

**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 і валідація методики кількісного визначення вмісту  
сквалену і амарантової олії в насінні амаранту різних сортів

Виконав: здобувач вищої освіти 5 курсу, групи  
9802 напрямку підготовки (спеціальності)  
226 «Фармація, Промислова фармація»  
(шифр і назва напрямку підготовки, спеціальності)

Фармація

(назва освітньої програми)

Нінчук О. О.

(прізвище та ініціали)

Керівники: к.хім.н. Сиротчук О. А.,

к.хім.н., доцент Глушаченко О. О.

(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Рецензент д.фарм.н., професор Карпюк У. В.

(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

**Київ – 2024 рік**

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	4
ВСТУП .....	5
РОЗДІЛ 1. ОСНОВНА ЧАСТИНА.....	7
1.1. Характеристика сквалену .....	7
1.2. Біологічна активність сквалену .....	8
1.3. Амарантова олія та її фармакологічні властивості.....	9
1.4. Поширені сорти амаранту України .....	10
1.5. Методи екстрагування сквалену та олії.....	10
1.6. Методи кількісного визначення сквалену та олії .....	14
РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРЕМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	17
2.1. Матеріали та методи дослідження .....	17
2.2. Використане обладнання та умови хроматографування.....	17
2.3. Приготування розчинів.....	19
РОЗДІЛ 3. РОЗРОБКА ЕКОБЕЗПЕЧНОЇ МЕТОДИКИ ЕКСТРАКЦІЇ СКВАЛЕНУ ТА ОЛІЇ В НАСІННІ АМАРАНТУ .....	22
3.1. Вибір екстрагента.....	22
3.2. Умови екстракції .....	23
3.3. Схема одночасної екстракції сквалену та олії .....	23
3.4. Результати екстракції сквалену .....	25
3.5. Результати екстракції олії .....	29
3.6. Порівняння профілів тригліцеридів амарантової олії в різних сортах олії .....	33
РОЗДІЛ 4. ПЕРЕВІРКА ПРИДАТНОСТІ СИСТЕМИ ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ .....	40
4.1. Перевірка придатності хроматографічної системи .....	40
4.2. Селективність .....	42
4.3. Лінійність, правильність, прецизійність.....	43
РОЗДІЛ 5. РЕЗУЛЬТАТИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ.....	49
5.1. Результати визначення сквалену та олії .....	49
ВИСНОВКИ.....	50

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	51
ДОДАТОК А. Термінологія .....	55
ДОДАТОК Б. Формули .....	61
ДОДАТОК С. Сертифікати публікацій.....	64
SUMMARY .....	65

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

БАД – біологічно активна добавка

БАР – біологічно активна речовина

ГМГ КоА - 3-гідрокси-3-метилглутарил-коензим А

ГХ – газова хроматографія

ВЕРХ – високо ефективна рідинна хроматографія

ВЕРХ-УФ - високоефективна рідинна хроматографія з ультрафіолетовим детектуванням

ВЕРХ-ДД - високоефективна рідинна хроматографія з діодним детектуванням

УЗ-баня – ультразвукова баня

ДФУ - Державна Фармакопея України

## ВСТУП

**Актуальність теми:** полягає в наростаючому науковому та промисловому інтересі до амаранту в останні роки. Амарант відомий своїми цілющими властивостями, а також використовується для створення біологічно активних добавок, функціональних продуктів харчування та ліків. Цінні біологічні властивості рослини, її різноманітний фітохімічний склад та широкий спектр фармакологічної активності створюють потенційні можливості для застосування амаранту в фармації, медицині та промисловості.

Важливість визначення вмісту сквалену та амарантової олії в насінні амаранту різних сортів необхідна для оцінки якості та корисності рослини для промислових та медичних потреб. Точне визначення даних компонентів є ключовим у виборі сортів, які найкраще відповідають вимогам стандартів якості виробників лікарських засобів, косметичних продуктів та харчової промисловості. Це особливо важливо з огляду на їхні цілющі властивості, такі як антиоксидантні та протизапальні ефекти.

