

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О.БОГОМОЛЬЦЯ
ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра хімії ліків та лікарської токсикології

МАГІСТЕРСЬКА РОБОТА

на тему «Розробка методик ідентифікації барвника еритрозину з
використанням фізико-хімічних методів»

Виконав: студент 5 курсу, групи 8804
Стотика В.А.

Керівник: доцент кафедри хімії ліків та лікарської токсикології,
кандидат фармацевтичних наук, Бурмака О.В.

Київ – 2023 рік

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ 1: Основні поняття. Історія виникнення та початку використання барвників. Класифікація.	
1.1 Історія використання перших барвників.....	6
1.2 Поняття барвник. Класифікація барвників. Вимоги до барвників.....	10
1.3 Барвник еритрозин. Властивості, шляхи добування, методи ідентифікації, сфери використання.....	18
1.4 Загальна характеристика інструментальних методів аналізу.....	21
1.5 Тонкошарова хроматографія (далі ТХ).....	21
1.6 Високоєфективна рідинна хроматографія (далі ВЕРХ).....	23
1.7 Спектрофотометрія.....	25
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	
РОЗДІЛ 2. Розробка методик ідентифікації барвника Еритрозин в лікарських засобах у формах таблеток вкритих оболонкою та капсул методами ТШХ, ВЕРХ та спектрофотометричним методом.....	27
2.1 Розробка методики ідентифікації барвника Еритрозин методом тонкошарової хроматографії та визначення можливості використання даної методики для різних лікарських засобів, до складу яких входить даний барвник.....	31
2.1.1 Результати підбору параметрів тонкошарової хроматографії та методики приготування випробуваних та стандартного розчинів.....	33
2.2 Розробка методики ідентифікації барвника Еритрозин методом високоєфективної рідинної хроматографії та визначення можливості використання даної методики для різних лікарських засобів, до складу яких входить даний барвник.....	36

2.2.1	Перевірка придатності хроматографічної системи та результати ідентифікації барвника Еритрозин методом ВЕРХ.....	37
2.3	Розробка методики ідентифікації барвника Еритрозин методом спектрофотометрії та визначення можливості використання даної методики для різних лікарських засобів, до складу яких входить даний барвник.....	40
	Висновки.....	43
	Літературні джерела.....	45
	Додатки.....	50

ВСТУП

Актуальність теми: В наш час фармацевтична галузь розвинулась до неймовірних масштабів і продовжує дивувати новими відкриттями. Конкуренція на фармацевтичному ринку дуже висока, тому кожна фірма намагається привабити до себе якомога більше споживачів. Для цього вони використовують різні методи, такі як реклама по телебаченню, яскрава упаковка. Також не слід забувати і про зовнішній вигляд самого препарату.

Багато провізорів в аптеках визнають той факт, що більшість людей, які приходять до аптеки, не пам'ятаючи назву ліків, починають пригадувати зовнішній вигляд таблетки, капсули і тд. Одним із головних критеріїв на рівні з формою та розміром є колір.

Протягом останніх десятиріч спостерігається значне збільшення кількості допоміжних засобів у складі препаратів лікарського призначення. Одна з найчисленніших груп допоміжних речовин, які представлені на фармацевтичному ринку, складають барвники .

Барвники є однією з найбільш чисельних груп допоміжних речовин. Наразі перелік дозволених до використання барвників налічує 100 найменувань (в Україні дозволені до використання 47 (відповідно до Наказу МОЗ України №8 від 15.03.2003)).

У відповідності наказу Міністерства охорони здоров'я України від 25.09.2005 р. (з останніми змінами від 10.11.2020 року) № 426 «Про затвердження Порядку проведення експертизи реєстраційних матеріалів на лікарські засоби, що подаються на державну реєстрацію (перереєстрацію), а також експертизи матеріалів щодо внесення змін до реєстраційних матеріалів протягом дії реєстраційного посвідчення» в групу над якими здійснюється контроль, входять ті лікарські засоби, в складі яких наявні барвники [21].

Універсальний метод дослідження для всіх лікарських форм підібрати неможливо, це зумовлено різними агрегатними станами, густиною, діючими та допоміжними речовинами, що входять до складу препарату, тому ми повинні розробити відповідні методики контролю якості.

В сучасних фармацевтичних лабораторіях наявний широкий спектр методів визначення хімічних речовин. Основними та загальноживаними є спектрофотометрія, хроматографія, фотометрія, спектроскопія, рефрактометрія і тд. При визначенні харчових барвників науковці надають перевагу найменш трудомістким та відносно дешевим методам, до таких відносяться ТШХ та спектрофотометрія, також в багатьох лабораторіях використовують більш дорожчий та технологічний метод ВЕРХ.

Мета роботи: полягає у розробці до сьогодні не описаної методики якісної ідентифікації барвника Еритрозин в різних лікарських формах (капсули, таблетки вкриті оболонкою), використовуючи вищезгадані методи ідентифікації (ТШХ, ВЕРХ та спектрофотометрії).

Для втілення поставленої мети необхідно вирішити наступні завдання:

- Проаналізувати історію виникнення та використання синтетичних барвників;
- Визначити основні положення барвників: класифікація, хімічні властивості та методи ідентифікації;
- Дослідити барвник Еритрозин: характеристика, фізико-хімічні властивості, добування та використання;
- Підібрати відповідні методи аналізу виходячи з властивостей препарату;
- Розробити методику дослідження.

Об'єкт дослідження: синтетичний барвник Еритрозин (E127).

Предмет дослідження: лікарські засоби що мають в складі барвник Еритрозин: капсули Грипостад С, таблетки вкриті оболонкою Корвазан 12.5 мг, таблетки вкриті оболонкою Анантаваті.

РОЗДІЛ 1: Основні поняття. Історія виникнення та початку використання барвників. Класифікація.

1.1 Поняття барвник. Історія використання перших барвників.

З початку нашої ери людству були відомі речовини, здатні надавати інше забарвлення предметам: змінювати колір волокон, хутра, тканин і навіть, поверхням тіла. В згадках античних часів було зазначено використання харчових барвників. До прикладу Гомер у своєму відомому творі «Іліада» розповідає про шафран, який додавали не тільки для аромату, а й для забарвлення страв. Ще у 400 р. до нашої ери при виготовленні вина використовували штучне забарвлення, писав Пліній Старший.

Наразі, більшість галузей промислового виробництва використовують барвники у виробництві своєї продукції, такими є легка машинобудівна, паперова, будівнича, шкіряна, харчова, хімічна, медична тощо. Нині такі промисловості не уявляють свою діяльність без використання барвників, однак історія їх походження та потреба використання є досить довгою .

Барвники – хімічні сполуки природного або синтетичного походження, використовуються як допоміжні речовини для надання або відновлення кольору лікарським формам, харчовим продуктам, текстильним волокнам.

Пурпур - один перший відомий людству барвник., перше згадування про нього датується X в. до н.е. Добування пурпуру було досить клопітким та навіть небезпечним завданням, були випадки негативних наслідків для життя працівників, через тривалу та небезпечну виснажливу працю. Барвник отримували з равлирів голчанок, які водилися у водах Середземного моря.

Одній частині рабів доводилося пірнати на дно моря, по десятки, а то і сотні разів на день, інша ж частина - вичищала равликів з раковин, натирала їх сіллю та виконувала іншу підготовчу роботу. Відразу барвник не мав яскраво вираженого забарвлення. Він окиснювався повітрям та поступово змінював колір, набуваючи спочатку лимонно-жовтого, потім зеленого й нарешті насиченого червоно-фіолетового забарвлення. На 1 г пурпуру потрібно було переробити 10 тисяч равликів - тому ціна такого барвника була достатньо високою для того часу, адже отримати його було надзвичайно складно. Рекордсменом по видобутку даного барвника є Фінікія, розташована поблизу міста Тиру.

Відомо також, що чорний барвник видобували з чорнил каракатиць, помаранчеве забарвлення надавала куркума. Червоний барвник (кармін) - діставали шляхом подрібнення сухих комах - щиткові попелиці. Щоб отримати 100 грамів такого барвнику потрібно було перемолоти близько 20 тисяч осіб даного виду. Також, білий барвник добували з крейди, вапняку та мелених кісток, та навіть, використовували цей барвник у виготовленні хлібу.

У XVIII столітті різко зростає текстильна промисловість, що тягне за собою різку потребу у збільшенні видів та обсягів використання барвників. Завдяки переходу текстильного виробництва на використання машинного виробництва, зросла можливість за менший термін створювати більшу кількість продукції, як наслідок - виникла потреба збільшення кількості барвників та мінімізувати витрати на нього, тобто замінити використання природних барвників на синтетичні, що мали стати більш дешевими та доступними у виробництві [30].

Першим досягненням у створенні таких синтетичних та напівсинтетичних барвників ми можемо завдячити таким науковцям як Шееле (мурексид, 1776 р.), Бартом (індигокармін, 1743 р.) та Вульфом (пікринова кислота, 1771 р.).

Поступове зростання синтетичних барвників призвело до появи проблеми користі таких барвників для споживачів. Ф. Аккум - англійський хімік, у 1820 році склав та опублікував перелік продуктів у складі яких виявлено небезпечні барвники. Ці барвники надавали продуктам невласивого для них забарвлення, що вводило в оману покупців. Наприклад, деякі продавці та виробники чаю та кави, завдяки барвникам - надавали використаним або нетиповим листям чаю та меленої кави, потрібного відтінку та продавали їх знову. Також до списку увійшли мариновані огірки, тому щ їх підфарбовували міддю, тим самим створювали потрібний колір та шкодили здоров'ю своїх покупців.

Анілін був отриманий чотирма хіміками, які працювали окремо один від одного над його створення : Унфердорбен у 1826, Фріцессе у 1840 і Зінін у 1841 - отримали його з індиго, в той час як Рунге у 1834 винайшов його з кам'янілого вугілля. Також, Рунге є одним з перших кому вдалося винайти.

А Н.М. Зінін в свою чергу відкрив реакцію відновлення ароматичних нітросполук. Як наслідок було винайдемо анілін та ще деякі інші амінопохідні, і стало причиною створення анілінофарбової промисловості.

