**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 «Модифікація методики фармацевтичного аналізу дисахариду лактитолу»

Виконав: здобувач вищої освіти 3 курсу, групи Б1А
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)
Стрічка Ірина Сергіївна
(прізвище та ініціали)
Керівник: к.б.н., ас. Мелешко Р.А.
(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Рецензент: к.фарм.н., доцент Глущенко О.М.
(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

**Київ – 2023-2024 р.р.**

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ……..3
ВСТУП……..5
ОСНОВНА ЧАСТИНА……9

РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОЇ БУДОВИ ТА ВЛАСТИВОСТІ ДИСАХАРИДІВ……..9
1.1. Особливості хімічної будови дисахаридів…….……...9
1.2. Біологічна активність дисахаридів…….……....15

РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ ЛАКТИТОЛУ..……...……..18
2.1.Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості лактитолу..……...18

РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА……29

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

МА – місцеві анестетики

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

Т. кип. – температура кипіння

Т. пл.  – температура плавлення

УФ спектр – ультрафіолетовий  спектр поглинання

ЯМР $^{1}$H – спектр ядерно-магнітного резонансу протонний

Alk – алкіл-радикал

Ar – арил-радикал

$^{o}$C – градуси Цельсія

EPS –  позаклітинні полісахариди

Hal – галоген

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

# ВСТУП

*Актуальність теми.* Лактитол (за систематичною назвою 4-O-α-D-галактопіранозил-D-глюцитол) — це вуглеводневий спирт, який отримують із лактози (молочного цукру). За хімічною класифікацією лактитол відноситься до дисахаридів.

Цей дисахарид діє тільки у товстому кишечнику. Потрапляє лактитол до товстого кишечнику у практично незміненому виді. Там він підлягає метаболізмута вибірково стимулює рост корисної мікрофлори (біфідо- та лактобактерій).Лактитол метаболізується з утворенням карбонових кислот – в першу чергу, ацетатної та бутанової кислот. Хоча, ацетатна кислота є метаболітом, який утворюється під впливом більшісті корисних бактерій товстої кишки.

Ацетати потрапляютьу печінку, виконують роль енергетичного субстрату для м’язів та внутрішніх органів: серце, головний мозок, нирки. Бутирати продукують еубактерії, клостридії, пептококи тощо. Бутирати виконують роль енергетичного субстрату для клітин кишечнику.

Лактитол використовують у медичній та фармацевтичній практиках. Він використовується у якості діючої речовини або додатковим компонентом у пребіотичних комплексах [1-3].

Згідно із документами Об’єднаного експертного комітету з харчових добавок ВООЗ (JECFA) лактитол є відносно безпечною речовиною. FDA підтвердило використання лактитолу у складі харчових продуктів (GRAS). Лактитол дозволено використовувати в харчових продуктах у США [4-10].

Лактитол використовують як підсолоджувач та текстуризатор. Його використовують у продуктах без цукру (морозиво, шоколад, цукерки, хлібобулочні вироби, риба морожена, макаронні вироби, жувальні гумки,

дитячі суміші, медичні таблетки). В Європейському Союзі лактитол позначено Е Е966. Лактитол дозволено для використання у Канаді, Австралії, Японії.

Проводилися дослідження щодо впливу прийому йогуртів у дорослих людей з деякими проблемами у здоров'ї (запор, діарея). Використовували три типи йогуртів: тип А - йогурт, виготовлений з рослинного походження; тип В - йогурт, виготовлений LAB рослинного походження; тип С - йогурт, виготовлений LAB тваринного походження (переважно Lactococcus lactis), як контроль.

Піддослідні споживали 100 г йогурту щодня протягом 6 тижнів. Дані збирали під час клінічних візитів з інтервалом у 2 тижні та за допомогою щоденників, які використовуються для запису дефекації та стану здоров'я.При вживанні йогуртів типу А та типу В спостерігалося різке та постійне збільшення частоти дефекації у пацієнтів із запорами.

Йогурти типу В та С призвели до зниження загального холестерину та холестерину ліпопротеїнів. Були покращені (зниження на 12–25%) сироваткові концентрації функціональних параметрів печінки за допомогою йогурту типу В [11-17].

Токсичність та канцерогенність лактитолу, отриманого з лактози, досліджували на щурах Wistar Cpb:WU. Щурів кожної статі годували дієтами з 0, 5, 10 або 20% лактитолу, або 25% лактози.

У дослідженні токсичності/канцерогенності протягом усього життя з 50 щурів вживали дієти з 0, 2, 5 або 10% лактитолу, або 20% лактози. Субхронічне та хронічне вживання лактитолу та лактози добре переносилося. Впливу на рівень смертності не спостерігалося. Приріст маси тіла зменшувався.

Спостерігалося збільшення сліпої кишки при застосуванні лактиту та лактози. Клініко-хімічні дослідження виявили підвищені рівні лужної фосфатази (ЛФ) у плазмі крові щурів.

Таким чином, лактитол не є безпечною речовиною у певних дозах і потребує обережного застосування у медичній практиці. Контроль якості цієї речовини потребує ретельно проведених процедур інструментальними методами, оскільки висока якість лікарського засобу, компонентом якого є лактитол, є важливою для захисту здоров'я та життя пацієнтів.

Лактитол є органічною сполукою, до хімічної структури якої входять фармакофорні угрупування та функціональні групи – гетероциклічні угрупування, гідрокси групи, етерний зв'язок.

Субстанцію лактитолу аналізують як хімічними, так й інструментальними методами. Особливості хімічної будови молекули лактитолу передбачають її активні хімічні властивості за рахунок вільних гідрокси груп та утворення внутрішньомолекулярних зв'язків.

Побічні продукти можуть утворюватися під час синтезу субстанції лактитолу, під час гідролізу або деградації молекул. що впливає на її якість. Утворюються супровідні речовини та неприпустимі домішки, які потребують виявлення.

Важливим у фармацевтичному аналізі субстанції лактитолу є використання сучасних інструментальних методів, порівняно з тими, які рекомендовано Фармакопеями.

Актуальним завданням є модифікація умов хроматографування при дослідженні субстанції лактитолу методом ВЕРХ та методик пробопідготовки зразків, що дозволить зробити коректні висновки щодо її якості.

*Мета і завдання дослідження. Метою експериментального дослідження* є розробка умов хроматографування, методик пробопідготовки та експериментальних процедур зразків субстанції лактитолу.

*Завдання експериментального дослідження:*

- Модифікувати та розробити умови хроматографування методом ВЕРХ субстанції лактитолу, які забезпечать захист від її деградації;
- розробити методики (ВЕРХ) хроматографування субстанції лактитолу;
- провести експериментальні дослідження зразків субстанції лактитолу та інтерпретувати результати досліджень.

*Методи дослідження.* хроматограф Agilent 1200 з рефрактометричним детектором, колонка – SUPELCOGEL Ca, 300x7,80x9; комп'ютерний аналіз за програмою OpenLab CDS.

*Новизна та значення одержаних результатів.* Новизна експериментального дослідження полягає у розробці умов та методик досліджень методом ВЕРХ субстанції лактитолу з метою захисту її від деградації.

*Апробація результатів дослідження*. Результат досліджень апробовано на конференції «Фармацевтична освіта, наука та практика: стан, проблеми, перспективи розвитку», присвячена 25-річчю фармацевтичного факультету Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, 19-20 грудня 2023 р., стор. 398.

*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 – 22.

# ОСНОВНА ЧАСТИНА

## РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОЇ БУДОВИ ТА ВЛАСТИВОСТІ ДИСАХАРИДІВ

### 1.1.Особливості хімічної будови дисахаридів

Лактитол має хімічну номенклатурну назву ІЮПАК 4-O-α-D-галактопіранозил-D-глюцитол. Відноситься до вуглеводневих спиртів, а за хімічною будовою є дисахаридом. Лактитол отримують із лактози (молочного цукру) (рис. 1.1.1).

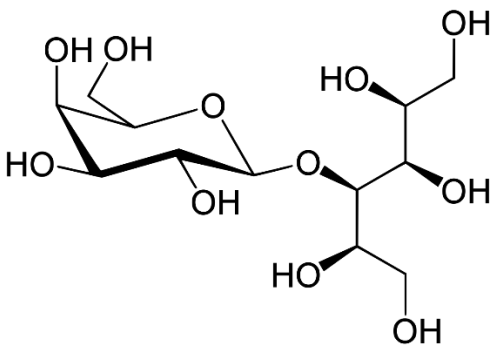



Рисунок 1.1.1. Хімічна формула лактитолу.

Молекула лактитолу складається із двох моносахаридів – галактози та сорбітолу, які зв’язані між собою в положеннях 1-3 кисневим містком (рис. 1.1.2).

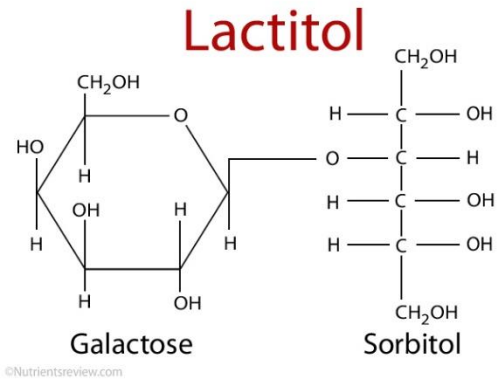



Рисунок 1.1.2. Структура лактитолу.

Лактитолу притаманні наступні фізичні властивості:

Форми лактитолу:  сухий безводний або моногідрат, який містить воду; виглядають як білі кристалічні порошки.

На 40% солодший від сахарози, не має охолоджуючого ефекту.

