добавок, враховуючи можливі наслідки для здоров'я.

**Мета дослідження:** розробити методики ідентифікації та кількісного визначення біотину, як можливого компоненту дієтичних добавок та лікарських засобів, що застосовуються в якості додаткової комплексної терапії при лікуванні захворювань шкіри, волосся та нігтів.

З метою досягнення поставленої мети необхідно вирішити наступні **завдання:**

- охарактеризувати біотин, як можливий компонент дієтичних добавок та лікарських засобів, що застосовуються в якості комплексної терапії для лікування шкіри волосся та нігтів, а також його вплив на організм людини;
- дослідити особливості пробопідготовки досліджуваних зразків з вмістом біотину, що використовуються в даній роботі;
- підібрати найоптимальніші умови визначення біотину за допомогою методу ВЕРХ;
- розробити методики ідентифікації та кількісного визначення біотину у складі дієтичних добавок та лікарських засобів, представлених у вигляді таблеток та капсул, з використанням інструментального методу аналізу.

**Об’єкт дослідження** – біотин, як можливий компонент у складі дієтичних добавок та лікарських засобів, що застосовуються у комплексній терапії лікування захворювань шкіри, волосся та нігтів.

**Предмет дослідження** – методики ідентифікації та кількісного визначення біотину, як можливого компоненту у складі дієтичних добавок та лікарських засобів, що застосовуються у комплексній терапії лікування захворювань шкіри, волосся та нігтів.

**Методи дослідження.** У процесі роботи був використаний метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

**Практичне значення отриманих результатів.** У ході досліджень були розроблені методики ідентифікації та кількісного визначення біотину у складі дієтичних добавок та лікарських засобів. За допомогою розробленої методики можливо ідентифікувати досліджувану сполуку біотину у складі дієтичних добавок та лікарських засобів, з метою належного забезпечення контролю їхньої якості.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Розроблено методику для можливості ідентифікації та кількісного визначення біотину у складі дієтичних добавок та лікарських засобів.

**Апробація результатів дослідження.** Основні результати роботи було представлено на: IV Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «ПРОБЛЕМИ ТА ДОСЯГНЕННЯ СУЧАСНОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ» (22 березня 2024 р., м. Харків, Україна), XVII Міжнародній конференції Захід-Схід 2024 (26 квітня 2024 р., м. Варшава, Польща), Квітневій науковій сесії – 2024 «РОЗРОБКА МЕТОДИКИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ БІОТИНУ МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ В ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ ТА ДІЄТИЧНИХ ДОБАВКАХ» (26 квітня 2024 р., м. Київ, Україна).

**Публікації.** За матеріалами випускної кваліфікаційної роботи було опубліковано тези в Українському науково-медичному молодіжному журналі,



збірці матеріалів IV Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції, збірці матеріалів XVII Міжнародної конференції Захід-Схід 2024.

**Структура роботи.** Обсяг кваліфікаційної випускної роботи викладений на 58 сторінках машинописного тексту. Структура вміщає вступ, перелік умовних позначень, 2 розділи (огляд літератури, матеріали, методи та результати дослідження), висновків, списку використаних джерел кількістю 27 (18 англомовних джерел, 9 україномовних), додатків та анотації англійською мовою.