Фуксин як і велику кількість барвників було винайдено у 50-х рр. XIX ст. завдяки кам'яній смолі, який відкрив професор Якоб Натансон у 1956 році. Після цього попит на використання синтетичних барвників зріс у рази, їх почали додавати до вина, масла, сирів та інших продуктів харчування (для прикладу, у США налічувалось близько 80 найменувань продукції).

Інший представник анілінових барвників, який був одержаний за досить незвичних обставин у лабораторії - мовеїн. Перкін молодий 18-літній хімік, на літніх канікулах працював над синтезом хініну. Але одна спроба виявилася невдалою, адже зненацька вміст пробірки забарвився в яскраво-фіолетовий колір - це і був мовеїн. Менше ніж рік юний експериментатор та його батьки

працювали над тим, щоб налагодити виробництво нового барвника в масштабах власного заводу. Саме завдяки молодому хіміку Перкіну була заснована галузь анілінофарбової промисловості.

Взагалі, Х.З. Лечеро розділив розиток барвинків на два періоди. Перший він назвав «емперичний період» - це всі здобутки науковців до 1870 року, адже структурна теорія ще не була створена. Другим став «раціональний період» оскільки структура бензолу Кекуле була створена в 1865 році та згодом представлена та затверджена науковим товариством. Формула бензолу стала підґрунтям для отримання нових барвників. Саме на другому періоді промисловість почала використовувати нові барвники, і як результат - почала шукати специфічні органічні сполуки.

На початку ХХ століття перелік барвників що використовувались у харчовій промисловості налічував у собі велику кількість як синтетичних так і натуральних барвників. Згодом після проведення ретельних досліджень кількість дозволених до використання синтетичних барвників значно скоротилась.

Починаю з 1980- тих років в країнах ЄС було введено перелік дозволених синтетичних барвників, кількість яких складала 12 найменувань. Найбільше у Великобританії - 16, а найменше у СРСР - 2. У Італії та Індії - 11, Австралія - 10, Канада - 8.

Починаючи з кінця ХХ ст. виробників, які в своїй продукції використовували барвники, повинні були зазначувати на упаковці перелік всіх синтетичних барвників, що входили до складу продукту [25].

Ми проаналізували історію походження природних та створення синтетичних барвників. Наразі барвники займають одне з головних місць по застосуванню в різних галузях промисловості. Синтетичні барвники поступово витіснили природні, і наразі їх налічують більше 15 000 одиниць, які

надають різноманітні кольори та відтінки. Кількість барвників що отримали своє найменування в промислових масштабах сягає 500 одиниць. Загалом, 500000 тон - це кількість виробництва барвників на рік.

1.2 Поняття барвник. Класифікація барвників. Вимоги до барвників.

Поняття барвник в загальному розумінні - це органічна сполука, що здатна інтенсивно поглинати і перетворювати енергію електромагнітних випромінювань (світлову енергію) у видимій і ближніх ультрафіолетовій (УФ) та інфрачервоній (ІЧ) областях спектра. Як наслідок, використовується задля надання цих властивостей іншим тілам. Він поглинає частину світловим променів певної довжини хвилі у видимій частині спектра, тим самим такі сполуки стають кольоровими.

Відповідно до визначення згідно з Директивою Європейського Парламенту та Ради 94/36/ЄС від 30 червня 1994 року харчовий барвник (food colour) – це харчова добавка, призначена для додання, посилення або відновлення забарвлення харчових продуктів [5].

Відповідний код «Е» був присвоєний для барвників Директивою Ради 78/25/ЄЕС від 12 грудня 1977 року про зближення правил країн ЄС щодо барвників, дозволених для застосування у лікарських засобах [4] , та/або Директивою Європейського Парламенту та Ради 94/36/ЄС від 30 червня 1994 року про барвники, що застосовуються у харчових продуктах.

Загальний перелік допоміжних речовин та барвників, які дозволені для застосування у виробництві фармацевтичних препаратів в Україні, затверджений наказом Міністерства охорони здоров'я України від 19 червня 2007 р. № 339.

Таб.1 Міжнародна класифікація харчових барвників по номерам.

Номер	Барвники
E100-E109	Жовті
E110-E119	Оранжеві
E120-E129	Червоні
E130-E139	Сині і філетові
E140-E149	Зелені
E150-E159	Коричневі і чорні
E160-E199	Інші

При забарвленні фармацевтичної продукції вирішуються завдання диференціації лікарських засобів різної сили дії, які виробляє один виробник, маскування неприємного кольору деяких АФІ, він захищає світлочутливі лікарські засоби від шкідливого руйнівного впливу світла, що впливає на збільшення їх терміну придатності.

За походженням барвники класифікують на органічні, неорганічні (мінеральні) та синтетичні:

Таб.2

Мінеральні	Органічні	Синтетичні
Кальцію карбонат	Хлорофіли	Азобарвники
Титану діоксид	Каратиноїди	Трифенілметанові
Феруму гідроксид	Куркумін	Індгоїдні
Феруму оксид	Кармін	Ксантенові
Вугілля медичне		Хінолінові

Із сировини рослинного та тваринного походження одержують натуральні барвники. З найпоширеніших барвників, які добуваються в такий

спосіб є куркумін (E100), який отримують з кореневища куркуми, цукровий колір (E150) – при термічній обробці харчових вуглеводів (глюкози, фруктози), кармін (E120) – екстракцією з кошенилі (тіл самок комах *Dactylopius coccus costa*). Всі ці барвники об'єднуює чутливість до рН середовища та інших фізико-хімічних чинників. Жиророзчинні та водорозчинні каротиноїди у промисловості використовують для забарвлення таблеток із цукровим покриттям і м'яких желатинових капсул щоб надати їм у жовтого, оранжевого, темно-червоного кольору.

Якщо говорити про неорганічні барвники, то їх походження йде від мінеральної та природної сировини. Серед таких представників можемо зазначити діоксид титану (E171), якого отримують з титановмісних руд, та карбонат кальцію (E170), який добувають з природного вапняку або за допомогою хімічного синтезу. Їх використовують у вигляді онкодисперсних порошків для забарвлення захисного покриття таблеток та отримання непрозорості твердих та м'яких желатинових капсул. Мінеральні барвники характеризуються високою міцністю, стійкістю до дії світла, гарною змішуваністю [20].

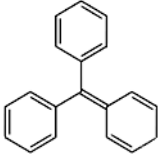
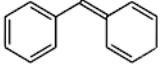
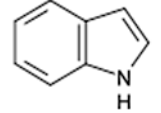
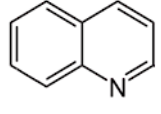
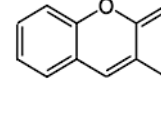
Органічний синтез - головний метод отримання синтетичних барвників. Головною властивістю барвника є висока фарбувальна здатність. Вона надає змогу отримати потрібне забарвлення з належною інтенсивністю харчовій продукції, при цьому використовується мала кількість барвнику. Вони достатньо добре розчиняються у воді та зберігають належний колір впродовж потрібного періоду. Також, більш стійкі до технологічної переробки та зберігання. Головною відмінністю синтетичних від природних барвників полягає у більш складній хімічній формулі. Тим самим вони мають більше технологічних переваг, адже штучні барвники зазвичай не є біологічно активними та не містять в своєму складі смакових речовин, також синтетичні барвники є термостійкими.

За розчинністю барвники поділяють на жиророзчинні, водорозчинні, пігменти. Нерозчинні у воді барвники надають кольору шляхом розсіювання або відбивання світла. Для забарвлення водних розчинів використовуються водорозчинні барвники, які надають кольору шляхом пропускання світла. Барвники повинні додаватися в найнижчій допустимій концентрації, яка дозволяє отримати бажаний колір. Концентрація барвників у рідких лікарських формах, як правило, менша ніж 0,001%.

Лідерами серед барвників, що використовуються в фармацевтичній та харчовій промисловості є: тартразин, E 102; жовтий «сонячний захід», E 110 - створюють жовтий відтінок, та азорубін, E122; понсо 4R, E124; спеціальний червоний AG, E 129 - червоний. Щоб досягнути зеленого кольору змішують діамантовий синій E133 з жовтим барвником E102.

Синтетичні барвники розділяють на п'ять основних хімічних класів: азобарвниками, тріалметановими, ксантановими, хіноліновими, індигоїдними.

Таб. 3

Азобарвники	<ul style="list-style-type: none"> • Тартразин E102 • Кармуазин E122 • Понсо 4R E124 • Жовтий сонячний захід E110 • Спеціальний червоний E129 	$-N=N-$ 
Трифеніл-метанові	<ul style="list-style-type: none"> • Синій блискучий E133 • Синій патентований E131 	
Індигоїдні	<ul style="list-style-type: none"> • Індігокармін E132 	
Хінолінові	<ul style="list-style-type: none"> • Жовтий хіноліновий E104 	
Ксантенові	<ul style="list-style-type: none"> • Еритрозин E127 	

Азобарвники займають найбільшу групу синтетичних барвників, на них припадає 70% усіх органічних барвників в світі.

Під час фармацевтичної розробки необхідно вивчити сумісність барвника з іншими компонентами та розглянути вплив на стабільність барвника таких чинників, як рН розчину, мікробіологічна чистота, властивість контейнера пропускати світло. Вибір відтінку необхідно проводити у взаємозв'язку зі значенням рН лікарської форми, оскільки величина рН суттєво впливає на ступінь забарвлення. Колір зазвичай підбирається відповідно до смаку та запаху лікарського засобу (наприклад, жовтий — для лікарських засобів зі смаком лимона, червоний — зі смаком полуниці). Барвники не додаються до парентеральних лікарських засобів.

Застосування барвників у фармації припустиме лише в тому випадку, якщо ці речовини не завдають шкоди здоров'ю людини навіть при тривалому використанні.

Вживання барвників значно впливає на організм людини, як і будь який синтетичний продукт має зазвичай негативні наслідки в більшій мірі ніж позитивний. Як наслідок до них складено перелік вимог.

