

**НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ О.О БОГОМОЛЬЦЯ
ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра хімії ліків та лікарської токсикології**

ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему «Розробка методики визначення шизандрину в дієтичних
добавках »

Виконала : здобувачка вищої освіти 5 курсу, групи
9801, Федорович С.Є.
напряму підготовки (спеціальності)
226 « Фармація, промислова фармація »
для другого (магістерського) рівня вищої освіти
Керівник: к.х.н. Сиротчук О.А, к.х.н. Глушаченко
О.О.
Рецензент: д.фарм.н., професор Карпюк У.В.

Київ 2024

ЗМІСТ

ВСТУП	3
Розділ 1. Шизандрин, методи кількісного визначення	6
1.1 Шизандрин та його застосування	6
1.2 Фізико-хімічні властивості шизандрину	8
1.3 Обмін речовин та механізм дії шизандрину	9
Розділ 2. Практична частина	18
2.1 Матеріали, методи та об'єкти дослідження	18
2.2 Обладнання та умови хроматографування	19
2.3 Підготовка розчинів	20
<u>Розділ 3. Розробка та валідація методики визначення шизандрину</u>	24
<u>3.1 Визначення оптимальних параметрів хроматографічної системи: рухома фаза, температура колонки, довжина хвилі детектування</u>	24
3.2 Приданість хроматографічної системи	26
3.3 Селективність	27
3.4 Вибір розчинника для екстракції	33
3.5 Лінійність	35
3.6 Збіжність	36
3.8 Перевірка методики для використання з іншими об'єктами аналізу.	37
3.9 Порівняння методики з методикою Фармакопеї Європи	40
Висновки:	42
Список літературних джерел:	43
Додатки	48

ВСТУП

Актуальність. Шизандрин, який міститься у лимоннику китайському, відноситься до біологічно активних речовин групи лігнанів. Ця сполука відома своєю гепатопротекторною дією, впливом рівень розумової та фізичної працездатності, а також зданістю захищати від процесів старіння та розвитку хронічних захворювань. Шизандрин також має потенційні властивості зменшення запалення та зниження ризику серцево-сідинних захворювань. Це особливо важливо в умовах сучасного середовища, яке відома своєю високою стресовістю та наявністю різних факторів, що сприяють появі різних захворювань. Важливим є дослідження якості дієтичних добавок, які містять шизандрин, оскільки це може підвищити їх ефективність та безпеку. Розробка екологічно безпечних методик також є актуальною проблемою у фармацевтичній хімії.

Мета та завдання дослідження. Мета роботи -провести дослідження хроматографічних характеристик шизандрину в режимі обернено-фазової хроматографії з використанням етаноловмісних рухомих фаз. Розробити і валідувати екобезпечну методику кількісного визначення шизандрину в дієтичних добавках.

Для досягнення мети поставлено такі *завдання*:

1. Провести огляд літературних джерел з метою вивчення існуючих методик кількісного визначення шизандрину.
2. Провести дослідження хроматографічних характеристик шизандрину при використанні нерухомих фаз різної хімічної природи (октадецилсилільної, фенілсилільної, пентафлуорофенільної) і рухомих фаз з варіюванням вмісту етанолу і води в режимі обернено-фазової рідинної хроматографії.
3. Розробити екобезпечну методику кількісного визначення шизандрину і провести валідацію розробленої методики

4. Провести апробацію методики на дієтичних добавках доступних на ринку України і плодах лимонника китайського .

Методи дослідження: рідинна хроматографія з спектрофотометричним детектором

Новизна та значення одержаних результатів: встановлено характеристики утримування шизандрину в режимі обернено-фазової рідинної хроматографії на нерухомих фазах різної функціональності, зокрема з прищепленими до силікагелю октадецильними, фенільними або пентафлуофенільними групами. Встановлено Розроблено екобезпечну методику кількісного визначення шизандрину в дієтичних добавках і плодах лимонника китайського.