## ВИСНОВКИ

1. З використанням літературних джерел, був охарактеризований біотин, як компонент дієтичних добавок та лікарських засобів, його фізико-хімічні властивості, особливості метаболізму та загальний вплив на організм людини.
2. В рамках роботи були проаналізовані та досліджені особливості пробопідготовки досліджуваних зразків дієтичних добавок та лікарських засобів, що містять біотин.
3. У ході досліджень були підібрані найоптимальніші умови визначення біотину методом ВЕРХ.
4. Вперше були розроблені методики ідентифікації та кількісного визначення біотину у складі дієтичних добавок та лікарських засобів у формах таблеток та капсул, з використанням інструментального методу аналізу.
5. У результаті проведених досліджень було виявлено, що п'ять досліджуваних зразків, чотири з яких зареєстровані, як лікарські засоби та один – дієтична добавка, містять 100% біотину, згідно заявленого складу. Інші два зразки, представлені дієтичними добавками, 47,1% та 58,6%, відповідно.
6. Розроблена методика може використовуватись для ідентифікації та кількісного визначення біотину у складі аналогічних дієтичних добавок та лікарських засобів.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Мінаєва О.В. Хроматографічний аналіз. Черкаси. 2013. 116-117 с.
2. Олександра Паллаг. Медична біохімія: навч. посіб. Ужгород. 2023. 72 с.
3. Тимченко О.В., А.Г. Котов. Огляд законодавчих змін у сфері забезпечення якості дієтичних добавок в Україні. *Фармаком.* 2018. № 4. С. 16.
4. Про основні принципи та вимоги до безпечності та якості харчових продуктів: Закон України від 23 грудня 1997 р. № 771/97-ВР.  
URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/771/97%D0%B2%D1%80#Text>
5. Ariadna C Perez-Sanchez, Emily K Burns, Veronica M Perez, Evelyne K Tantry, Sahana Prabhu, and Rajani Katta. Safety Concerns of Skin, Hair and Nail Supplements in Retail Stores. 2020. Vol.12 (7)//////////
6. Birch TW, György P. "Physicochemical Properties of the Factor (vitamin H) Curative of Egg White Injury". *Journal of Biological Chemistry.* 1939. Vol. 131 (2). P.761–66.
7. Carolyn D. Berdanier, Lynnette A. Berdanier. *Advanced Nutrition. Macronutrients, Micronutrients, and Metabolism, Second Edition.* Boca Raton. 2015. 2nd Edition. P. 407.
8. DuVigneaud V, Hofmann K, Melville DB, György P. "Isolation of Biotin (vitamin H) from Liver". *Journal of Biological Chemistry.* 1941. Vol. 140 (2). P. 643–51.
9. Dina H. Zamil, May Ameri, Shangyi Fu, Ferris M. Abughosh and Rajani Katta. Skin, hair, and nail supplements advertised on Instagram. 2022. Vol. 36(1). P. 38-40.
10. Deepa P. Patel, Shane M. Swink, and Leslie Castelo-Soccio. A Review of the Use of Biotin for Hair Loss. 2017. Vol.3(3). P.166-169.
11. Fatima Saleem, Michael P. Soos. Biotin Deficiency. King Edward Medical University, McLaren Greater Lansing. 02.2023. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547751/>

12. Gyorgy P, Rose. "The Liberation of Biotin from the Avidin-Biotin Complex (AB)". *Experimental Biology and Medicine*.1943. Vol. 53 (1). P.55–7.
13. Ilana Rosner, Everett Rogers, Amanda Maddrey, and David M Goldberg. Clinically Significant Lab Errors due to Vitamin B7 (Biotin) Supplementation: A Case Report Following a Recent FDA Warning. 2019. Vol 11(8).
14. Janos Zempleni, Yousef I Hassan, and Subhashinee SK Wijeratne. Biotin and biotinidase deficiency. 2008. Vol.3(6). P. 715-724.
15. Janos Zempleni, Subhashinee S.K. Wijeratne, and Yousef I. Hassan. Biotin. *Biofactors*. 2009. Vol 35(1). P. 36-46.
16. Kögl and Tönnis. "Über das Bios-Problem. Darstellung von krystallisiertem Biotin aus Eigelb. 20. Mitteilung über pflanzliche Wachstumsstoffe". *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*. 1936. Vol. 242 (1–2): P.43–73.
17. Maddy AJ, Tosti A. Hair and nail diseases in the mature patient. 2018. Vol 36 (2). P.159–166.
18. Paul Lawrance & Indu Patel. The determination of biotin in food using HPLC. National Measurement Office under the Government Chemist Programme. 2014. P. 1,2,3.
19. Shari R. Lipner MD PhD. Update on Biotin Therapy in Dermatology: Time for a Change. 2020. Vol 19(12). P. 1264.
20. Teo Soleymani MD, Kristen Lo Sicco MD, and Jerry Shapiro MD FAAD FRCPC. The Infatuation With Biotin Supplementation: Is There Truth Behind Its Rising Popularity? A Comparative Analysis of Clinical Efficacy versus Social Popularity. 2017. Vol.16(5). P.496-500.
21. Torrey Czech, Satoru Sugihara, Yoshito Nishimura. Characteristics of hair loss after COVID-19: A systematic scoping review. *J Cosmet Dermatol*. 2022.Vol.21(9). P. 3655-3662.
22. European Pharmacopoeia 11.1. Biotin 01/04/2023: 1073.

23. «Державний реєстр лікарських засобів України». Біотин-КВ. URL:  
<http://www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlz1?opendocument&stypе=3ABE13607A2F1981C225894900445E44>
24. [Електронний ресурс]: <https://www.enhance-me-training.com/lessons/history-of-biotin-copy/>
25. [Електронний ресурс]:  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Biotin>
26. [Електронний ресурс]: <https://lpi.oregonstate.edu/mic/vitamins/biotin>
27. [Електронний ресурс]:  
[https://moodle.znu.edu.ua/pluginfile.php/645465/mod\\_resource/content/0/\\_D0%9B%D0%A06.pdf](https://moodle.znu.edu.ua/pluginfile.php/645465/mod_resource/content/0/_D0%9B%D0%A06.pdf).