Проаналізувавши історію барвників, можемо зазначити, що останнім часом використання барвників набуло своєї популярності не тільки в харчовій промисловості, а й у лікарських препаратах. Через розвиток фармацевтичного ринку та збільшенню асортименту лікарських засобів, повстала потреб у використанні барвників. Але наразі суспільство все більше приділяє увагу якості продукції як харчової так і фармацевтичної та її впливу на організм людини.

Можемо зазначити, що жоден барвник не має ніякої харчової цінності. Наразі, доведено що низка синтетичних барвників та деякі харчові барвники несуть негативний вплив на дитячий організм. До прикладу, синтетичні барвники можуть сприяти розвитку поведінкових розладів, гіперактивності та неможливість концентрування уваги, та інші індивідуальні відмінності у дітей[28;23;16] Встановлено, перелік найпоширеніших барвників, що

проовокують появу дифіциту уваги та гіперактивності у дітей, до нього відносять E102, хіноліновий жовтий (E104), E110, E122, E124 і E129. Також, доведено що вживання азобарвників можуть викликати рак, хромосомні аберації, генотоксичність, нейротоксичність, психотоксичність, репродуктивну токсичність [21; 34].

Щодо впливу синтетичних барвників на дорослу особу можемо зазначити наступні: перепади настрою, легку збудливість, розлади кишківника. Наприклад, азонобарвники мають властивість відновлюватися в організмі людини у вигляді потенційно небезпечних амінів та азоксисполук, тим самим чинять канцерогенний вплив та можуть провокувати хвороби нирок та печінки [29]. Також, доведено взаємодія харчових азобарвників з альбуміном сироватки та гемоглобіном людини [32]. Останнім часом дослідники спостерігають значне збільшення осіб, що хворіють на астму та алергію. Однією з причин такого феномену стали харчові домішки, а саме - барвники. Доведено що вживання спеціального червоного АГ (E129) призводить до появи астми та кропив'янки, тартразин (E102) провокує астму й мігрень; еритрозин (E127) сприяє розвитку проблем з щитовидною залозою.[7].

Дослідниками було виявлено наступне:

Відтінки жовтого (E102, E104, E107, E105, E106, E110) - можливі наслідки вживання представлених сполук: астма, пухлини, шкіряні захворювання;

Відтінки синього (E130, E131) – перелік можливих наслідків складають онкологічні захворювання, проблеми зі шкірою та органами ШКТ

Відтінки оранжевого (E111, E121) – ці барвники можуть стати підґрунтям для появи новоутворень в органах сечової системи.

Відтінки зеленого (E142, E143) - регулярне вживання продукції з домішками цих барвників, сприяє підвищенню ризику появи у людини онкології, алергічних реакцій та мутацій внутрішніх органів.

Відтінки червоного (E122, E123, E125, E128, E129) – ці сполуки можуть нанести значну шкоду як нервовій системі, так і органам життєзабезпечення: алергія, гіперактивності та зниження концентрації, розвиток злоякісних пухлин та захворювань ШКТ [2].

На відміну від синтетичних барвників, натуральні барвники не несуть жодної загрози для здоров'я та життя людини. Лише у невеликого відсотку осіб, може бути виявлена особлива непереносимість того чи іншого натурального барвника, через це таким особам варто відмовитися від вживання продуктів з вмістом даних барвників. Також, натуральні барвники навіть можуть приносити користь для нашого організму.

У цивілізованому світі органами, що займаються покращенням та захистом здоров'я, забезпеченням якості та безпечності харчових продуктів є Європейський орган з безпеки харчових продуктів (European Food Safety Authority, EFSA) та Управління харчових продуктів та медикаментів (Food and Drug Administration, FDA)

Основою для використання харчових добавок у ЄС є Регламент № 1333/2008 Європейського Парламенту та Ради від 16 грудня 2008 року.

В Україні виробники, що використовують барвники в своїй продукції мають дотримуватися Закону України «Про основні принципи та вимоги до безпечності та якості харчових продуктів».

Також, Міністерство охорони здоров'я України наказом від 23.07.1996 № 222 «Про затвердження Санітарних правил і норм по застосуванню

харчових добавок» затвердило перелік дозволених на території України харчових домішок, а саме СХБ.

Директива 95/45/ЄС - визначила критерії чистоти для барвників, яким він повинен відповідати [5].

Отже, синтетичні барвники на сьогоднішній день мають високий попит не тільки у харчових та промислових галузях, а й у фармацевтичній. Саме у фармацевтичній галузі синтетичні барвники посідають одне з перших місць по чисельності груп допоміжних речовин. Адже, синтетичні барвники дають змогу фармацевтичним компаніям надавати своїй продукції впізнаваного виду. За рахунок різного забарвлення таблеток, сиропів, капсул та їх оболонки, споживачі швидше запам'ятовують призначення цих препаратів. [29; 38], а для дітей таке різноманіття кольорів підвищує привабливість, тим самим полегшуючи прийом ліків. Надання конкретного кольору пов'язують зі смаком або ароматом, який має цей препарат, наприклад, червоний - полуниця та вишня, помаранчевий для апельсинового, жовтий - бананового або лимонного тощо. Нажаль, в Україні все ще не створено ефективної та дієвої системи для контролю використання синтетичних барвників. Через це, деякі виробники і досі нехтують дозуванням синтетичних барвників, до прикладу, в сиропах вміст барвників може сягати 0.0005 – 0.001 % [27].

Підсумуємо, барвники займають першість серед допоміжних речовин, адже використовуються в більшості галузей легкої та важкої промисловості. Особливу потребу у синтетичних барвниках мають галузі харчової та фармацевтичної промисловості. Хоча не зважаючи на всі можливі негативні наслідки вживання штучних барвників, вони все більше витісняють натуральні.

1.3 Барвник еритрозин. Властивості, шляхи добування, методи ідентифікації, сфери використання.

Еритрозин (Erythrosine) - це синтетичний червоний барвник, який використовується у харчовій, фармацевтичній та косметичній промисловості, зазвичай його додають для отримання червоного кольору. Він також може використовуватися як показник рН та для позначення рівня заповнення капсул.

Еритрозин був відкритий в 1874 році німецьким хіміком Йонасом Лейбігом. Він знайшов, що реакція оцтової кислоти з ксантеном приводить до утворення червоного барвника, який був названий еритрозином.

У наступні десятиліття, еритрозин був використаний у медицині, в основному для показників. У 20-х роках 20 століття, його використання розширилося на інші галузі, включаючи харчову та фармацевтичну промисловості. Еритрозин знайшов своє застосування як харчовий барвник, особливо в продуктах, які мають червоний колір, таких як жувальна гумка, кондитерські вироби та напої.

Як вже було сказано Еритрозин є синтетичним червоним барвником, який належить до класу ксантенових барвників. Він має формулу $C_{20}H_{6}I_4Na_2O_5$ та молекулярну масу 879,96 г/моль. Ось деякі загальні хімічні властивості еритрозину:

Структурна формула:

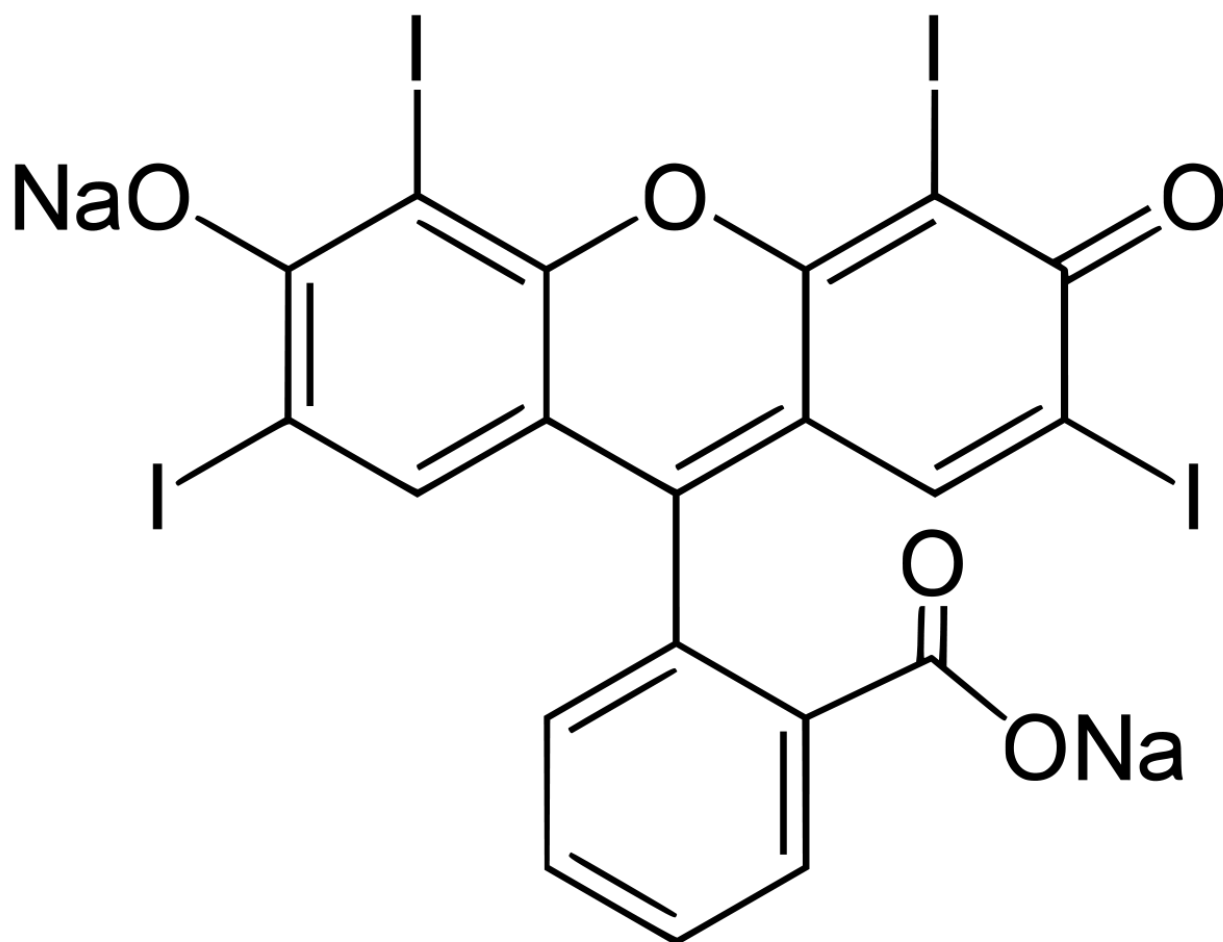


Рис.1

Еритрозин розчинний у воді та етанолі. Проявляє досить високу стійкість до світла та тепла, що робить його зручним для використання в продуктах, які піддаються високим температурам.