Апробація результатів дослідження. Результати дослідження були представлені на науково-практичній конференції з міжнародною участю «ФАРМАЦЕВТИЧНА ОСВІТА, НАУКА ТА ПРАКТИКА: СТАН, ПРОБЛЕМИ, ПЕРСПЕКТИВИ РОЗКВІТУ», яка проходила 19-20 грудня 2023 року в Києві та була присвячена 25-річчю фармацевтичного факультету Національного медичного університету імені О. О. Богомольця.

Також результати дослідження були представлені на студентській науковій конференції «SPRING STUDENT'S SCIENTIFIC SESSION 2024», секція «Хімія ліків та лікарська токсикологія», яка проходила з 22 по 26 квітня 2024 року в Києві, організований студентським науковим товариством імені О.А. Киселя та Товариством молодих вчених і спеціалістів Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.

Крім того, представлена на XXV Міжнародній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених "Сучасні проблеми хімії", секція «Аналітична хімія» , яка відбулася 15-17 травня 2024 р. у місті Києві, хімічний факультет Київського національного університету імені Тараса Шевченка (додаток Б) .

Публікації. Отримані наукові результати відображено в двох публікаціях (додаток Б).

Структура роботи: Робота складається з 58 сторінки, трьох розділів (огляд літератури, практичної частини та розробка та валідація методики), кількість використаних джерел – 35, додатків та анотації англійською мовою.

Висновки:

1. Проведено літературних огляд властивостей і методик визначення шизандрину, на основі огляду встановлено, що найбільш точним для визначення шизандрину є метод високоефективної рідинної хроматографії.
2. Встановлено характеристики утримування шизандрину залежно від вмісту етанолу в рухомій фазі. Показано, що шизандрин краще утримується на нерухомих фазах здатних до π - π взаємодії. Так на фенільній колонці за однакових умов шизандринг утримується втричі довше ніж на октадецилсилільній. Оптимальний вміст етанолу в рухомій фазі – 55 об.%.
3. Розроблено і валідовано методику кількісного визначення шизандрину за такими характеристиками: специфічність, збіжність, правильність, лінійність, межа кількісного визначення. Досягнуто встановлених критерії згідно ДФУ.
4. Методику апробовано для застосування як для дієтичних добавок так і для визначення шизандрину в плодах лимонника китайського. Методика дає такі ж результати як і методика фармакопеї і може бути її екобезпечною альтернативою.

SUMMARY

S.Ye. Fedorovych

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN ECO-FRIENDLY METHOD FOR DETERMINING SCHIZANDRIN IN DIETARY SUPPLEMENTS

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.

Introduction. Schizandrin, or 5-hydroxy-2-phenylchroman, is a biologically active compound found in the fruits of *Schizandra chinensis*, a perennial vine from the Schizandraceae family. Schizandrin exhibits a wide range of pharmacological properties, including antioxidant, anti-inflammatory, adaptogenic, hepatoprotective, and immunomodulatory activities. With the growing popularity of dietary supplements containing *Schizandra*, it is important to control the quality of such products, and schisandrin serves as a marker of the presence of *Schizandra chinensis* in dietary supplements. Additionally, in light of trends in analytical chemistry towards reducing environmental harm, the development of eco-friendly methods for the quantitative determination of schizandrin is relevant, which is the focus of this work.

Materials and Methods: The work was performed on a Shimadzu LC-30 liquid chromatograph with a spectrophotometric detector. Chromatographic columns used in the study: Discovery HS C18 250×4.6, 5 μm, Discovery PFP 250×4.6, 5 μm, Ascentis Phenyl 250×4.6, 5 μm. Standard substance of schisandrin, European Pharmacopeia standard. Ethanol 96% "UKRSPYRT", water for HPLC obtained on the Simplicity UV system, Millipore, USA.

Results: At the beginning of the method development, studies were conducted to determine the optimal conditions for the determination of schizandrin, examining its distribution on different stationary phases depending on the chemical nature of these phases and the composition of the mobile phase. Water-ethanol mixtures were used to establish the optimal chromatographic conditions.