Визначення олії в рослинній сировині зазвичай проводять ресурсозатратними методами, зокрема різними видами екстракцій і наступним випаренням розчинника і зважування залишку, що є також в більшості випадків неекспресивним підходом. Враховуючи те, що сквален визначають хроматографічно, то було б доцільно в ході цього визначення визначати і олію. Цей підхід дозволить ефективно та оперативно оцінювати якість сировини, що відкриє шлях до прискореного виробництва продуктів із використанням амаранту. Такий підхід сприятиме експресності визначення характеристик сировини.

**Мета:** розробити експресивну методіку одночасного визначення сквалену і олії в насінні амаранту. Розробити умови екстракції сквалену і амарантової олії з насіння амаранту. Встановити вміст сквалену і олії в насінні амаранту різних сортів.

### **Завдання:**

1. Провести літературний пошук методик визначення сквалену в насінні амаранту, перевірити чи визначали сквален безпосередньо з насіння амаранту. Провести літературний пошук методів визначення олії в олієвмісній сировині в принципі, чи існують методики хроматографічного визначення цієї характеристики.
2. Встановити умови для вичерпної екстракції сквалену і олії з насіння амаранту.
3. Розробити умови хроматографування для одночасного визначення сквалену і олії.
4. Провести валідацію методики визначення сквалену і олії в насінні амаранту.
5. Визначити вміст сквалену і олії в насінні амаранту різних сортів.

**Методи дослідження:** високоефективна рідинна хроматографія з ультрафіолетовим детектуванням.

**Новизна та значення одержаних результатів:** розроблено умови екстрагування сквалену та олії з насіння амаранту різних сортів, а також умови хроматографування, для одночасного визначення згаданих компонентів. Показано, що для повної екстракції компонентів, необхідно застосовувати не менше трьох послідовних вилучень за допомогою 2-пропанолу. Розроблено методику та підхід до визначення вмісту олії методом рідинної хроматографії. Проведено кількісне визначення сквалену і амарантової олії в насінні.

**Апробація результатів дослідження:** результати наукової роботи було представлено тезами на практичних конференціях: «Весняна студентська наукова сесія 2024» та «Міжнародна конференція студентів, аспірантів та молодих вчених "Сучасні проблеми хімії"».

**Структура роботи:** дана робота включає 54 сторінок, 5 розділів, 3 додатки та 22 використаних джерел літератури.

## ВИСНОВКИ

1. Розроблено умови екстракції сквалену і амарантової олії з насіння амаранту. При використанні ізопропанолу в якості екстрагенту для повної екстракції компонентів необхідно застосовувати не менше 3 екстракцій.

2. Розроблено умови хроматографування для експресного, одночасного визначення сквалену і амарантової олії. Розроблені умови хроматографування і екстракції є екобезпечними.

3. Проведено валідацію розроблених методик для визначення сквалену і олії амаранту, яка підтвердила прецизійність, специфічність, лінійність, правильність відповідно до вимог Державної Фармакопеї України.

4. Апробація розробленої методики для визначення сквалену в насінні амаранту проведена на 5 різних сортах насіння амаранту дозволила успішно визначити кількість сквалену в досліджених зразках з високою точністю та достовірністю.

5. Результати проведених досліджень мають важливе значення для вдосконалення методів визначення сквалену з насіння амаранту, а також це дасть можливість використання цього підходу для оцінки доцільності вирощування різних сортів амаранту.

## SUMMARY

**Ninchuk Oleksandr**

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHODOLOGY FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF SQUALENE AND AMARANTH OIL CONTENT IN AMARANTH SEEDS OF DIFFERENT VARIETIES

**Department of Drug Chemistry and Drug Toxicology**

**Scientific supervisor:** Candidate of Chemical Sciences Syrotchuk O. A., Candidate of Chemical Sciences, Associate Professor Glushachenko O. O.

**Keywords:** high-performance liquid chromatography method, extraction, squalene, amaranth seeds, amaranth oil.

**Introduction.** In the world of modern medicine and cosmetology, there is a constant demand for new and effective products aimed at improving the quality of life and health. One of these components is squalene, a lipophilic substance that has gained recognition for its unique properties, including antioxidant properties. Squalene plays a key role in moisturizing, protecting and softening the skin, making it an essential ingredient in cosmetics and pharmaceuticals.