Негігроскопічний – не поглинає вологу з повітря.

Розчинність у воді при 77 °F (25 °C) = 57 г/100 г.

Температура плавлення = 295°F (146°C).

Термостійкість >320°F (>160°C).

Не піддається реакції потемніння Майяра.

Доля перорально прийнятого лактитолу, який не всмоктується, досліджена у здорових людей. Дотримувалися трьох шляхів утилізації цукру, міченого 14C.

Лактитол отримували 20 г щоденно протягом 14 днів, а на сьомий день виділяли 14C з диханням, сечею та фекаліями. Пік виведення 14CO2 припадав на шість годин.

Загальний 14CO2 становив 62,9 (5,0)% введеного ізотопу. 6,5 (3,6)% та 2,0 (0,3)% мітки було виділено з фекаліями та сечею.

Дані свідчать про те, що лактитол інтенсивно метаболізується в товстій кишці людини. Значна частка бактеріальних метаболітів доступна для всмоктування в товстій кишці.

Розрахунок показав, що суб'єкти використали 54,5% теоретичного енергетичного вмісту цієї сполуки.

Цей цукор та інші «неабсорбовані» цукри (лактулоза, сорбіт, маніт) можуть проходити досліджену схему метаболізму в товстій кишці. Їх можна розглядати як сполуки зі зниженою калорійністю (рис. 1.1.3).

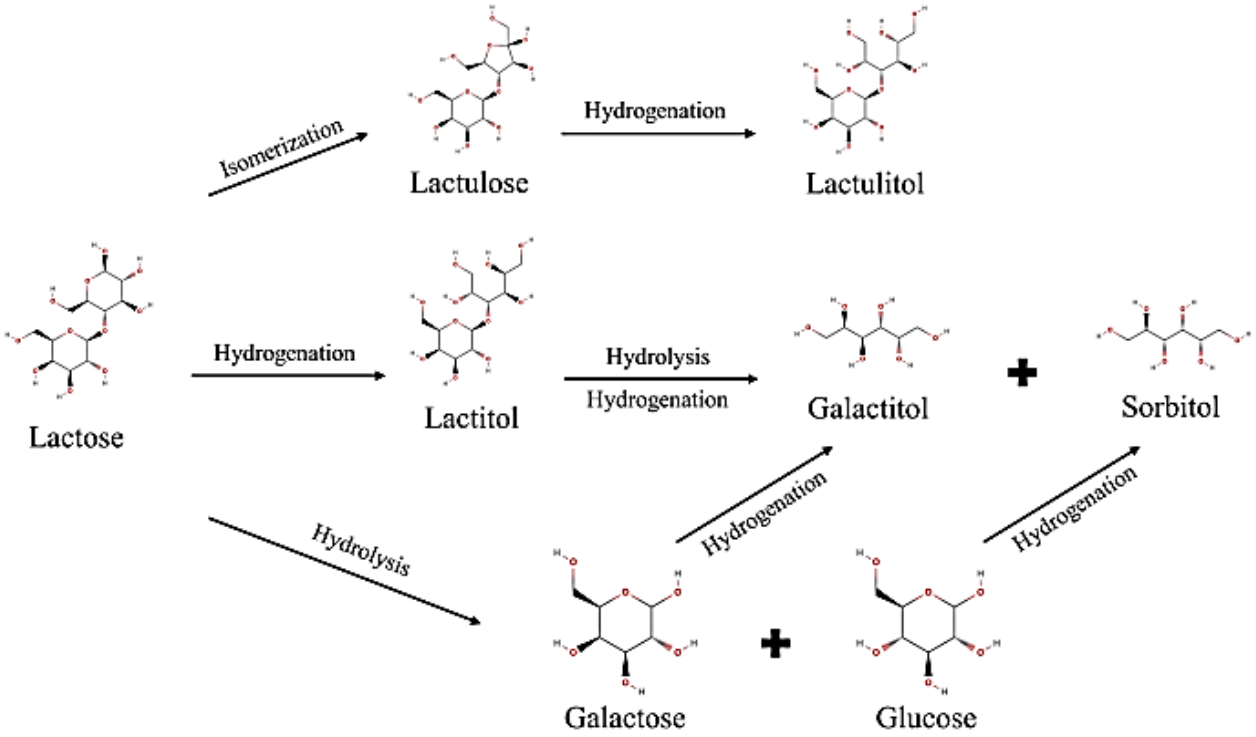



Рисунок 1.1.3. Схема метаболізму лактитолу.

Лактоза це звичайний природний дисахарид. Він міститься в сироватці, побічному продукті виробництва сиру, в казеїні.

Багато лактози щорічно викидається як відходи, що призводить до втрати ресурсів, спричиняє забруднення навколишнього середовища.

Глибока переробка лактози як вихідної сировини є важливою темою досліджень.

Цукрові спирти, отримані з лактози – лактит, сорбіт, галактит, продемонстрували великий потенціал застосування у виробництві харчових продуктів, у фармацевтичній, косметичній сферах.

Лактитол не зустрічається в природі, його промислово виробляють шляхом каталітичного гідрування лактози.

Каталітичне гідрування відноситься до хімічних реакцій, у яких Гідроген додається до реакційноздатної функціональної групи.

В даному разі Гідроген додається до карбонільної групи молекули

глюкози.

Дослідження показали існування двох форм безводного лактиту з різними температурами плавлення. Це – моногідрат і дигідрат. Лактит у твердому стані існує в різних кристалічних формах.

ІЧ-спектри продемонстрували існування трьох гідратних форм (моно-, ди- та тригідрат), дві ангідратні (А та В) та одну аморфну форму.

Лактитол використовувався як кріопротектант. Лактитол є поліолом зі здатністю запобігати фізико-хімічному деструкції білкових препаратів при заморожуванні або сушінні.

Дослідження ефективності лактитолу як кріопротектора для міофібрилярних білків м'язів риби показало, що додавання лактитолу зберігає структурну стабільність міозину.

Цукрові спирти частіше використовуються в харчових продуктах і фармацевтичній практиці. Вони мають відповідні функціональні властивості та користь для здоров'я.

Перші спроби синтезу лактиту були зроблені 100 років тому. Синтез лактитолу перетворився на високоефективний процес із прогнозованим виробництвом.

Синтез полягає у включенні іона Гідрогену в карбонільну групу лактози. Він є багатоступеневим, відомим як кінетика Ленгмюра-Хіншельвуда-Хогена-Ватсона (LHHW).

Вважається, що гідрування відбувається шляхом адсорбції, за участю реакційної поверхні та десорбції реагентів. Вважається, що поверхнева реакція є переважаючим етапом.

Реакція між двома адсорбованими речовинами каталізується перехідним металом на інертному матеріалі. Досліджено кілька каталітичних систем (метал і носій) – їх фізичних і хімічних властивостей.

Важливою особливістю каталітичного гідрування є багатофазний характер реакції. Рідина, тверда речовина та газ контактують між собою.

Після того, як реакція завершилася, лактитол відокремлюють від суспензії за допомогою центрифугування та кристалізації.

У кристалічній формі лактит існує в чотирьох кристалічних формах. Кожен тип кристалів характеризується своєю температурою плавлення, розчинністю.

Найбільш вивченою є структура лактиту у моногідратній форм.

Лактитол є відомим як поживний підсолоджувач. FDA вважає, що калорійність лактиту становить 2,4 ккал/г.

Молекулярна структура лактиту забезпечує стабільність у широкому діапазоні pH та температури. Лактит розглядається як агент для синтезу біополімерів, гідрогелів, поверхнево-активних речовин.

На сьогоднішній день лактит перетворився на багатоцільовий інгредієнт від низькокалорійної солодощі до матеріалу для покриття в жувальних гумках (рис. 1.1.4).