Також Еритрозин може утворювати комплекси з іонами металів, такими як магній, кальцій та цинк, тому слід уважно підбирати склад препаратів для уникнення небажаних реакцій.

Наявність яскравого червоного кольору Еритрозину зумовлена високою абсорбцією світла в діапазоні 500-550 нм.

Велика кількість еритрозину може бути шкідливою для здоров'я та спричиняти алергічну реакцію у людей з гіперчутливістю до барвників, а також збільшувати ризик розвитку гіперактивності у дітей.

У деяких країнах, таких як США, Канада та Японія, використання еритрозину у продуктах обмежено або заборонено. Однак, в інших країнах він може бути використовуваний з деякими обмеженнями на дозування.

Існує кілька шляхів добування еритрозину, проте найпоширеніший - це синтез його з ксантену. Основний процес включає такі кроки:

1. Синтез ксантену: Ксантен є вуглеводнем, який можна синтезувати з фталічної ангідриди та бензолу. У результаті цих реакцій утворюється ксантен, який є прекурсором еритрозину.
2. Синтез еритрозину: Ксантен реагує з оцтовою кислотою, що призводить до утворення еритрозину. Продукт потім очищається та сушиться.
3. Очищення: Після синтезу еритрозину потрібно очистити його від забруднень та інших нечистот. Це зазвичай роблять за допомогою кристалізації з розчинів або хроматографії.
4. Пакування: Очищений та сухий еритрозин фасуються у спеціальну упаковку, щоб зберегти його свіжість та довговічність.

Отже, добування еритрозину є складним процесом, який вимагає спеціальної обладнання та високих технологій. Це пояснює високу ціну на продукт і обмежений його використання в деяких країнах.

1.4 Загальна характеристика інструментальних методів аналізу.

В Україні стандарт якості синтетичних барвників контролюється з урахування вимог ДСТУ 5051:2008 «Продукти харчові. Визначення синтетичних харчових барвників методом високоефективної рідинної хроматографії»

1.5 Тонкошарова хроматографія

Серед найдешевших та ефективних методів ідентифікації та визначення харчових барвників першість займає Тонкошарова хроматографія (ТШХ). Цей метод розділення – нерухома фаза, яка містить придатний матеріал, що наноситься стандартизованим тонким шаром та фіксується на основі (пластинці або пластині) і з скла, металу, пластмаси. Адсорбація, розподіл іоного обміну та їх комбінації лежать в основі такого розділення і складається з двох фаз. Перша – нерухома фаза- відбувається переміщення досліджуваних речовин в тонкому шарі, друга – рухома фаза- являє собою розчинення цих самих речовин у розчиннику або у відповідній суміші. Наслідком поділу речовини є утворення на поверхні сорбенту зони адсорбації круглих або еліпсоподібних плям та смуг. Показники для ідентифікації речовин та оцінки роздільної здатності системи забезпечуються параметрами R_f , що отримуються при вимірюванні рухливості речовини та її хроматографуванні.

Також, перевагою методу ТШХ є його здатність аналізувати не тільки однокомпонентні лікарські засоби а й багатокомпонентні. При багатокомпонентному аналізі дослідник підбирає умови та матеріали що сприяють хроматографуванню, тим самим забезпечуючи розподіл компонентів суміші.

Основні прилади та матеріали:

– пластинки із закріпленим шаром сорбенту (нерухомої фази) різних модифікацій (скляні, алюмінієві або пластикові пластини розміром 10x10, 15x15, 20x20 см²)

- хроматографічні камери;
- калібровані капіляри та мікрошприци;
- пристрої для нанесення на хроматограми реагентів, що виявляють (пульверизатори для обприскування, камери для занурення хроматограм в розчин та ін.);
- стандартні зразки, розчинники, реагенти для виявлення хроматографічних зон;
- системи обробки та зберігання даних

Алгоритм роботи з процесом хроматографування передбачає використання прямокутних або циліндричних скляних посудинах, при цьому вони мають бути у хроматографічних камерах, – це закритий посуд з герметично пришліфованою кришкою. Спочатку на дно такої камери наливають систему розчинників, і вже потім занурюють хроматографічну пластинку з нанесеними зразками.

Горизонтальне елюювання передбачає наявність в хроматографічна камера жолоба із спеціальним пристроєм, який використовується у рухомій фазі, а саме забезпечує перехід від нерухомої фази до рухомої.

Для нанесення розчинів застосовують мікропіпетки, мікрошприци, калібровані капіляри або інші пристрої.

1.6 Високоєфективна рідинна хроматографія

Наступний інструментальний метод аналізу – високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ).

ВЕРХ входить до переліку можливих варіантів рідинної хроматографії, в цьому випадку рухома фаза (елюент) – відбувається за рахунок сорбенту, який з великою швидкістю заповнює колонку за рахунок спеціального тиску на вході в колонку.

Поділ забезпечується за рахунок двох фаз – рухомої (елюент) та нерухомої, при тому дані фази не змішуються між собою. Відмінність у молекулярній масі, структурі та наявності відмінних функціональних груп надають барвникам різну адсорбційну активність по відношенню до стаціонарних фаз. Саме гідрофобні властивості барвника та наявність у структурі кислотних груп є головними характеристиками, які мають враховувати при підборі умов хроматографування. Найбільшу гідрофобність серед барвників мають саме азобарвники. Серед різноманіття видів ВЕРХ для визначення барвників найбільш розповсюдженими є обернено-фазова та іонна.

Нерухова фаза в обернено-фазовій системі за своїми властивостями є малополярною або неполярною взагалі, хоча рухлива фаза є сильно полярною (тетрагідрофуран, ацетонітрил, метанол, вода). Додавання неорганічних електролітів (найчастіше ацетат амонію) під час мобільної фази забезпечує поліпшення поділу та зменшення часу при аналізі.

Іон-парна хроматографія забезпечується шляхом додавання в мобільній фазі гідрофобних іонних речовин (четвертинний амонієвий катіон, алкіл- або арилсульфонієвий катіон). Як наслідок реакції зразка та елюента утворюються нейтральні іонні пари, обернено-фазова система при цьому сприяє їх поділу. В такому випадку гідроксидтетраметиламонію [Piro], хлорид до децилтриметиламонію застосовують як іон-парні реагенти.

Застосування такого методу як ВЕРХ передбачає врахування всіх кількісних співвідношень хроматографії. За умови використання однакових сорбентів і рухомих фаз величини утримання в ТШХ (R_f) наслідками можуть бути легкість перерахування у величині утримання у ВЕРХ. Отже, іноді у рухомій фазі ВЕРХ обирають використовувати ТШХ.

Якщо говорити про переваги методу ВЕРХ в порівнянні з іншими методами, можемо зазначити, що він є більш універсальним та об'єктивним. Адже, якщо порівняти ТШХ та ВЕРХ, то у другому методі ми можемо спостерігати вищу ефективність розділення, та можливість одержати кількісні результати в той час як ТШХ надає нам тільки напівкількісні. Наразі перевагу ВЕРХ як основного методу отримання кількісного визначення ми можемо спостерігати у фармакопеї США, також він активно використовується у Британській, Німецькій та інших Європейських країнах. І може сказати, що в перспективі саме такий метод аналізу може витіснити всі інші.

Єдиним відомим наразі недоліком ВЕРХ є необхідність використовувати дорогі стандартні зразки речовин-свідків, а це в свою чергу підвищує вартість такого аналізу.

1.6 Спектрофотометрія

Спектрофотометрія – це метод в основі якого лежить визначення спектра поглинання або вимірювання світлопоглинання за рахунок певної довжини хвилі, відповідної максимальному показнику кривої речовини, що досліджується. Результатами даного методу є показник поглинання речовинами монохроматичного випромінювання у видимій, УФ- і ІЧ-ділянках спектра.

Спектрофотометричний аналіз надає змогу виміряти концентрацію харчових добавок за рахунок оптичної щільності конкретної ділянки спектра розчину, який досліджують. Цей метод аналізу є дуже простим у використанні. Перевагою даного методу є те, що на дослідження кількості синтетичних барвників та хініну не впливають інші складові харчових продуктів, що знаходяться в розчині, наприклад вуглеводи. Але одним з недоліків спектрофотометричного аналізу є неможливість визначення окремих барвників, адже знаходячись в одному зразку, вони накладаються одне на одне у спектрі поглинання барвників у суміш. Тому було проведено не мало досліджень та присвячено робіт на тему визначення відразу кількох барвників, за умови їх спільної присутності. Як наслідок, було винайдено похідну спектрофотометрію, яка могла б забезпечити аналіз кількох барвників одночасно. Також цей метод програє, якщо справа стосується вимірювання смакоароматичної добавки хініну, тому в цьому випадку його використовують рідше.

Якщо потрібно дослідити не тільки забарвлені ай безбарвні, то краще підходить спектрофотометія, в порівнянні з фотоколориметричними визначеннями. Адже, аналіз здійснюється за рахунок УФ- або ІЧ-ділянок спектра.

Якщо під час фотоелектроколориметрів використовуються світлофільтри, застосування методу спектрофотометрії передбачає використання інших приладів – спеціальних оптичних приладів -

монохроматорів. Вони надають можливість безперервно змінювати довжину хвилі електромагнітного випромінювання, які проходять крізь розчин, що досліджується.

Спектрофотометричний аналізі та фотоколориметрія потребують створення оптимальних умов, за рахунок яких буде досягнуто певної точності та відтворюваності результатів. Наразі відносна помилка при використанні спектрофотометричних визначень індивідуальних речовин сягає не більше ніж 2%.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2. Розробка методик ідентифікації барвника Еритрозину в лікарських засобах у формах таблеток вкритих оболонкою та капсул методами ТШХ, ВЕРХ та спектрофотометричним методом.