**Materials and methods.** The work was performed on a Shimadzu LC-30 A high-performance chromatograph (Japan). The chromatographic column was Symmetry C18 75×4.6 mm with a particle size of 3.5. For the preparation of mobile phases, 96% ethyl alcohol, produced by the State Enterprise “UKRSPYRT”, was used; chromatography water obtained using a Simplicity UV unit, Millipore, USA, to obtain a mobile phase with an ethyl alcohol content of 91%. For the preparation of standard samples, the following were used: squalene (98%, manufactured by Sigma Aldrich, USA) and amaranth oil (manufactured by Organic Oil and Giva Crapla). For the study, 5 varieties of amaranth seeds were taken: “Kharkiv-1”, “Polsky”, “Ultra”, “Aztec” and “Lera”, which were grown in 2022 in Cherkasy and provided by farmer Myrhorod N.V.

Seeds of amaranth varieties Kharkivskiy-1, Polskiy, Ultra, Aztec and Lera were ground on a Retch GM 200 device for 45 seconds at a speed of 9000 rpm. Seed extraction of the first two varieties was performed for 3 independent samples in 5 stages, and for the rest - for 2 independent samples in 5 stages. The extraction was carried out with isopropanol using an ultrasonic bath, followed by separation of the extract from the grain by centrifugation at 6000 rpm.

**Results.** Chromatographic conditions were developed for the simultaneous determination of squalene and oil in different amaranth varieties. The results were checked on the basis of validation parameters: specificity, linearity, precision and accuracy. The linearity was proven in the range of 0.02-0.31 mg/ml with a correlation coefficient of 0.9999 and a practical insignificance of the free term of 0.9%.

The extraction of squalene and oil from the crushed seeds was carried out repeatedly to ensure the accuracy of the results. The results of the determination showed that after the first stage of extraction of the Kharkivskiy-1 variety, the squalene content was 0.340%, the oil content was 2.767%; Polsky - 0.377% and 3.567%, Ultra - 0.278% and 2.716%, Aztec - 0.166% and 2.114%, and Lera - 0.388% and 4.116%. In the second extract: “Kharkivskiy-1 - 0.045% and 0.273%, Polsky - 0.064% and 0.458%, Ultra - 0.046% and 0.422%, Aztec - 0.038% and 0.397%, Lera - 0.069% and 0.573%, respectively. In the third stage, Kharkivskiy-1 0.010% and 0.069%, Polsky 0.016% and 0.099%, Ultra 0.010% and 0.096%, Aztec 0.014% and 0.114%, Lera 0.014% and 0.147%. Further stages of extraction gave lesser results, and thus it can be said that exhaustive extraction



was achieved. The total content of squalene in the seeds of “Kharkivsky-1” is  $0.41 \pm 0.013\%$ , oil -  $3.24 \pm 0.212\%$ ; “Polsky” -  $0.48 \pm 0.012\%$  and  $4.48 \pm 0.002\%$ , “Ultra” -  $0.35 \pm 0.003\%$  and  $3.54 \pm 0.010\%$ , “Aztec” -  $0.25 \pm 0.023\%$  and  $3.02 \pm 0.304\%$ , “Lera” -  $0.49 \pm 0.044\%$  and  $5.20 \pm 0.434\%$ . The degree of extraction of squalene for the first seed is 84.2%, oil - 85.3% for the second 77.3% and 79.7%, the third - 80.1% and 76.8%, the fourth - 69.8% and 74.3%, the fifth - 75.6% and 75.7% during the first extraction. Based on these data, for the exhaustive extraction of squalene and oil from amaranth seeds, it is necessary to use at least triple extraction from one sample of crushed seeds.

**Conclusions.** The conditions for environmentally safe extraction of squalene and oil from amaranth seeds of different varieties, as well as chromatographic conditions for the simultaneous determination of these components, have been developed. It is shown that for complete extraction of the components, it is necessary to use at least three consecutive extractions with 2-propanol. A methodology and approach to the determination of oil content by liquid chromatography have been developed. The quantitative determination of squalene and amaranth oil in seeds was carried out. The results of the study are important for improving the methods of determining squalene from amaranth seeds, and will also make it possible to use this approach to assess the feasibility of growing different varieties of amaranth.