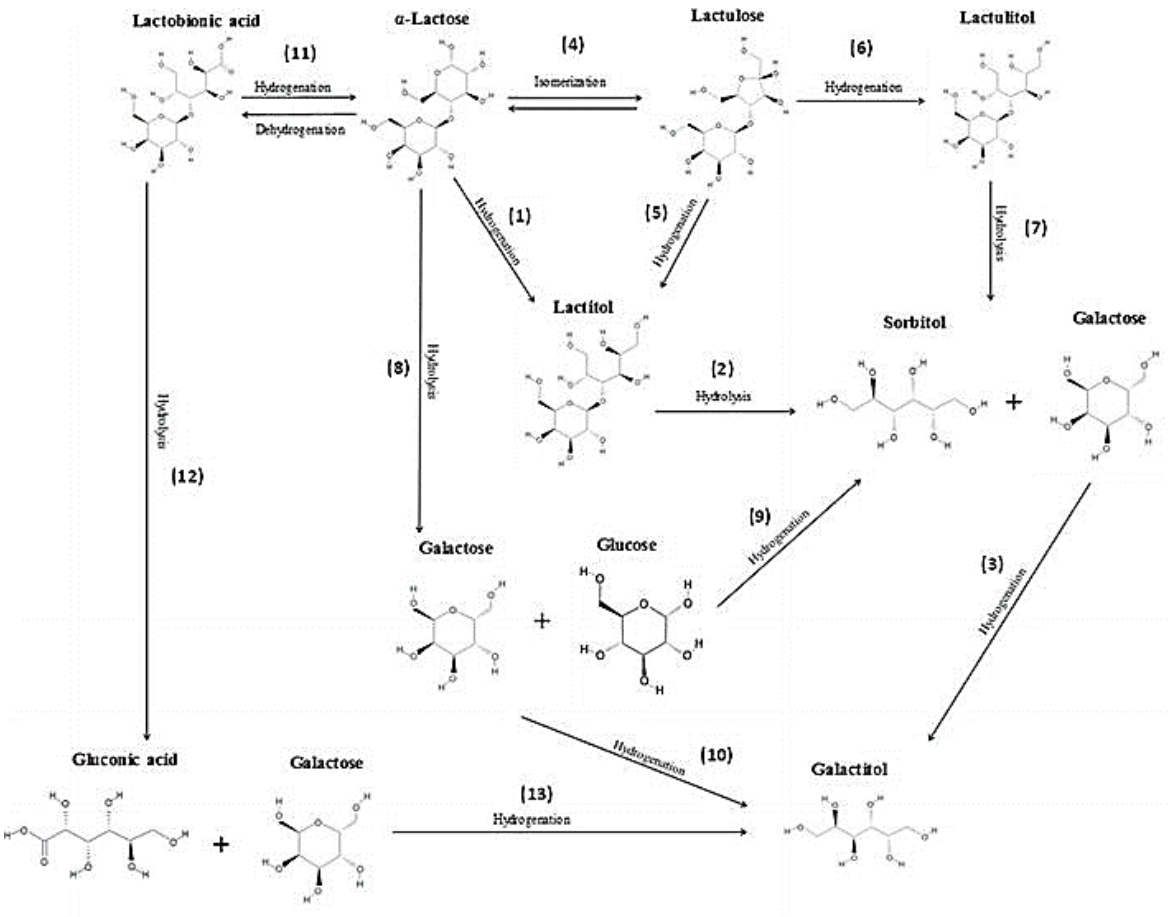


Рисунок 1.1.4. Продукти взаємодії лактитолу.

Проведено дослідження лактитолу методом УФ-спектроскопії. Метод заснований на тому, що соляна кислота гідролізує лактулозу у фруктозу та глюкозу, відбувається зневоднення, потім реакція отриманого продукту з резорцином. Продукт реакції – оранжево-червона сполука.

Для кількісного визначення фруктози використовували резорцин. Утворюється фруктоза при гідролізі лактулози. Для зручності субстанцію розчиняли в соляній кислоті для виконання обох стадії (рис. 1.1.5, 1.1.6).

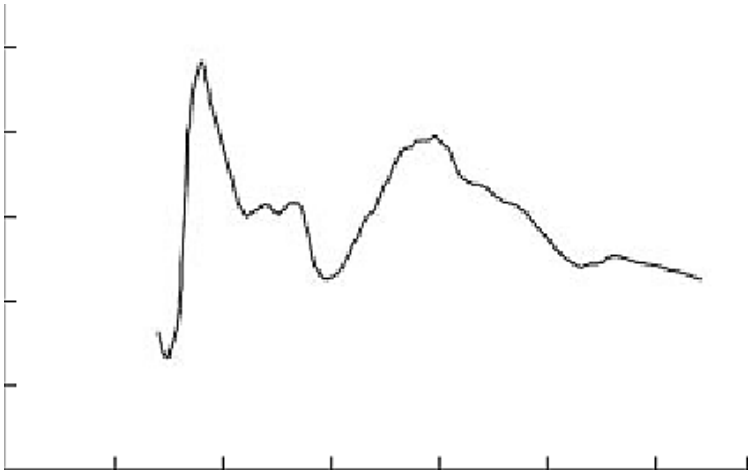


Рисунок 1.1.5. УФ-спектр поглинання резорцинового комплексу лактулози.

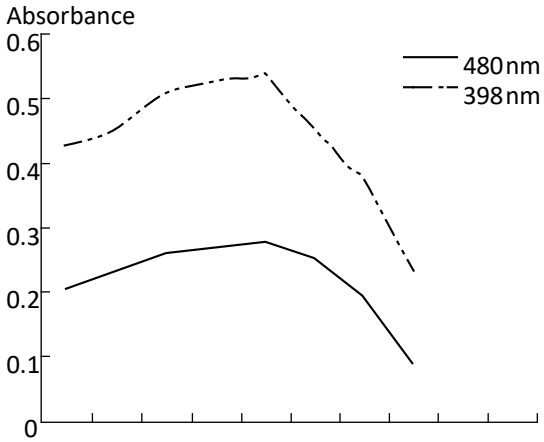



Рисунок 1.1.6. Оптимізація концентрації резорцинолу для визначення лактулози.

## 1.2.Біологічна активність дисахаридів

Пробіотичні молочнокислі бактерії – це група грампозитивних бактерій, які беруть участь у природних ферментах. Більшість із них можуть утворювати екзополісахариди (EPS), а також, поверхневі вуглеводні полімери з різними біологічними функціями.

EPS є потенційно додатковими ліками проти раку. EPS демонструє антипроліферативну дію на різноманітні пухлинні клітини печінки, кишечника, молочної залози.

Вони модулюють розвиток пухлин за допомогою різних механізмів. Сприяють апоптозу, індукції зупинки клітинного циклу. Виявляють антимутагенну, антиоксидантну, протизапальну дію.

Бактеріальне походження, форма, хімічна будова, чистота є важливими факторами, що впливають на протипухлинну дію EPS. Досліджується зв'язок структура-функція EPS. Для підтвердження протиракових ефектів необхідні дослідження *in vivo* та подальші клінічні випробування (рис. 1.2.1).

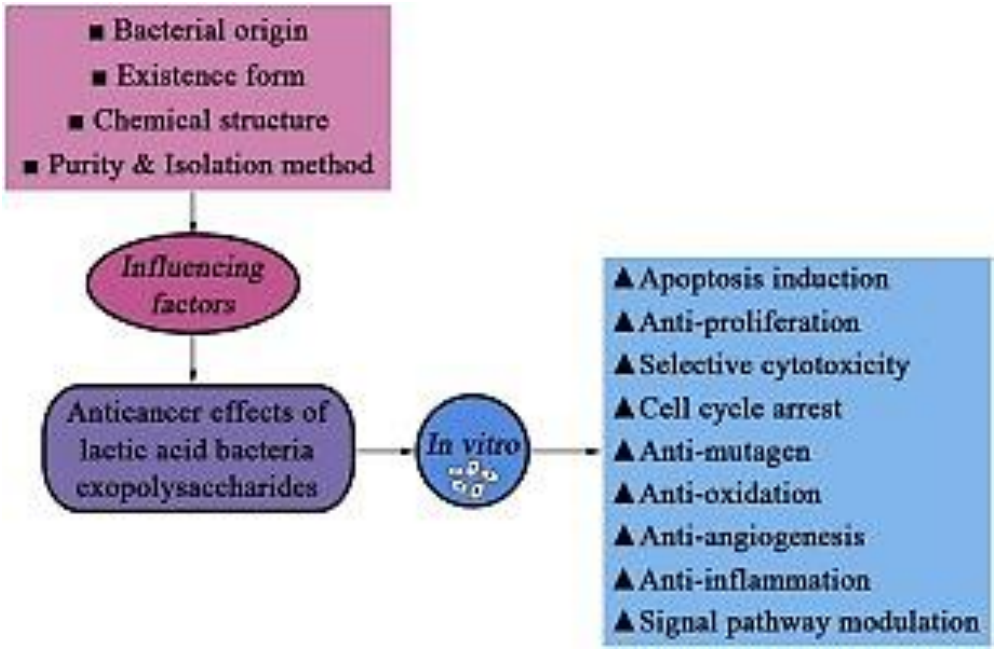



Рисунок 1.2.1. Дослідження протипухлинної дії дисахаридів.

Рак відноситься до реплікації аномальних клітин з потенціалом надмірного росту, проникнення в сусідні тканини та метастазування.

Дані Всесвітньої онкологічної обсерваторії: рак став другою основною причиною смерті в усьому світі, призвів до 9,6 мільйонів смертей у 2018 році. Сучасне лікування раку має багато небажаних побічних ефектів. Лікування його часто недоступне.

Хворі віддають перевагу додатковим та альтернативним лікарським засобам через їх доступність, меншим побічним ефектам.

Деякі харчові продукти та харчові компоненти можуть замінити недостатнє харчування, зменшити захворюваність на деякі види раку, зменшити побічні ефекти хіміотерапії. Вони вважаються важливими допоміжними засобами для лікування раку.

Одним із них є кисломолочний продукт, який захищає від колоректального раку.

Кисломолочний продукт — це різновид молочної їжі, ферментованої молочнокислими бактеріями (LAB), пробіотиками у кишечнику людини з різними корисними властивостями.

Інтраназально введений Lactobacillus casei BL23 у моделі алотрансплантата раку (спричиненого ВПЛ) продемонстрував захисні ефекти проти появи пухлини.

Дослідження *in vitro* показало, що живі клітини Lactobacillus reuteri (L.reuteri) BCRC14652 індукують пошкодження клітинної мембрани клітин карциноми товстої кишки людини HT29.

Інше дослідження показало, що суміш живих Lactobacillus acidophilus та L.casei може збільшувати здатність індукції апоптозу 5-фторурацилу. Дослідження підтвердили протипухлинний потенціал культивованих супернатантів і мертвих клітин. Важливо з'ясувати точний компонент всередині або поза LAB, який відіграє важливу роль у протипухлинній дії.

4-нітрохінолін N-оксид є хімічним промутагеном, який здатний індукувати пошкодження ДНК.

Позаклітинні полісахариди (EPS) виявилися ефективними у зниженні його цитотоксичності, включаючи внутрішньоклітинні екстракти, отримані з такої ж кількості L. Casei.

Проведене порівняння антипроліферативних ефектів EPS, позаклітинного білка та ліпідів однакової концентрації (0,1 мг або 10 мг/мл). Виявили, що активність EPS, виділеного з L. acidophilus, була найбільш помітною щодо різних клітин раку товстої кишки. Дві інші не мали антипроліферативного ефекту.