Під час написання методики якісної ідентифікації барвника еритрозину були обрані лікарські препарати у різних лікарських формах та фармакотерапевтичних групах: тверді капсули та таблетки вкриті оболонкою. Головними факторами під час вибору вище вказаних лікарських засобів.

- ✓ наявність у складі барвника еритрозин;
- ✓ лікарські засоби у різних лікарських формах;
- ✓ різний склад діючих та допоміжних речовин у складі лікарських засобів;
- ✓ наявність даних лікарських препаратів аптечних закладах;
- ✓ доступна ціна лікарських препаратів.

Аналіз публікацій показує, що для визначення синтетичних барвників використовують різні фізико-хімічні методи. В основному для поділу і визначення багатоконпонентних сумішей барвників використовують хроматографічні методи. Зразки, що містять до 4-х барвників можна визначати спектрофотометричними методами або використовуючи похідні спектрофотометричні методи. В літературі з'явилися роботи по визначенню барвників за допомогою електрохімічних методів. Однак, незважаючи на величезну кількість існуючих підходів і методів по визначенню барвників, використання їх передбачає необхідність дорогого устаткування, тривалість проведення аналізів і використання їх в рутинних аналізах не виправдано. У зв'язку з цим є актуальним розробка досить простих і дешевих способів визначення барвників, одним з яких є метод ТШХ.

Кожен із обраних лікарських засобів у своєму складі, окрім еритрозину, має інші барвники. Таблетки Корвазан мають у своєму складі титану діоксид (Е 171), заліза оксид чорний (Е 172) та індигокармін (Е 132); таблетки

Анантаваті містять діамантовий синій FCF озеро (E133), оксид заліза червоний; капсули Грипостад С титану діоксид (E 171), хіноліновий жовтий (E 104). Основні характеристики даних лікарських засобів наведені в таблиці.

Таблиця 4. Характеристика ЛЗ вибраних для випробування.

Назва ЛЗ, лікарська форма	Склад	Фармако-терапевтична група	Показання до застосування	Побічні ефекти
Корвазан таблетки вкриті плівковою оболонкою	Діюча речовина: карведілол 12.5 мг допоміжні речовини: целюлоза мікрокристалічна; повідон; лактоза, моногідрат; крохмаль картопляний; тальк; кальцію стеарат; суміш для покриття «Opadry II Pink»*. * Суміш для покриття «Opadry II Pink» містить триацетин; гіпромелозу; лактози, моногідрат; титану діоксид (E 171), поліетиленгліколь, заліза оксид жовтий (E 172); заліза оксид чорний (E	Блокатори альфа- та бета- адренорецепторі в.	Есенціальна гіпертензія. Хронічна стабільна стенокардія. Хронічна серцева недостатність (додакове лікування).	Часто: бронхіт, пневмонія, інфекція верхнього відділу дихальних шляхів, інфекція сечовивідних шляхів, анемія, запаморочення, головний біль, депресія гіпотензія, нудота, діарея блювання та ін.

	172); еритрозин (Е 127); індигокармін (Е 132).			
Анантаваті таблетки вкриті плівковою оболонкою	Основні діючі речовини: трава бакопи Моньє (<i>Vasora monnieri</i>) – 100 mg (мг), корінь та листя вітанії снодійної (<i>Withania somnifera</i>) – 75 mg (мг), трава центелли азійської (<i>Centella asiatica</i>) – 75 mg (мг), корінь аїру (<i>Acorus calamus</i>) – 60 mg (мг), насіння древогубця волотистого (<i>Celastrus paniculatus</i>) – 50 mg (мг), трава в'юнку багатоплідного (<i>Convolvulus pluricaulis</i>) – 50 mg (мг), корінь марени серцелистої (<i>Rubia cordifolia</i>) – 30 mg (мг), корінь нарду індійського (<i>Nardostachys jatamansi</i>) – 10 mg (мг). Допоміжні речовини: антиспікаючий агент дикальцію фосфат,	Гомеопатичні, заспокійливої дії	Сприяє нормалізації функціонува ння нервової системи, зменшенню дратівливості , рівня тривожності, зменшенню стресу; покращує сон та настрій.	Не заявлені. Протипоказано дітям до 10 років, людям з індивідуальною чутливістю до компонентів, вагітним, та у період лактації.

	<p>глазуруючий агент полівінілпіролідон (PVP K-30), оболонка (гідроксипропілметилцел юлоза, титану діоксид, триетилцитрат, етилцелюлоза, діамантовий синій FCF озеро (E133), еритрозин озеро (E127), оксид заліза червоний, поліетиленгліколь, тальк), антиспікаючий агент тальк, стабілізатор крохмаль кукурудзяний, консервант бензоат натрію (E211).</p>			
<p>Грипостад С капсули тверді</p>	<p>діючі речовини: 1 капсула містить парацетамолу 200 мг; аскорбінової кислоти 150 мг; кофеїну 25 мг; хлорфенаміну малеату 2,5 мг;</p> <p>допоміжні речовини: лактоза, моногідрат; желатин; гліцерину тристеарат; титану діоксид (E 171);</p>	<p>Парацетамол, комбінації без психолептиків.</p>	<p>Для полегшення симптомів застиуди.</p>	<p>тахікардія, задишка, анемія, гемолітична анемія, тромбоцитопенія, гіпоглікемія, анафілаксія, реакції гіперчутливості, шкірний свербіж, висип на шкірі і слизових</p>

хіноліновий жовтий (E 104); еритрозин (E 127).			оболонках, запаморочення, психомоторне збудження і порушення орієнтації, дискінезія, та ін.
--	--	--	---

2.1. Розробка методики ідентифікації барвника Еритрозин методом тонкошарової хроматографії та визначення можливості використання даної методики для різних лікарських засобів, до складу яких входить даний барвник.

При розробці методики ідентифікації обраного нами барвника ми звертали увагу на її ефективність ідентифікації та визначення синтетичних харчових барвників. Нами було обрано тонкошарову хроматографію (ТШХ), адже вона має низку переваг в порівнянні з іншими методами.

Також, даний метод не потребує особливого обладнання чи дорогого устаткування, або надскладних вимог його проведення. В то же час, він надає змогу дослідити не тільки однокомпонентні, а й багатоконпонентні лікарські засоби. Таким чином, надаючи можливість перевірити лікарські засоби на справжність, наявність сторонніх домішок напівкількісним та кількісним методом за достатньо короткий проміжок часу.

Отже, можемо зазначити, що метод ТШХ – надає швидку та якісну оцінку зразків на вміст синтетичних барвників, при тому він є доступним та простим у застосуванні.

Для розробки методики враховували проаналізовані результати, що наведені в літературних даних, відносно найчастіше застосованих реактивів для рухомої фази та розчинника, сорбенту пластинки для ТШХ, способу

нанесення та виявлення плям і інтерпретацію результатів. Для створення методики дотримувались загальних принципів та рекомендацій, наведеними в ДФУ, розділ 2.2.27.

В результаті аналізу літературних даних встановлено, що найчастіше в якості нерухомої фази використовують силікагелеві і поліамідні пластини, тому для випробування було обрано пластинки:

- TLC Silica gel 60 F254 Aluminium
- TLC Silica gel 60 F2s4 Glass
- TLC Cellulose F Glass
- DC-Fertigfolien Alugram Sil G/UV 234 Aluminium

Враховуючи фізико-хімічні властивості барвника *Еритрозин*, його розчинність, полярність, термостабільність та здатність до сорбції вибрали для випробування наступні реактиви: розчин аміаку, воду, етанол, бутанол, В процесі експерименту підбирали співвідношення компонентів рухомої фази для ТШХ н-бутанол - етанол - аміак - вода (10:5:2:2) таким чином, щоб досягти необхідної (коректної) величини коефіцієнту утримування (R_f) плям (від 0,2 до 0,8).

Зразки розчиняли в підхожих розчинниках (вода, метанол) із наступним фільтруванням через мембранні фільтри з розміром пор 0,45 мкм або центрифугуванням. Оцінювали переваги застосування центрифугування у порівнянні з фільтруванням, для запобігання сорбції барвника на фільтрі та, відповідно, його частковою втратою. Також, в роботі використовували твердофазну екстракцію з використанням картриджа «Discovery DSC-PH» (52727-U, Supelco). Сорбція та екстракція є одними з основних методів виділення барвників зі складних матриць. Після твердофазної екстракції барвник десорбували і визначали в розчині методом ТШХ.

В роботі використовували наступне обладнання: термостат для активації пластинок, центрифуга, шейкер, рН-метр, ваги для зважування зразків з

точністю $\pm 0,0001$ г та допоміжне устаткування: мікросприци для нанесення розчинів, хроматографічну камеру, мембранні фільтри.

2.1.1 Результати підбору параметрів тонкошарової хроматографії та методики приготування випробовуваних та стандартного розчинів.

Виготовлення розчинів:

Розчин порівняння: 1,2 мг барвника еритрозину поміщають в мірну колбу місткістю 50 мл, додають 30 мл спирту етилового 70 %, перемішують до розчинення і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки та перемішують

Корвазан таблетки, в/плів. обол. по 12.5 г

Випробовуваний розчин:

Знімають оболонку з 2 таблеток, додають 5,0 мл спирту етилового 70 %, витримують на УЗ-бані до розчинення оболонки і центрифугують 6 000 об/хв протягом 10 хв. В якості випробовуваного розчину використовують надосадову рідину.

Анантаваті таблетки, в/плів. обол.

Випробовуваний розчин:

Знімають оболонку з 2 таблеток, додають 5,0 мл спирту етилового 70 %, витримують на УЗ-бані до розчинення оболонки і центрифугують 6 000 об/хв протягом 10 хв. 1,0 мл надосадової рідини поміщають в мірну колбу місткістю 10 мл і доводять спиртом етиловим 70 % до мітки, перемішують.

Гриппостад С капсули тверді No10

Випробовуваний розчин:

До корпусу 4 капсул (жовтий колір) додають 5,0 мл спирту етилового 70 %, обережно нагрівають до розчинення капсули, охолоджують і центрифугують

6 000 об/хв протягом 10 хв. В якості випробовуваного розчину використовують надосадову рідину.