## Апробація результатів

1. IV Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «ПРОБЛЕМИ ТА ДОСЯГНЕННЯ СУЧАСНОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ» (22 березня 2024 р., м. Харків, Україна).



МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ  
ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ  
ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ  
УНІВЕРСИТЕТ

КАФЕДРА БІОТЕХНОЛОГІЇ

# СЕРТИФІКАТ

*учасника*  
№427

Цим засвідчується, що

**Ушакова С. С.**

брав(ла) участь у роботі IV Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції  
**«ПРОБЛЕМИ ТА ДОСЯГНЕННЯ СУЧАСНОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ»**  
(тривалість - 8 год)  
22 березня 2024 р., м. Харків, Україна



В.о. ректора НФаУ,  
д. фарм. н., проф. 

Проректор з НР,  
д. фарм. н., проф. 

Завідувачка кафедри біотехнології НФаУ,  
д. фарм. н., проф. 

Алла КОТВИЦЬКА

Інна ВЛАДИМИРОВА

Наталя ХОХЛЕНКОВА

2. XVII Міжнародна конференція Захід-Схід 2024 (26 квітня 2024 р., м. Варшава, Польща).



RECTOR OF THE  
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW  
and  
THE DEAN OF THE FACULTY OF MEDICINE AND DENTISTRY

Would like to express their sincere gratitude to

*Sofia... Ushakova....*

for presenting a poster at the 17th International  
Conference "West-East"  
on the issue of

*Development of a method for the identification and assay of biotin by high  
performance liquid chromatography in medicines and dietary supplements*

DEAN  
Faculty of Medicine and Dentistry

Professor Dorota Olczak-Kowalczyk, DMD, PhD

RECTOR  
Medical University of Warsaw

Professor Zbigniew Gaciong, MD, PhD

Warsaw, April 26, 2024.

3. Квітнева наукова сесія – 2024 «РОЗРОБКА МЕТОДИКИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ БІОТИНУ МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ В ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ ТА ДІЄТИЧНИХ ДОБАВКАХ» (26 квітня 2024 р., м. Київ, Україна).





## SUMMARY

**Ushakova Sofia**

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR THE IDENTIFICATION AND ASSAY OF BIOTIN BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY IN MEDICINES AND DIETARY SUPPLEMENTS

**Department of Drug Chemistry and Drug Toxicology**

**Scientific supervisor:** Burmaka Oleksandr, Candidate of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor of the Department of Drug Chemistry and Drug Toxicology, Bogomolets National Medical University.

**Keywords:** dietary supplement, biotin, HPLC method, mobile phase, chromatographic column.

**Introduction.** A survey conducted by the National Institute of Health found that nearly 88% of respondents who use dietary supplements do so to improve the condition of their skin, hair and nails. The most popular dietary supplement in this category is biotin, a vitamin B7 that is important for the metabolism of carbohydrates, fats and proteins.

**Materials and methods.** Qualitative and quantitative determination of biotin was carried out using a physicochemical method of analysis - high-performance liquid chromatography. Seven samples were examined (four samples were medicinal products, three were dietary supplements). The biotin content is indicated in the instructions and recommendations for medical use in all of the above samples.

**Results.** The study showed that the five samples under study, four of which are medicinal products and one is a dietary supplement, contain biotin at about 100% of the amount indicated in the composition. The other two samples, represented by dietary supplements, contain 47% and 58% biotin, respectively.

The work was carried out on an «Agilent 1200» analytical system.

A Hypersil ODS 250 x 4.6 mm chromatographic column with a particle size of 5  $\mu\text{m}$  was used for the separation of biotin. As a mobile phase, a phosphate buffer solution of pH 2.6 and acetonitrile in a ratio of 85 : 15 v/v %. The phosphate buffer solution was prepared using 3.99 g of sodium dihydrogen phosphate, placed in a 1000 ml volumetric flask, dissolved in water, made up to the mark with water, and stirred. the pH of the solution was adjusted to 2.6 with phosphoric acid.

The flow rate of the mobile phase was 1.0 ml/min. The detection was performed on a detector at a wavelength of 200 nm, because at this wavelength the maximum absorption of biotin compound in the ultraviolet region is observed. The column temperature was 30 °C. The sample solutions were prepared at the required concentration by adding 0.01 M potassium hydroxide solution, using an ultrasonic bath for 5 min, followed by filtering through a nylon membrane filter with a pore diameter of 0.45  $\mu\text{m}$ .

**Conclusions.** A methodology has been developed using a sensitive method of HPLC, which allows the identification and quantification of biotin in medicines and dietary supplements.