Подальші дослідження *in vivo* на тваринах підтвердили протиракову ефективність EPS шляхом внутрішньочеревної ін'єкції або внутрішньошлункового введення EPS мишам із пухлиною.

Результати показали, що EPS збільшив тривалість життя мишей з раком приблизно на 60–80%. Об'єм пухлини був зменшений за допомогою EPS від Lactobacillus plantarum та L. Acidophilus. Це було підтверджено шляхом вимірювання довжини, ширини та висоти пухлини, шляхом вимірювання маси тіла мишей.

Цікавими у дослідженнях протипухлинної дії були *Aerococcus, Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus і Weissella.*

Оскільки харчова промисловість віддає перевагу EPS як природним біозагусникам, це забезпечує доступний пероральний прийом EPS. Варто розглядати протиракові механізми LAB EPS для створення інноваційних шляхів щодо профілактики та лікування раку.

# РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ ЛАКТИТОЛУ

## 2.1.Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості лактитолу

Лактитол синтезують класичними та сучасними методами.

Так, реакцією гідрогенізації лактози отримують лактитол, який далі може після гідролізу або гідрогенізації утворювати сорбітол та галактітол (рис. 2.1.1)

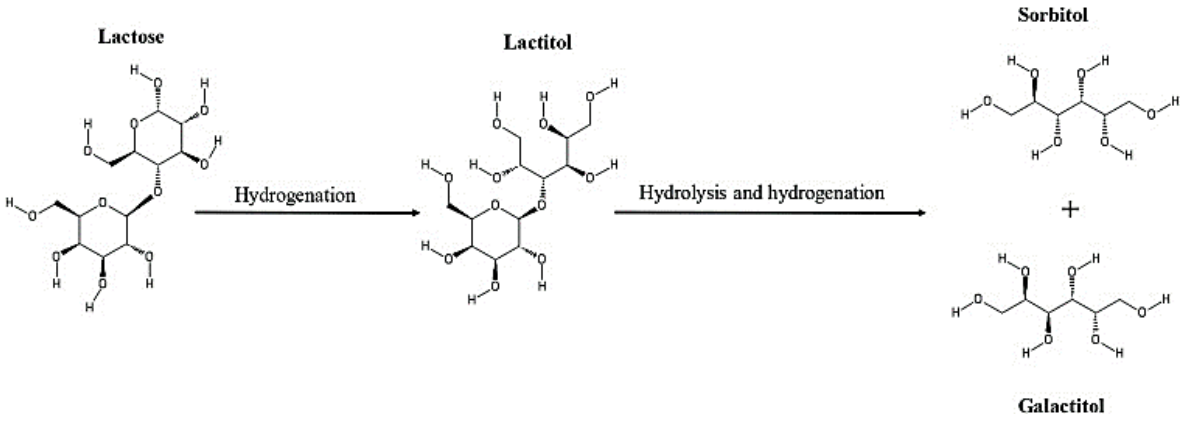



Рисунок 2.1.1. Схема синтезу лактитолу із лактози.

Лактитол — це 4-β-d-галактопіранозил-D-глюцитол. Він був схвалений FDA для лікування хронічного ідіопатичного запору.

Осмотичний проносний лактитол може втягувати воду в шлунково-кишковий тракт, щоб допомагати випорожненню.

Як показали клінічні дослідження лактитол може збільшити частоту повного спонтанного випорожнення кишечника на тиждень.

Описано одноступеневий синтез лактитуіз лактози (рис. 2.1.2).

Лактоза прореагувала з борогідридом калію з утворенням лактиту (вихід 60%).

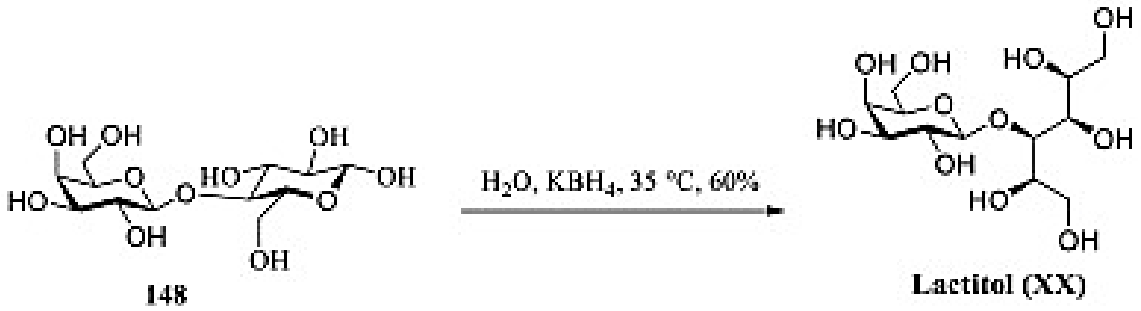



Рисунок 2.1.2. Синтез лактитолу із лактози.

Один із методів синтезу лактитолу це каталітичне гідрування лактози у присутності нікелевих каталізаторів (нікель Ренея) або рутенієвих каталізаторів. Можна застосовувати натріюборгідрид NaBH4 (рис. 2.1.3).

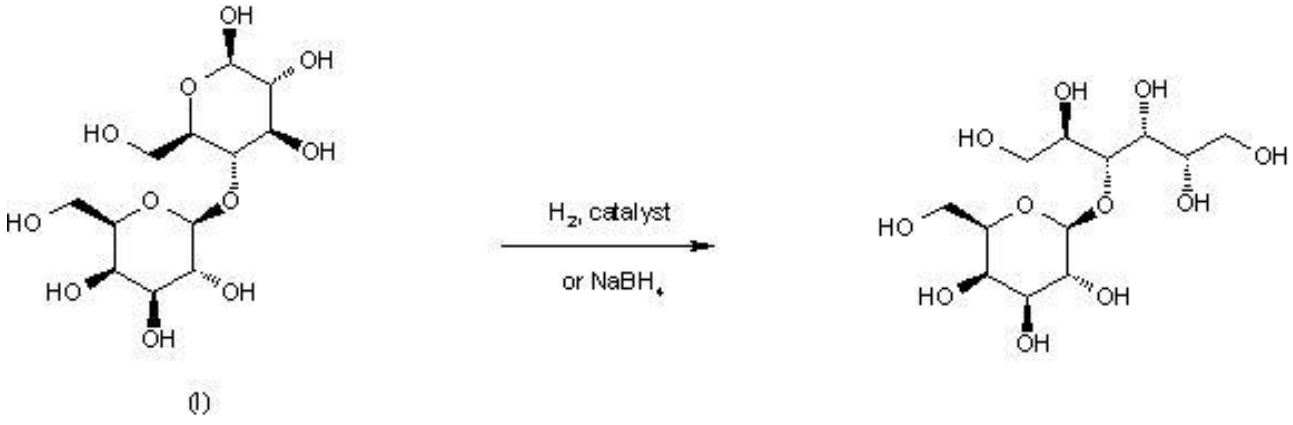



Рисунок 2.1.3. Синтез лактитолу.

На рисунку 2.1.4 можна побачити хімічні перетворення лактитолу з утворенням лактилози, лактилітолу, галактітолу, галактози, глюкози.

Це реакції гідролізу та гідрогенізації.

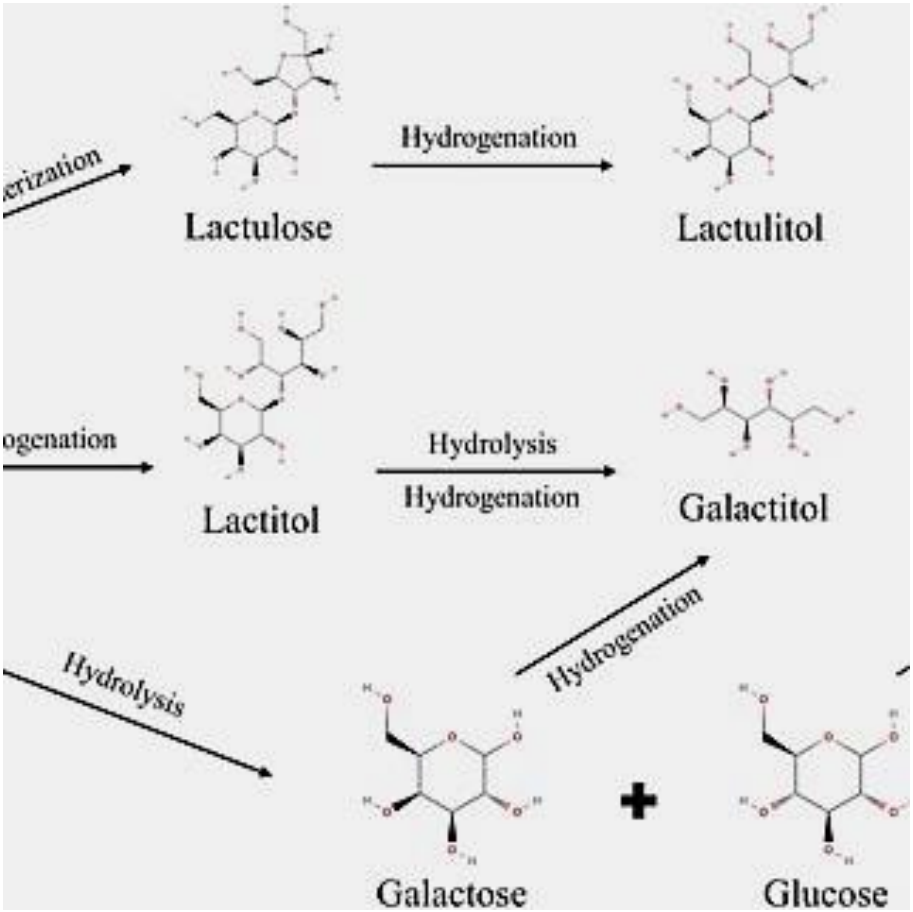



Рисунок 2.1.4. Хімічні перетворення лактитолу.