Підготовка оладнання:

Пластинка : - TLC Silica gel 60 F254 Aluminium

- TLC Silica gel 60 F2s4 Glass
- TLC Cellulose F Glass

Рухома фаза: -бутанол - етанол - аміак - вода (10:5:2:2), камера насичена 1 годину Обем проби, що наноситься: по 20 мкл кожного із розчинів Відстань, що має пройти рухома фаза: 10 см Виявлення: переглядають в видимому світлі

Пластинка : DC-Fertigfolien Alugram Sil G/UV 234 Aluminium

Рухома фаза: н-бутанол - вода - аміак - етанол (100:44:1:22,5), камера ненасичена Обем проби, що наноситься: по 30 мкл кожного із розчинів Відстань, що має пройти рухома фаза: 10 см Виявлення: переглядають в видимому світлі

Для нанесення на пластинку використовують випробовувані розчини, приготування яких описано вище.

Хроматограми зображені у додатках 1, 2, 3 та 4.

Короткий опис результатів:

Випробуваний розчин Корвазану показав найкращий результат, на всіх пластинках була виявлена чітка червона пляма тотожна з плямою розчину порівняння.

Випробуваний розчин Анантаваті показав схожий результат з попереднім зразком, але під час дослідження був виявлений ще один барвник Діамантовий синій (E133), на всіх пластинках з'явилась чітка синя пляма, варто зазначити що сам випробуваний розчин мав фіолетове забарвлення.

Випробуваний розчин Грипостату С не показав чіткого результату при дослідженні, на жодній пластинці це було виявлено чіткої плями червоного кольору, натомість ми побачили бліду жовту переривчасту смугу (вірогідно сліди Хінолінового жовтого (Е 104)). Виходячи з даного результату констатуємо що метод ТШХ не є придатним для якісної ідентифікації барвника Еритрозину в капсулах Грипостат С.

Хроматограми представлені у додатках 1, 2, 3, 4.

2.2 Розробка методики ідентифікації барвника Еритрозин методом високоефективної рідинної хроматографії та визначення можливості використання даної методики для різних лікарських засобів, до складу яких входить даний барвник.

Завдяки методу високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) стає можливим розділити суміш синтетичних барвників. За рахунок використання двох різних фаз - рухомої (елюент) і нерухомої - відбувається різний поділ компонентів. Для визначення барвників найрозповсюдженішими є використання двох видів ВЕРХ - обернено-фазову та іонну.

Застосування методу ВЕРХ забезпечує проведення точних досліджень. Адже, якщо будуть дотримані всі технологічні характеристики, результати досліджень матимуть високий рівень автентичності, як наслідок, змога отримати результати на рівні міжнародних стандартів.

У порівнянні з методами ТШХ і спектрофотометрії, метод ВЕРХ вимагає більш дорогого устаткування і має більш високі вимоги до якості очищення аналітичної проби. Але поряд з цим, він спрощує ідентифікацію аналізованих речовин (особливо при використанні детекторів – УФ, з діодною матрицею і мас-детектора) і визначення їх кількісного вмісту.

У фармацевтичній галузі саме цей метод аналізує успішно займає перші позиції серед інших методів в багатьох країнах. Тому що надає змогу якісного виявлення та кількісного визначення різних сполук в обраному продукті дослідження.

Виходячи з того що для дослідження були обрані різні ЛЗ, що знаходяться в різних лікарських формах і містять певну кількість діючих та допоміжних речовин, було вирішено скористатись методом ВЕРХ для більш точного та якісного результату. Також ключовими факторами вибору даного методу стали його високі селективність та чутливість, що дозволить отримати

точні результати навіть при умові що кількість даного барвника буде мінімальною.

Під час створення цієї методики у даних лікарських засобах було використано традиційний метод обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії.

Для нашого дослідження ми обрали аналітичну систему «Agilent 1200», яка оснащена чотирьохканальним градієнтним насосом. Була використана наступна рухома фаза: суміш 10 mM розчин амонію ацетату : ацетонітрил : метанол у співвідношенні (50 : 25 : 25 об/об). Доводять рН розчину до 8,0 за допомогою 10 % розчину амонію гідроксиду, завдяки цьому ми досягли необхідного часу утримування еритрозину. Рухома фаза сформувалась поєднанням компонентів у двох каналах подачі фаз.

Швидкість рухомої фази 1,0 мл/хв. Детектування проводилось на діодно-матричному детекторі довжиною хвилі 529 нм, оскільки за даної довжини хвилі досягається необхідне поглинання барвника в УФ-області. Температура колонки термостату 30 °C.

2.2.1 Перевірка придатності хроматографічної системи та результати ідентифікації барвника еритрозин методом ВЕРХ

Для того щоб обратна нами система ідентифікації була придатною до використання, вона має відповідати певним вимогам ДФУ (Розділ 2.2.46), а саме:

- коефіцієнт симетрії, розрахований для піку еритрозину із хроматограм розчину порівняння має бути від 0.8 до 1.5;
- відносне стандартне відхилення (RSD) площ піку досліджуваного барвника еритрозину має бути не більше 1%.

В результаті дослідження ми отримали точні значення хроматограм розчинів порівняння, які відповідають вимогам. Після того як ми впевнились, що

система придатна до ідентифікації барвника, нам необхідно було інжектувати випробовувані розчини та здійснити оцінку результатів дослідження.

Згідно з настановами ДФУ (Розділ 2.2.46) на хроматограмі випробовуваного розчину час утримування піку досліджуваного барвника має співпадати з часом утримування піку на хроматограмі розчину порівняння з точністю $\pm 2\%$. Хроматограми випробовуваних розчинів та розчину стандарту зображені в Додатках 6, 7, 8, 9.

Отже, виходячи з результатів дослідження, можна констатувати те, що час утримування піку барвника еритрозину на хроматограмах всіх випробовуваних розчинів співпадає з часом утримування даного піку на хроматограмі розчину порівняння з високою точністю, а саме $\pm 2\%$. Дивлячись на це, можна зробити висновок, що розроблена нами методика ВЕРХ є придатною для ідентифікації барвника еритрозину в обраних лікарських засобах.

Умови хроматографування:

Колонка – Gemini C18, 150 x 4.6 mm, 5 μ m

Швидкість рухомої фази – 1,0 мл/хв

Детектування за довжини хвилі – 529 нм

Об'єм інжекції – 20 мкл

Температура термостату колонки – 30 °C

Рухома фаза – суміш 10 mM розчин амонію ацетату : ацетонітрил : метанол у співвідношенні (50 : 25 : 25 об/об). Доводять рН розчину до 8,0 за допомогою 10 % розчину амонію гідроксиду.

Розчин порівняння: 1,2 мг барвника еритрозину поміщають в мірну колбу місткістю 50 мл, додають 30 мл спирту етилового 70 %, перемішують до

розчинення і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки та перемішують.

5,0 мл одержаного розчину поміщають в мірну колбу місткістю 10 мл, доводять водою до позначки та перемішують.

Корвазан таблетки, в/плів. обол. по 12.5 г

Випробовуваний розчин:

Знімають оболонку з 2 таблеток, додають 5,0 мл спирту етилового 70 %, витримують на УЗ-бані до розчинення оболонки і центрифугують 6000 об/хв протягом 10 хв. В якості випробовуваного розчину використовують надосадову рідину.

2,5 мл одержаного розчину поміщають в мірну колбу місткістю 5 мл, доводять водою до позначки та перемішують.

Анантаваті таблетки, в/плів. обол.

Випробовуваний розчин:

Знімають оболонку з 2 таблеток, додають 5,0 мл спирту етилового 70 %, витримують на УЗ-бані до розчинення оболонки і центрифугують 6 000 об/хв протягом 10 хв. 1,0 мл надосадової рідини поміщають в мірну колбу місткістю 10 мл і доводять спиртом етиловим 70 % до мітки, перемішують.

5,0 мл одержаного розчину поміщають в мірну колбу місткістю 10 мл, доводять водою до позначки та перемішують.

Гриппостад С капсули тверді №10

Випробовуваний розчин:

До корпусу 4 капсул (жовтий колір) додають 5,0 мл спирту етилового 70 %, обережно нагрівають до розчинення капсули, охолоджують і центрифугують 6 000 об/хв протягом 10 хв. В якості випробовуваного розчину використовують надосадову рідину.

2,5 мл одержаного розчину поміщають в мірну колбу місткістю 5 мл, доводять водою до позначки та перемішують.

2.3 Розробка методики ідентифікації барвника Еритрозин методом спектрофотометрії та визначення можливості використання даної методики для різних лікарських засобів, до складу яких входить даний барвник.

Спектрофотометрія – фотометричний метод аналізу, який базується на визначенні спектру поглинання падаючого світла, при певній довжині хвилі досліджуваного розчину, за допомогою спектрофотометра.

Даний метод ідентифікування заснований на вимірюванні спектру поглинання в трьох різних областях: в УФ (200-400нм), видимій (400-760нм) та ІЧ (>760нм).

Метод спектрофотометрії застосовують для дослідження складу та будови хімічних речовин, а також для ідентифікації певних сполук, в нашому випадку барвника.

Криву залежності світлопоглинання від довжини падаючого світла називають спектром поглинання. Вона є специфічною характеристикою для кожної речовини.

На практиці даний спектр, який відображає на графіку залежність між величиною поглинання та довжиною хвилі, можна виміряти, якщо помістити досліджувану речовину на шляху променя світла, яка буде поглинати промені певних довжин.

Коли пучок світла одного кольору (монохромне) з інтенсивністю I_0 крізь кольоровий розчин, певна частина світла (I_r) відбивається від неї, а інша (I_a) - поглинається ним, та решта (I_t) просто проходить крізь даний розчин:
$$I_0 = I_r + I_a + I_t.$$

Величину I_r можна не брати до уваги, так як під час досліду використовують розчини з однаковою товщиною шару. Через це формула набуває даного вигляду: $I_0 = I_a + I_t.$

Тож, виходячи з вище зазначеної інформації можна констатувати те що потік світла під час проходження крізь досліджуваний розчин втрачає певну частину своєї інтенсивності.