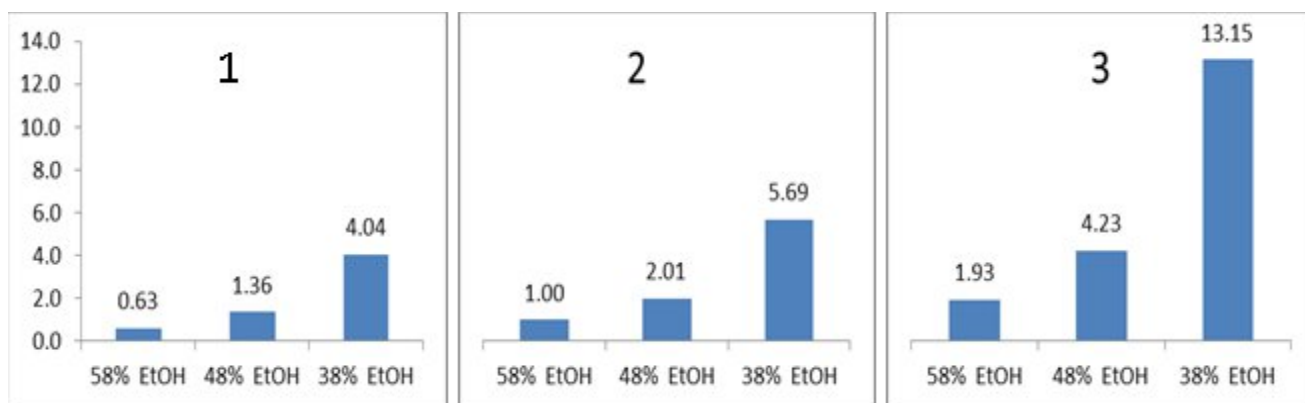


Fig. 1. Dependence of retention factor k on ethanol content in the mobile phase using columns: 1 – Discovery C18, 2 – Discovery F5, 3 – Ascentis Phenyl

It was shown that the most effective retention of schizandrin is observed on stationary phases with specific interaction centers, particularly phenylsilane and pentafluorophenylsilane groups. For method development, the Ascentis Phenyl column was chosen, with a water-to-ethanol (96%) ratio of 45:55. Before validation, the suitability of the developed system was checked. The suitability test results were as follows: relative standard deviation (RSD,%) of peak areas from 6 consecutive injections of the standard sample – 0.38% (not more than 1.0%), schizandrin peak efficiency – 8422 theoretical plates (not less than 3000 theoretical plates). The method was subjected to validation parameters such as specificity, linearity, precision, and accuracy. Linearity was proven in the range of 0.02-0.35 mg/ml with a correlation coefficient of 0.9999 and a practically insignificant intercept of 0.1%. Accuracy was 0.8%, and precision, expressed as the uncertainty of analysis results, was 2.8%.

To establish extraction conditions, crushed fruits of *Schisandra chinensis* were used. It was found that ethanol extraction (96%) gave similar results to methanol extraction. Therefore, to ensure eco-friendliness, ethanol was chosen as the solvent. The extraction degree per operation was 95%, indicating that two operations are sufficient for complete extraction. To check the schizandrin content in dietary supplements, three products were selected – two in capsule form and one in alcohol extract form. Extraction was performed three times to ensure result accuracy. No schizandrin was found in the tested dietary supplement samples, with a detection limit of 0.006% and a quantitative determination limit of 0.02%.

Conclusion. Based on the studies, it was found that the best retention of schisandrin is observed on stationary phases with specific interaction centers such as phenylsilane and pentafluorophenylsilane. A method for the quantitative determination of schisandrin was developed, validated, and used to control dietary supplements containing Schizandra extract. The control results showed that none of the analyzed dietary supplements contained schisandrin, which is a marker of *Schizandra chinensis*.