Гідрогенізація лактози до лактитолу є проблемою, оскільки утворюється декілька побічних продуктів.

Були синтезовані біметалічні наногібриди Ru–Ni як ефективні каталізатори для селективного гідрування лактози. Ця розробка спрямована на отриманням селективного лактиту.

Біметалічні наногібриди Ru–Ni з Ru–NiOx отримують шляхом просочення прекурсорів солей Ru та Ni TiO2, які відіграють роль носія.

Встановлено, що біметалічний наногібридний каталізатор Ru–Ni (5Ru–5NiO/TiO2) демонструє високу селективність лактиту – 99,4%.

Монометалічний каталізатор Ru/TiO2 показує низку продуктивність з (TOF = 251 год-1).

Було підтверджено, що присутня сильна взаємодія між видами Ru та NiO, демонструючи синергічний ефект на покращення селективності лактиту.

Метод просочення-відновлення у приготуванні біметалічного каталізатора Ru–NiO/TiO2 допоміг розробити диспергування наночастинок Ru на NiO, інтенсифікував взаємодію між формами Ru та NiO.

Виявлено, що Ru–NiO/TiO2 ефективно каталізує гідрування лактози до лактитолу з високою селективністю.  Процес відбувається при 120 °C і 55 бар тиску водню (H2).

Каталізатор Ru–NiO/TiO2 можна легко відновити та повторно використати до чотирьох циклів без помітних змін у активності (рис. 2.1.5).

Рисунок 2.1.5. Каталітична гідрогенізація лактози.

Полімери глікокон'югату з біорозкладаним полі(вініловим спиртом) були синтезовані за участю каталізованої ліпази переетерифікацією цукрових спиртів (мальтиту та лактитолу) дивінілдикарбоксилатами, з подальшою радикальною полімеризацією.

Конверсія та хемоселективність при переетерифікації залежали від ліпаз, цукрових спиртів.

Також, важливим була довжина алкільного ланцюга дикарбоксилатів.

Хемоселективна естерифікація була досягнута в присутності ліпази з отриманням мальтитол 6-вінілсебацат, лактитол 6-вінілсебакат і лактитол 6-віниладипат.

Полімеризація вінілових ефірів з пероксидом водню/аскорбіновою кислотою (ініціатор) дала глікокон'югатні полімери.

Ці полімери приймають міцелярну конформацію у воді, міцно зв’язуються зі специфічними лектинами (конканаваліном А або RCA120).

Описаний простий синтез є корисним для розробки глікокон’югатних полімерів з високою біологічною активністю.

Висока біологічна активність досягається завдяки багатовалентному гліко-кластерному ефекту (рис. 2.1.6).

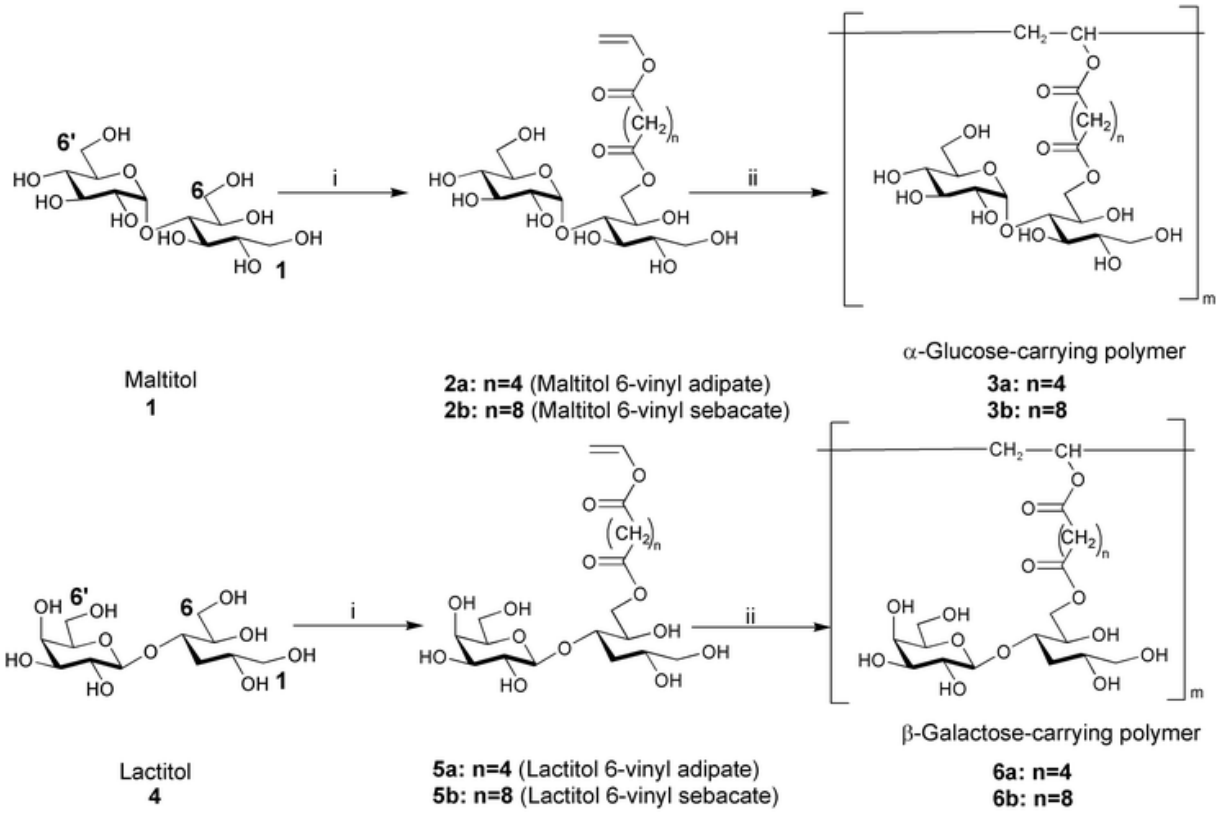



Рисунок 2.1.6. Хемоензиматичний синтез коньюгатів лактитолу.

На рисунку 2.1.7 зображено ПМР спектр лактитолу моногідрату: сигнали протонів –ОН груп спостерігаються при 3.58, 3.65 м.д.; протонів гетероциклу при 3.49, 3.73, 3.76, 5.03 м.д.; протонів нециклічного фрагменту при 2.99, 3.38, 3.56, 3.61, 3.62, 3.81 м.д.

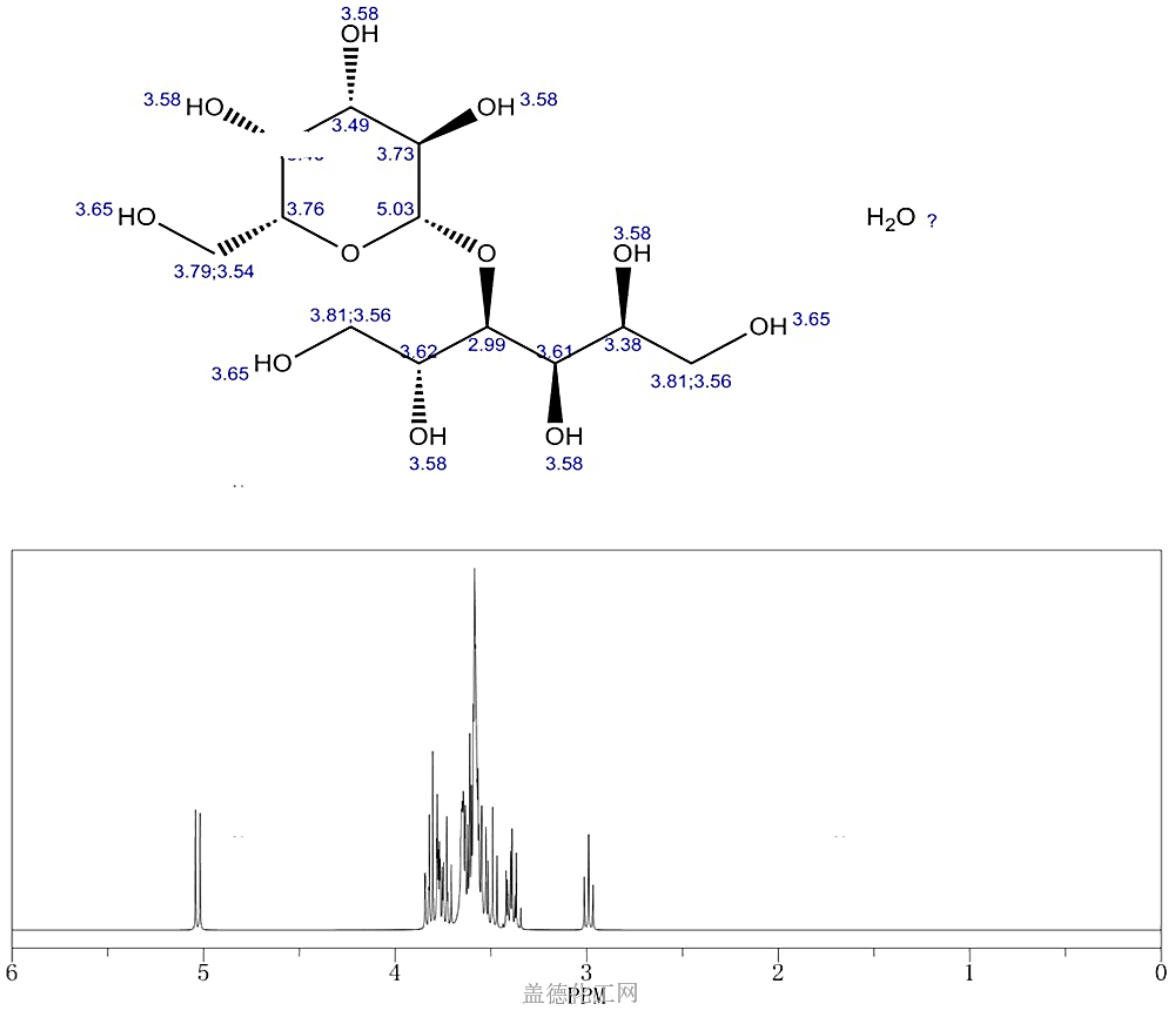



Рисунок 2.1.7. ПМР спектр лактитолу.