Також не зайвим буде зазначити, що метод спектрофотометричного аналізу є доволі простим та не потребує знаних витрат у використанні.

Перевагою даного методу є висока точність результатів, навіть якщо досліджуваний зразок містить один або декілька барвників, при умові що вони не будуть перекривати один одного.

Опираючись на те що барвники по своїй хімічній природі інтенсивно поглинають світло у видимій ділянці спектру, ми з впевненістю використовували метод спектрофотометрії у нашій роботі.

Виготовлення розчинів:

Розчин порівняння: 1,2 мг барвника еритрозину поміщають в мірну колбу місткістю 50 мл, додають 30 мл спирту етилового 70 %, перемішують до розчинення і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки та перемішують

Корвазан таблетки, в/плів. обол. по 12.5 г

Випробовуваний розчин:

Знімають оболонку з 2 таблеток, додають 5,0 мл спирту етилового 70 %, витримують на УЗ-бані до розчинення оболонки і центрифугують 6 000 об/хв протягом 10 хв. В якості випробовуваного розчину використовують надосадову рідину.

Анантаваті таблетки, в/плів. обол.

Випробовуваний розчин:

Знімають оболонку з 2 таблеток, додають 5,0 мл спирту етилового 70 %, витримують на УЗ-бані до розчинення оболонки і центрифугують 6 000 об/хв

протягом 10 хв. 1,0 мл надосадової рідини поміщають в мірну колбу місткістю 10 мл і доводять спиртом етиловим 70 % до мітки, перемішують.

Грипостад С капсули тверді No10

Випробовуваний розчин:

До корпусу 4 капсул (жовтий колір) додають 5,0 мл спирту етилового 70 %, обережно нагрівають до розчинення капсули, охолоджують і центрифугують 6 000 об/хв протягом 10 хв. В якості випробовуваного розчину використовують надосадову рідину.

Використовуючи спектрофотометр ми отримали УФ-спектри стандартного та випробовуваних розчинів. Ми використовували воду очищену для створення компенсаційного розчину, та отримали хвилі в діапазоні 500-550нм в кюветі з шаром товщиною 10нм. Порівнювали максимуми поглинання стандартного розчину та випробовуваних зразків.

Короткий опис результатів:

Після проведених досліджень ми прийшли до висновку що метод спектрофотометрії є придатним для ідентифікації еритрозину в таблетках Анантаваті та Корвазан і не є доцільним для ідентифікації барвника в капсулах Грипостад С, через малу концентрацію речовини в досліджуваному розчині.

Спектри викладені в додатку 5.

ВИСНОВКИ

1. Відповідно до зазначеної мети даної дипломної роботи були розглянуті та опрацьовані літературні джерела. Згідно з інформацією наявною в джерелах був проведений аналіз фізико-хімічних властивостей барвника Еритрозин, методів його отримання, ідентифікації, вплив на організм людини, та сфери використання.
2. Також використовуючи надану інформацію були підібрані та обґрунтовані методи якісного та кількісного аналізу. При написанні роботи були використані методи ТШХ, ВЕРХ та спектрофотометрії.
3. Вперше були розроблені методики ідентифікації барвника Еритрозин у лікарських засобах у формах таблетки вкриті оболонкою та тверді капсули. Також визначили вплив наявних в лікарських формах допоміжних речовин на чистоту результатів.
4. За результатами дослідження доведено, що метод ТШХ придатний для якісної ідентифікації барвника Еритроzinу та може використовуватись для випробувань готових ЛЗ «Корвазан» та «Анантаваті». При цьому метод не придатний для ідентифікації барвника Еритрозин в ЛЗ «Грипостад С», через те що в складі капсули присутні допоміжні речовини що не дають виділити барвник.
5. За результатами дослідження доведено, що метод спектрофотометрії придатний для якісної ідентифікації барвника Еритроzinу та може використовуватись для випробувань готових ЛЗ «Корвазан» та «Анантаваті». При цьому метод не придатний для ідентифікації барвника Еритрозин в ЛЗ «Грипостад С», через те що в складі капсули присутні допоміжні речовини що не дають визначити спектр барвника у ЛЗ.
6. Розроблена методика ідентифікація барвника Еритрозин методом ВЕРХ придатна для якісного аналізу досліджуваних зразків, всі три зразки показали позитивний результат.

7. Отримані результати досліджень вказують на перспективність застосування хроматографічного методу аналізу, а саме ВЕРХ, для розробки методик ідентифікації барвників в лікарських засобах.
8. Встановлено, що незважаючи на більш високу вартість та тривалість аналізу, використання методу ВЕРХ має суттєві переваги у порівнянні з методом ТШХ та спектрофотометрії .

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Безуглий П.О. Фармацевтична хімія. : Підручник для вищих фарм. навч. закладів III – IV рівнів акредит./ за заг. ред.. проф. Безуглого П.О. – Вінниця : Нова Книга, 2017. – 456 с.
2. Влияние красителей на организм, органическая замена, 2019. URL:<https://miltex.by/articles/health-lifestyle/dyes-impact/> (дата звернення: 09.02.2022).
3. Берест Г.Г. Фармацевтичний аналіз лікарських засобів. : Навч- метод. посібник для ВНЗ. – Запоріжжя: Запорізький ДМУ, 2016. – 88 ст.
4. Директива Ради 78/25/ЄЕС від 12 грудня 1977 року. URL: https://ec.europa.eu/health/system/files/2016-11/dir_1978_25_en_0.pdf (дата звернення: 08.02.2022)
5. Директива Європейського Парламенту та Ради 94/36/ЄС від 30 червня 1994 року. URL: https://www.fsai.ie/uploadedFiles/European Parliament and Council Directive 94_36_EC.pdf (дата звернення: 08.02.2022)
6. Дубенська Л.О., Дмухайло А.В., Творинська С.І., Ридчук П.В., Дубенська Л.В. Синтетичні харчові барвники – деякі аспекти використання та методи визначення. *Methods and objects of chemical analysis*, 2020, Vol. 15, № 1. С. 5–20
7. Загальні відомості про харчові добавки, 2021. URL:<https://foodtechnologies.dp.ua/wp-content/uploads/2021/03/Конспект-лекцій-з-дисципліни-Харчові-та-дієтичні-добавки.pdf> (дата звернення: 07.02.2022)
8. Болотов В.В. Аналітична хімія. Якісний та кількісний аналіз.: Навч. конспект лекцій. / Болотов В.В., Свечнікова О.М., Голік М.Ю. / за редакцією проф. В.В. Болотова. – Вінниця : Нова Книга, 2011. – 424 с.

9. 7. Васькевич Алла Іржіївна. Методи розділення та ідентифікації сполук. / Програма навч. дисципліни : КПІ, хіміко-технологічний факультет/. Васькевич А.І., Прокопенко В.А. – Київ, 2015. – 15 с.
- 10.Вінюкова Г.М. Хімія барвників. М., Хімія 1979.
- 11.9. Vierordt K. Die Anwendung des Spectralapparates zur Photometrie der Absorptionsspectren und zur quantitativen chemischen Analyse. Tubingen. —1873. —170 s.
- 12.10. Guiochon G. Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. / Publication : PubMed., 2007. – 13 p 11. Тулюпа Ф.М., Панченко І.С. Аналітична хімія. – Дніпропетровськ: ВПК УДХТУ, 2002. – 657 с.
- 13.Курта С.А. Органічна хімія, 2021. URL: <https://kc.pnu.edu.ua/wp-content/uploads/sites/11/2021/02/Organic-chemistryLecture-№21.pdf> (дата звернення: 06.02.2022)
- 14.Липских О.В. Вольтамперометрическое определение синтетических красителей в пищевых продуктах на углеродсодержащем модифицированном электроде: диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук: 02.00.02 аналитическая химия. Национальный исследовательский Томский политехнический университет Томск, 2017.
- 15.125 с.
- 16.Державна Фармакопея України 2-е вид. — Харків. 2015 р.(86 .)
- 17.12. Державна Фармакопея України 2-ге видання, доповнення 3 від 20.06.2018 (с.42)
- 18.13. Журнал *MedExpress* “Що треба знати про харчові барвники” видання від 08.03.2019.
- 19.14. Золотов Ю.А. Аналітична хімія. Проблеми та підходи. Т1, Т2: Навч. посібник для ВНЗ. / за ред.. Р.Кельнер, Ж.М.Мерме, М.Отто. – Москва: «АСТ», 2014. – 608 с.