Спектр ІЧ- та раманівського розсіювання для лактитолу представлено на рисунку 2.1.8.

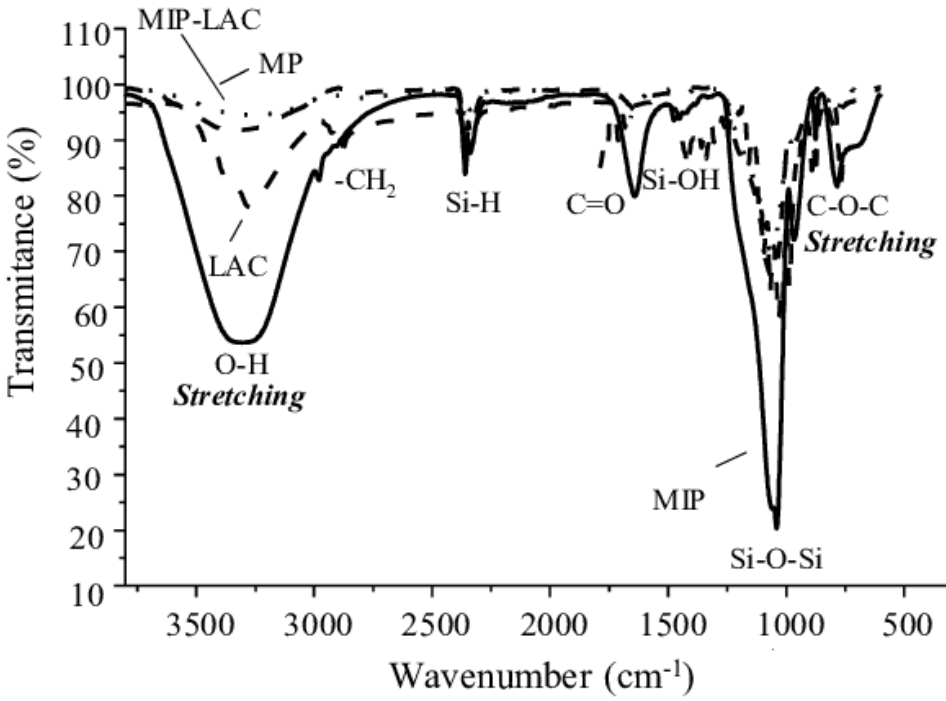



Рисунок 2.1.8. a) ІЧ-спектр та (b) спектр комбінаційного розсіювання лактитолу (при кімнатній температурі).

ІЧ-спектр лактитолу містять наступні сигнали: 1000 см$^{-1}$ (Si-O-Si), 1510 см$^{-1}$ (C=O), 2480 см$^{-1}$(Si-H), 3000-3500 см$^{-1}$ (OH).

На рисунку 2.1.9 зображено ІЧ-спектр мономеру лактіду.

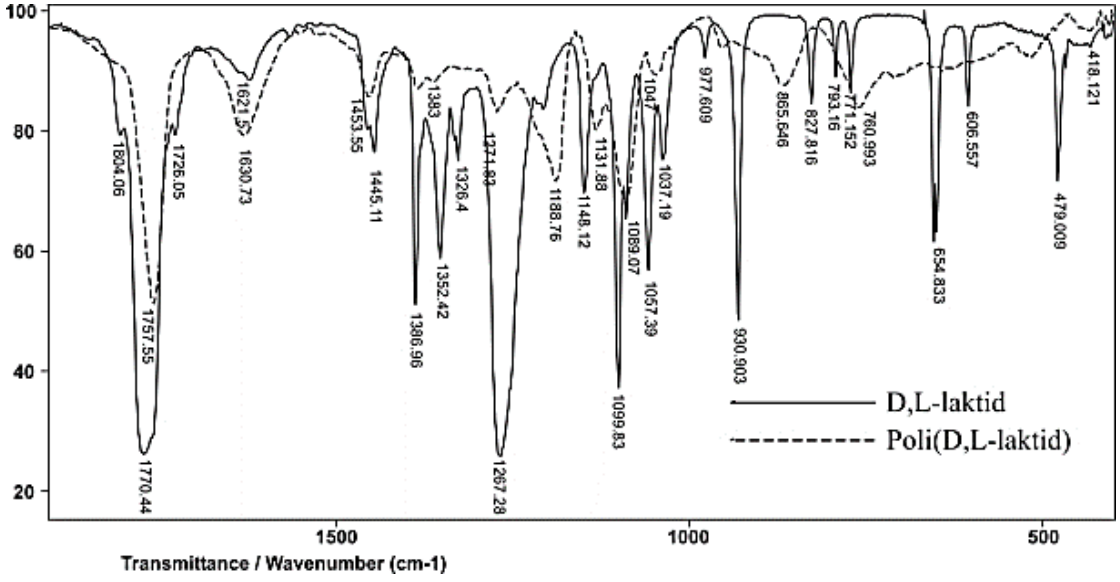



Рисунок 2.1.9. ІЧ-спектр мономеру лактиду.

Лактитол як лікарська речовина – це субстанція для виготовлення лікарських форм. ДФУ не регламентує аналіз цієї речовини [21]. Європейська Фармакопея [22] регламентує аналіз лактитолу моногідрату.

Лактитол моногідрат – це кристалічний порошок білого або майже білого кольору. М.м. 362,3 (безводна речовина).

Його хімічна номенклатурна назва за ІЮПАК – 4-O-α-D-галактопіранозил-D-глюцитол (рис.2.1.10).

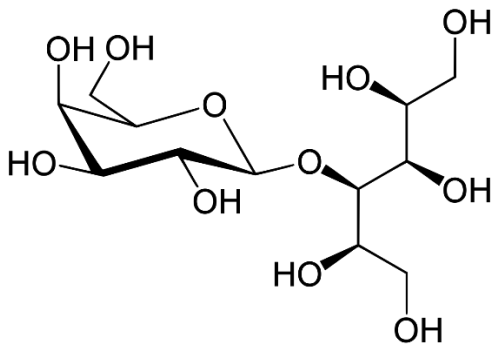



Рисунок 2.1.10. Хімічна формула лактитолу.

Лактитол моногідрат. Чистота 96,5-102,0% (суха речовина). Субстанція добре розчинна у воді *P*, легко розчинна у етанолі (96%) *P*, практично не розчинна у метилен хлориді *P*.

За Eur.Ph. Лактитол моногідрат ідентифікується методом абсорбційної ІЧ-спектрофотометрії (2.2.24) – відповідність спектру ФСЗ лактитолу моногідрату, ТШХ (2.2.27), изначеня специфічного питомого обертання.

Для процедури ТШХ тестовий розчин готують у метанолі *P*: 50 мг субстанції розчиняють у метанолі *P* та доводять до об'єму 20 мл метанолом *P*.

Референтний розчин (a): 5 мг ФСЗ лактитолу моногідрату розчиняють у метанолі *P* та доводять до об'єму 2 мл метанолом *P*.

Референтний розчин (b): 2,5 мг ФСЗ сорбітолу (домішка E) розчиняють у 1 мл референтного розчину (a), доводять до об'єму 10 мл метанолом *P*.

Рухома фаза: вода *P* – ацетонітрил *P* (25 : 75, V/V). Виявлення плями лактитолу моногідрату виконують обприскуванням розчином натрію перйодату *P*, сушать при 100 ºС 15 хвилин.

Ідентифікацію супровідних домішок субстанції Лактитолу моногідрату проводять методом РХ (2.2.29).

Специфіковані домішки: A, B, C, D, E.

Встановлено ліміти для домішок:

Ліміт для домішки B – 1.0%;

Сума домішок – 1.0%.

Детектування – диференційна рефрактометрія. Температура – 35 ºС.

Для приготування рухомої фази виконують воду для хроматографування *P*.

Випробувальний розчин готують розчиненням субстанції у воді *P*.

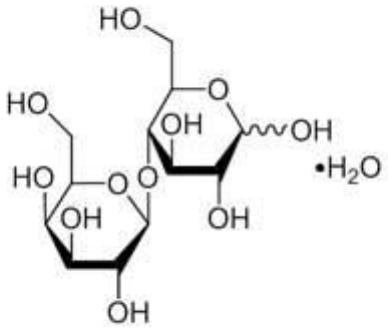
Стандартні розчини готують:

(a): розчиненням лактитолу моногідрату ФСЗ та гліцерин *P* у воді *P*;

(b): розведенням стандартного розчину (a) у воді *P*;

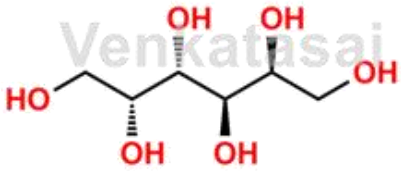
(c): розведенням стандартного розчину (a) у воді *P*.

Домішка A -лактоза

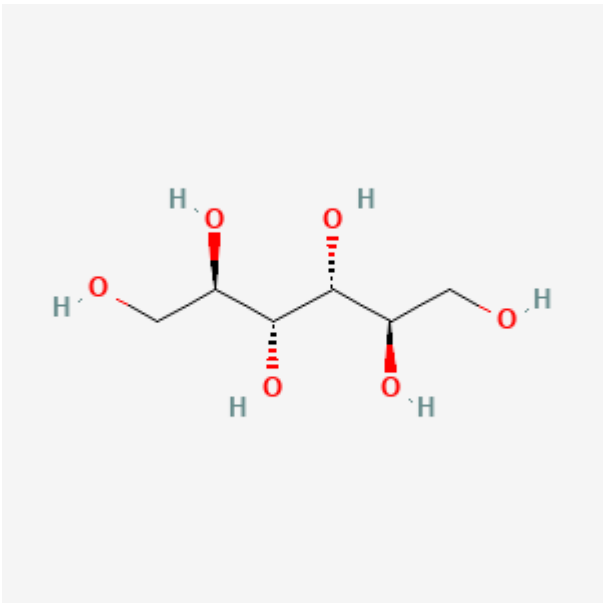


Домішка B - лактулітол

Домішка D - галантітол




Домішка  C – D –манітол



# РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

ДФУ не регламентує аналіз цієї речовини [21]. Європейська Фармакопея [22] регламентує аналіз лактитолу моногідрату та висуває певні вимоги до фармацевтичного аналізу субстанції.

В даній роботі дослідження лактитолу субстанції, опираючись на фармакопейні методи, виконується та описується вперше.

Субстанція лактитолу має різну розчинність у полярних та неполярних розчинниках: добре розчинна у воді *P*, легко розчинна у етанолі (96%) *P*, практично не розчинна у метилен хлориді *P*.

Чистота субстанції. 96,5-102,0% (суха речовина).

Ідентифікація проводиться за методом ІЧ-абсорбційної спектрофотометрії, ТШХ, хроматографічним методам РХ.

Порівняння проводиться із стандартом лактитолу моногідратом CRS.

Споріднені речовини лактитолу досліджуються методом рідинної хроматографії (РХ) (2.2.29).

Специфіковані домішки: A, B, C, D, E.

Детектування – диференційна рефрактометрія.

Температура – 35 ºС.

*Рухома фаза:* використовують воду для хроматографування *P*.

*Випробувальний розчин*:

Випробувальний розчин (a): 50 мг субстанції розчиняють у воді *P*, доводять до 10 мл водою *P*.

Випробувальний розчин (b): розводять 2 мл випробувального розчину (a) до 50 мл водою *P*.

*Стандартні розчини*:

Стандартний розчин (a): розчиняють 5 мг лактитолу моногідрату ФСЗ та 5 мг гліцерину *Р* у воді *Р* до 25 мл;

Стандартний розчин (b): розводять 1 мл стандартного розчину (a) до 100 мл водою *Р*; розводять 5 мл стандартного розчину (a) до 100 мл водою *Р;*

Стандартний розчин (c): розводять 2.5 мл стандартного розчину (a) до 10 мл водою *Р*.

Eur. Ph. встановлено ліміти для домішок:

Ліміт для домішки B – 1.0%;

Сума домішок – 1.0%.

Нами проведено хроматографічне дослідження за допомогою методу ВЕРХ субстанції лактитолу з метою розробки та опрацювання умов хроматографування та методик проведення процедур.

## Матеріали та методи.

Для проведення інструментальних досліджень використовували хроматограф Agilent 1200 з рефрактометричним детектором.

Умови хроматографування:

- колонка – SUPELCOGEL Ca, 300x7,80x9 (або аналогічна);
- поток – 0,6 мл/хв
- детектування – рефрактометричний детектор
- об’єм інжекції – 10 мкл
- температура колонки – 60˚С
- рухома фаза – вода для ВЕРХ
- час хроматографування – 60 хв

*Рухома фаза:* використовують воду для хроматографування *Р*.

**Або у іншому варіанті:**

- *Рухома фаза (1):* $H_2O$ – $CH_3CN$ (12 : 88, V/V), 28,87 мл;
- *Рухома фаза (2):* $H_2O$ – $CH_3OH$ –$CH_3CN$ (10 : 5 : 85, V/V/V), 21,48 мл;
- *Рухома фаза (3):* $H_2O$ – $CH_3CN$ (20 : 80, V/V), 13,28 мл.
- температура колонки – 85˚С.

Лактитол, як представник цукрових спиртів містить у своїй молекулі асиметричні атоми Карбону, тому присутні у суміші разом із своїми стереоізомерами.

Поліол лактит ($C_{12}H_{24}O_{11}$) отримують частковим гідруванням дисахаридів. Він містить залишок глюцитолу та залишок глюкопіранозилу, що можна зазвичай довести хроматограмою.

М'яке нагрівання цукрових спиртів не призводить до деградації молекули. Їх стійкість до термічного розкладання вища, ніж у сахаридів.

На хроматограмі ВЕРХ спостерігався лише один пік, який відповідав лактитолу (Rt=13,272).

Відновна суміш був оброблений галактозидазою, що призвело до розкладання лактиту до D-галактози та D-сорбіту. Подальший аналіз ВЕРХ виявив наявність трьох піків на хроматограмі – D-галактози (Rt=11,228), D-сорбіту (Rt=28,050) та D-гулозил-D-сорбіт (Rt=16,826) (рис. 3.1, 3.2).

Хроматограма досліджуваного розчину представлена на рисунку 3.1.

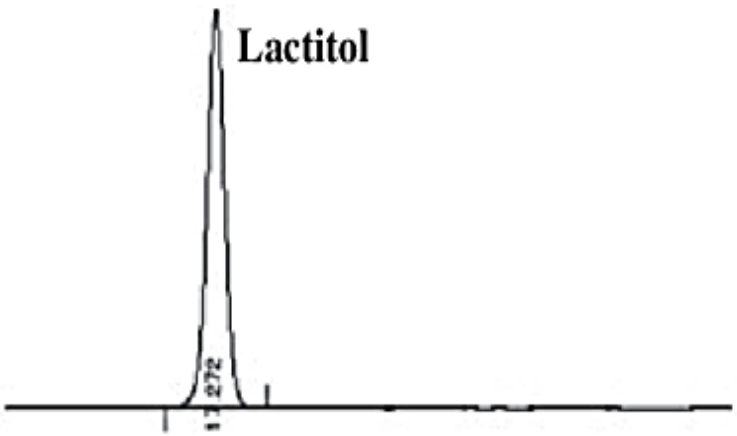



Рисунок 3.1. Хроматограма лактинолу (Rt=13,272 хв).

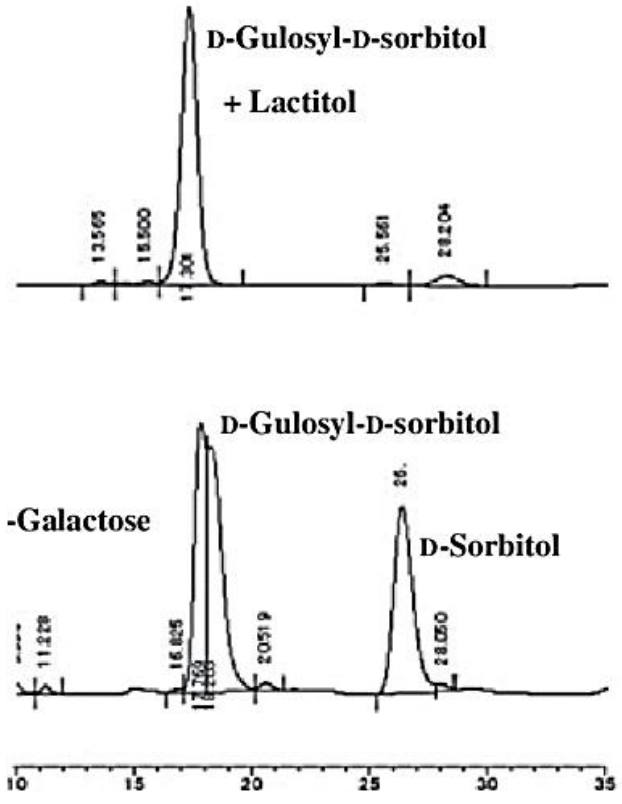



Рисунок 3.2. Хроматограма D-галактози (Rt=11,228), D-сорбіту (Rt=28,050) та D-гулозил-D-сорбіт (Rt=16,826).

Комп’ютерний аналіз за допомогою програми OpenLab CDS.

Для визначення сторонніх домішок методом ВЕРХ використовували реактиви:

- метанол (чистоти для *ВЕРХ*),
- ацетонітрил (чистоти для *ВЕРХ*),
- вода (чистоти для *ВЕРХ*).

## Отримані результати.

При дослідженні розчинів досліджуваного зразку отримано наступні результати (табл. 3.1).

Таблиця 3.1. Розчини досліджуваних зразків.

| | **Зразок 1** | | **Зразок 2** | |
|---|---|---|---|---|
| | | | | |
| | *RT* | *Area* | *RT* | *Area* |
| | 13,274<br>13,270<br>13,272 | 59,837<br>61,500<br>59,467 | 13,271<br>13,275 | 62,047<br>63,333 |
| **Середнє** | **13,271** | **59,268** | **13,272** | **62,690** |
| **SD** | **0,093** | **1,083** | **0,070** | **0,909** |
| **RSD(≤2.0%)** | **0,38%** | **1,80%** | **0,30%** | **1,45%** |

*Розчини зразків:*

*Лактитол, зразок 1:*

- значення Rt знаходиться в інтервалі 13,270-13,274 хв;
- середнє значення Rt стандартів знаходиться в інтервалі 13,271 хв;
- площина піка на хроматограмі коливається в інтервалі 59,467-61,500;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 59.268;
- SD Rt 0.093;

- SD Ar 1.083;
- RSD Rt (<2.0%) 0.38%;
- RSD Ar (<2.0%) 1.80%.

*Лактитол, зразок 2:*

- значення Rt знаходиться в інтервалі 13,271-13,275 хв;
- середнє значення Rt стандартів знаходиться в інтервалі 13,272 хв;
- площина піка на хроматограмі коливається в інтервалі 62,047-63,333;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 62,690;
- SD Rt 0.070;
- SD Ar 0.909;
- RSD Rt (<2.0%) 0.30%;
- RSD Ar (<2.0%) 1.45%.

Таким чином, в рузультаті модифікації умов хроматографування методом ВЕРХ:

- колонка – SUPELCOGEL Ca, 300x7,80x9;
- поток – 0,6 мл/хв
- детектування – рефрактометричний детектор
- об’єм інжекції – 10 мкл
- температура колонки – 85˚С
- рухома фаза – вода для ВЕРХ
- час хроматографування – 60 хв

та методики приготування досліджуваного розчину:

*замість рухомої фази:* вода для хроматографування *Р*

наступні елюенти:

- *Рухома фаза (1):* $H_2O$ – $CH_3CN$ (12 : 88, V/V), 28,87 мл;
- *Рухома фаза (2):* $H_2O$ – $CH_3OH$ –$CH_3CN$ (10 : 5 : 85, V/V/V), 21,48 мл;
- *Рухома фаза (3):* $H_2O$ – $CH_3CN$ (20 : 80, V/V), 13,28 мл

Досліджено методом ВЕРХ лактитол субстанцію.

Виявлено, що у запропонованих умовах хроматографування молекула лактитолу не підлягає деградації з утворенням D-галактози (Rt=11,228), D-сорбіту (Rt=28,050).

При порівнянні результатів хроматографування стандартної та досліджуваної субстанції отримані значення часу утримування та площини піків близькі. Це значить, що модифіковані умови хроматографування коректні, а досліджуваний зразок не підлягає деградації.

Лактитол (зміни, що відбулися у хроматографічній картині):

| Лактитол*, стандарт:* | Лактитол*, зразок 1:* |
|---|---|
| значення Rt знаходиться в інтервалі **9,340-12,840 хв;**<br>середнє значення Rt стандартів знаходиться в інтервалі **11,633 хв;**<br>площина піка на хроматограмі коливається в інтервалі **50**,**455-63,644;**<br>середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку **58.348;** | значення Rt знаходиться в інтервалі **13,270-13,274 хв;**<br>середнє значення Rt стандартів знаходиться в інтервалі **13,271 хв**;<br>площина піка на хроматограмі коливається в інтервалі **59,467-61,500;**<br>середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку **59.268**; |

# ВИСНОВКИ

1. Модифіковано умови хроматографічного дослідження методом ВЕРХ та методики приготування зразків субстанції лактитолу, при яких вона не підлягає деградації, а саме: час хроматографування – 60 хв.
2. Модифіковано методики (ВЕРХ) хроматографування субстанції лактитолу, а саме: *замість рухомої фази:* вода для хроматографування *Р* запропоновано нові елюенти та їх об'єми (*Рухома фаза (1):* $H_2O$ – $CH_3CN$ (12 : 88, V/V), 28,87 мл; *Рухома фаза (2):* $H_2O$ – $CH_3OH$ –$CH_3CN$ (10 : 5 : 85, V/V/V), 21,48 мл; *Рухома фаза (3):* $H_2O$ – $CH_3CN$ (20 : 80, V/V), 13,28 мл).
3. Виявлено, що у запропонованих умовах хроматографування субстанція лактитолу не підлягає деградації з утворенням D-галактози (Rt=11,228), D-сорбіту (Rt=28,050), а при порівнянні результатів хроматографування стандартної та досліджуваної субстанції отримані значення часу утримування та площини піків близькі, що свідчить про коректність запропонованих модифікацій.

# СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ


1. Lactitol Calorie Control Council
2. Mitchell, H., 2006, Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology
3. Current EU approved additives and their E Numbers Food Standards Agency
4. Lactitol Drugs.com
5. Sugar alcohols The Sugar Association
6. Lactitol Toxnet
7. B. Adebayo-Tayo *et al.* In vitro antioxidant, antibacterial, in vivo immunomodulatory, antitumor and hematological potential of exopolysaccharide produced by wild type and mutant *Lactobacillus delbureckii* subsp. *bulgaricus*.Heliyon (2020).
8. M. Ayyash *et al.* Characterization, bioactivities, and rheological properties of exopolysaccharide produced by novel probiotic *Lactobacillus plantarum* C70 isolated from camel milk. International Journal of Biological Macromolecules. (2020).
9. M. Ayyash *et al.* Physicochemical, bioactive and rheological properties of an exopolysaccharide produced by a probiotic *Pediococcus pentosaceus* M41. Carbohydrate Polymers (2020).
10. C. Branco-Price *et al.* Endothelial cell HIF-1α and HIF-2α differentially regulate metastatic success. Cancer Cell (2012).
11. J.F. Bromberg *et al. Stat3* as an oncogene Cell (1999).
12. G. Caldini *et al.* Screening of potential lactobacilli antigenotoxicity by microbial and mammalian cell-based tests. International Journal of Food Microbiology (2005).

13. Y.-C. Chen *et al.* Monosaccharide composition influence and immunomodulatory effects of probiotic exopolysaccharides. International Journal of Biological Macromolecules (2019).
14. Z.-Y. Chen *et al.* Inhibitory effects of probiotic *Lactobacillus* on the growth of human colonic carcinoma cell line HT-29. Molecules (Basel, Switzerland) (2017).
15. W. Di *et al.* Physicochemical characterization and antitumour activity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus casei* SB27 from yak milk. Carbohydrate Polymers (2017).
16. S.V. Dilna *et al.* Characterization of an exopolysaccharide with potential health-benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4. LWT - Food Science and Technology (2015).
17. Y. Rahbar Saadat *et al.* A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides. Carbohydrate Polymers (2019).
18. M.S. Riaz Rajoka *et al.* Functional characterization and biotechnological potential of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from human breast milk. LWT - Food Science and Technology (2018).
19. A. Vitlic *et al.* Isolation and characterization of a high molecular mass β-glucan from *Lactobacillus fermentum* Lf2 and evaluation of its immunomodulatory activity. Carbohydrate Research (2019).
20. J. Wang *et al. In vitro* immunomodulatory effects of acidic exopolysaccharide produced by *Lactobacillus planetarium* JLAU103 on RAW264.7 macrophages. International Journal of Biological Macromolecules (2020).
21. 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.

22. European Pharmacopoeia. Council of Europe, Strasbourg, 10-th ed., 2019. V.1: 3051-3053.

# SUMMARY

**Strichka Iryna**

**MODIFICATION OF THE METHOD OF PHARMACEUTICAL ANALYSIS OF LACTITOL DISACHARIDE**

**The department of medicinal chemistry and toxicology**

**Scientific supervisor: PhD(Biol), as.Meleshko R.A.**

**Keywords:** lactitol, disacharide, HPLC, impurities.

**Introduction.** Lactitol is used in medical and pharmaceutical practices. It is used as an active substance or an additional component in prebiotic complexes Lactitol is not a safe substance in certain doses and requires careful use in medical practice. The quality control of this substance requires carefully conducted procedures using instrumental methods, since the high quality of the medicinal product, the component of which is lactitol, is important for protecting the health and life of patients.

**Materials and methods.** Research object are lactitol, standard samples. Research subject: implementation of HPLC method to pharmaceutical analysis of lactitol. Methods: HPLC (Agilent 1200 with refractometric detector, column - SUPELCOGEL Ca, 300x7.80x9; computer analysis using the OpenLab CDS program.

**Results.** The methods (HPLC) of chromatography of the lactitol substance were modified, namely: instead of the mobile phase: water, new eluents and their volumes were proposed for chromatography P (Mobile phase (1): H2O – CH3CN (12 : 88, V/V), 28.87 ml; Mobile phase (2): H2O – CH3OH –CH3CN (10 : 5 : 85, V/V/V), 21.48 ml; Mobile phase (3): H2O – CH3CN (20 : 80, V /V), 13.28 ml).

**Conclusions.** It was found that under the proposed chromatography conditions, the lactitol substance is not subject to degradation with the formation of D-galactose (Rt=11.228), D-sorbitol (Rt=28.050), and when comparing the results of chromatography of the standard and the substance under study, the retention time and peak plane values were obtained are close, which indicates the correctness of the proposed modifications.

ДОДАТОК 1

Публікації, участь у роботі конференцій, симпозіумів.

1. Мелешко Р.А., Стрічка І.С., Семенюк А.С. ВИЯВЛЕННЯ РОНГАЛІНУ МЕТОДОМ ВЕРХ. Тези доповіді на конференції «Фармацевтична освіта, наука та практика: стан, проблеми, перспективи розвитку», присвячена 25-річчю фармацевтичного факультету Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, 19-20 грудня 2023 р., стор. 398.

2. FIP Symposium, Digital Event «Designing pharmacies towards an accessible, patient-centred and service-orientedmodel of practice», 12.09.2023, The Netherland (Online educational activity). Certificate.