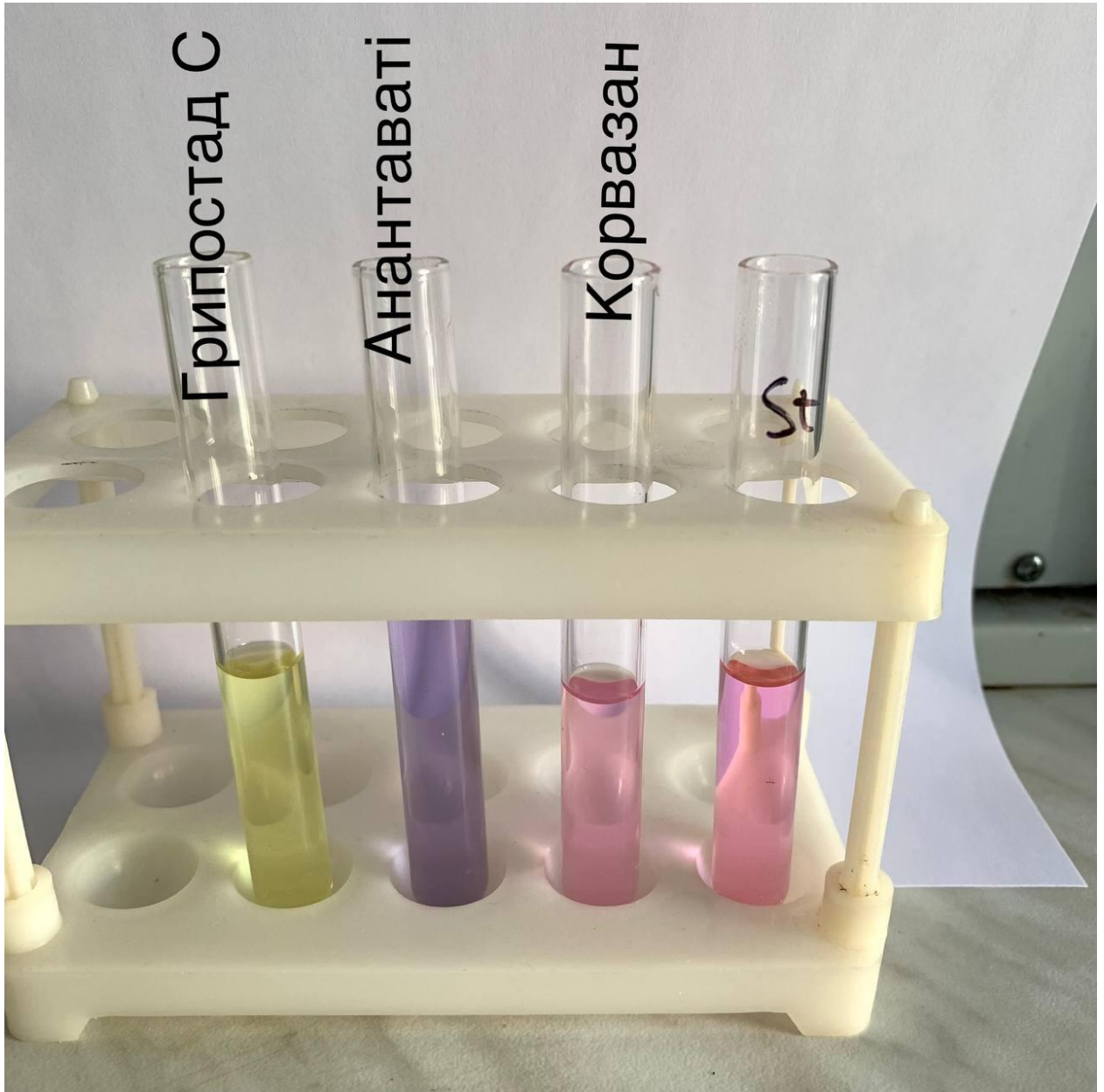
20. Про затвердження переліків допоміжних речовин та барвників, дозволених для застосування у виробництві лікарських засобів, що (лікарські засоби) реєструються в Україні та виготовляються в аптечних умовах за рецептами лікарів і замовленнями лікувально-профілактичних закладів: Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 15.01.2003 р. № 8. Дата оновлення: 29.07.2005. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0715-96#Text> (дата звернення: 06.02.2022)
21. Про затвердження Порядку проведення експертизи реєстраційних матеріалів на лікарські засоби, що подаються на державну реєстрацію (перереєстрацію), а також експертизи матеріалів щодо внесення змін до реєстраційних матеріалів протягом дії реєстраційного посвідчення: Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 25.09.2005 р. № 426. Дата оновлення: 10.11.2020. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z1069-05#Text> (дата звернення: 06.02.2022)
22. Про затвердження Санітарних правил і норм по застосуванню харчових добавок: Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 23.07.1996 р. № 426. Дата оновлення: 15.09.1998. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0715-96#Text> (дата звернення: 09.02.2022)
23. Про основні принципи та вимоги до безпечності та якості харчових продуктів: Закон України від 23.12.1997 р. № 771/97-В. Дата оновлення: 21.03.2021. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/771/97-вр#Text> (дата звернення: 09.02.2022)
- 24.36. Юинг Г. Инструментальные методы химического анализа. — М., 1989.
- 25.34. Фармацевтичні та медико-біологічні аспекти ліків / І.М. Перцев, О.Х. Пімінов, М.М. Слободянюк та ін. — Вінниця, 2007.

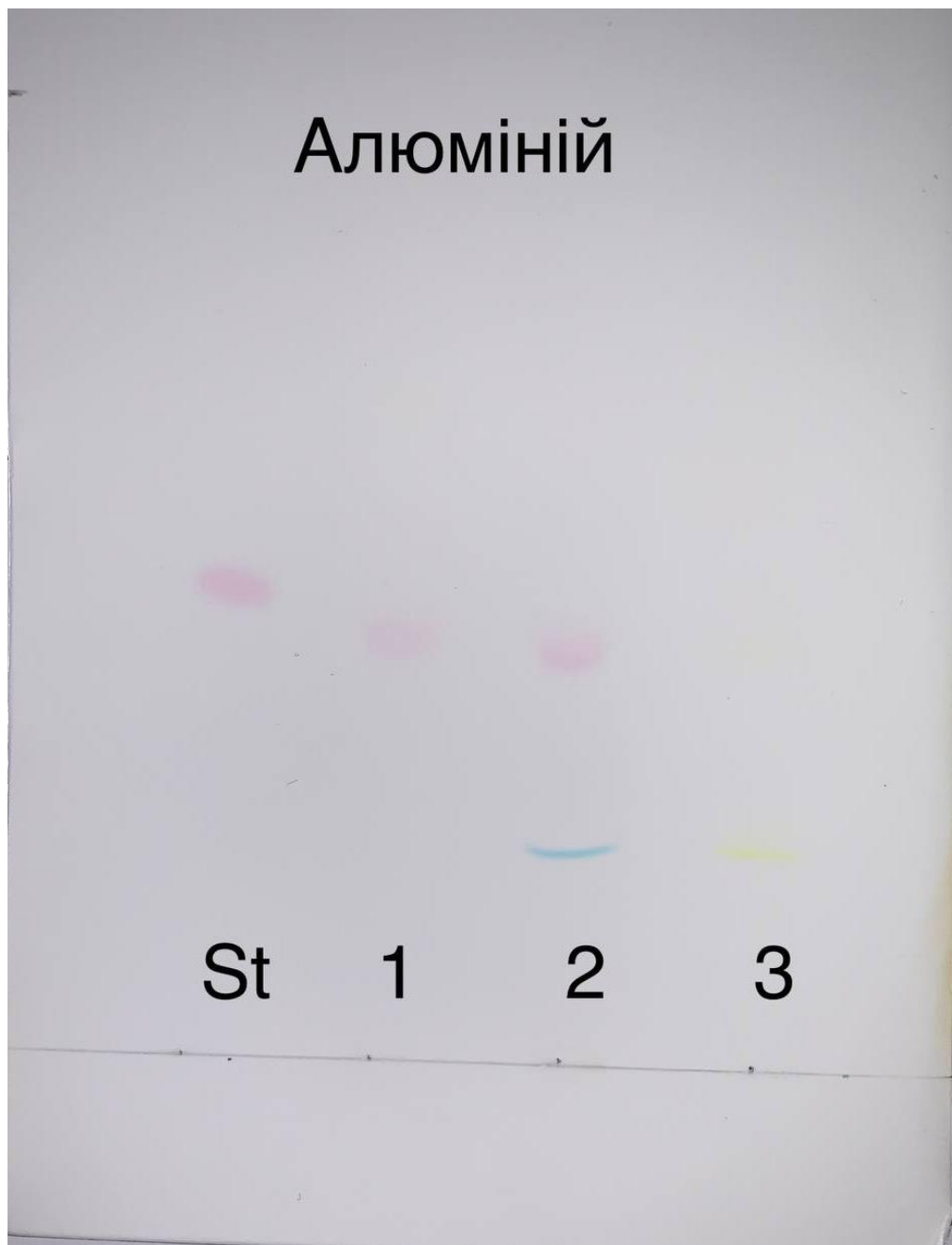
26. Yamjala, K.; Nainar, M.; Ramiseti, N. Methods for the analysis of azo dyes employed in food industry. A review. *Food Chem*, 2016. № 192. PP. 813–824.
27. Zollinger, H. Color chemistry: synthesis, properties and applications. Тулюпа Ф.М., Панченко І.С. Аналітична хімія. – Дніпропетровськ: ВПК УДХТУ, 2002. – 657 с.
28. Степанов Б.І. Введення в хімію й технологію органічних барвників. М., Хімія 1977.
29. Pirok B.J., Knip J., Schoenmakers P.J. Characterization of synthetic dyes by comprehensive two-dimensional liquid chromatography combining ion-exchange chromatography and fast ion-pair reversed-phase chromatography, 2016. Vol. 1436. PP. 141–146.
30. Українська радянська енциклопедія : [у 12-ти т.] / гол. ред. М. П. Бажан ; редкол.: О. К. Антонов та ін. -- 2-ге вид. -- К. : Головна редакція УРЕ, 1974-1985.
31. Schwack W., Pellissier E., Morlock G. Analysis of unauthorized Sudan dyes in food by high-performance thin-layer chromatography. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2018. № 410. PP. 5641–5651.
32. Stochelski M.A., Arnold L.E., Galland L. Mechanisms of behavioral, atopic, and other reactions to artificial food colors in children. *Nutr. Rev*, 2013. № 71. PP, 268-281.
33. Фармацевтичні та медико-біологічні аспекти ліків / І.М. Перцев, О.Х. Пімінов, М.М. Слободянюк та ін. — Вінниця, 2007.
34. Федущак Н.К. Аналітична хімія. Основи теорії та практики. : Навч. посіб. для ВНЗ напрямку «Фармація» та «Біотехнологія» / Федущак Н.К.,

- Бідниченко Ю.І., Крамаренко С.Ю., Калібабчук В.О.; - Вінниця : Нова Книга, 2012. – 640 с.
- 35.19. Мінаєва В.О. Хроматографічний аналіз.: Навч. посіб для ВНЗ.- Черкаси: Вид.від ЧНУ ім..Б.Хмельницького,2013 р. – 284 с
- 36.Належні практики у фармації.: Практикум для фарм. факультетів
- 37.Автори: Гудзь Н. І., Калинюк Т. Г(с.74-75).
- 38.Ластухін Ю.О. Харчові добавки. Е-коди. Будова. Одержання. Властивості. Навч. посібник.- Львів: Центр Європи, 2009. - 836 с.
- 39.17. Лисенко О.М. Вступ до хроматографічного аналізу./ Лисенко О.М., Набиванець Б.Й. - Київ: Корвін-прес, 2005. – 256 с.

ДОДАТКИ

Додаток 1. Випробувані розчини.





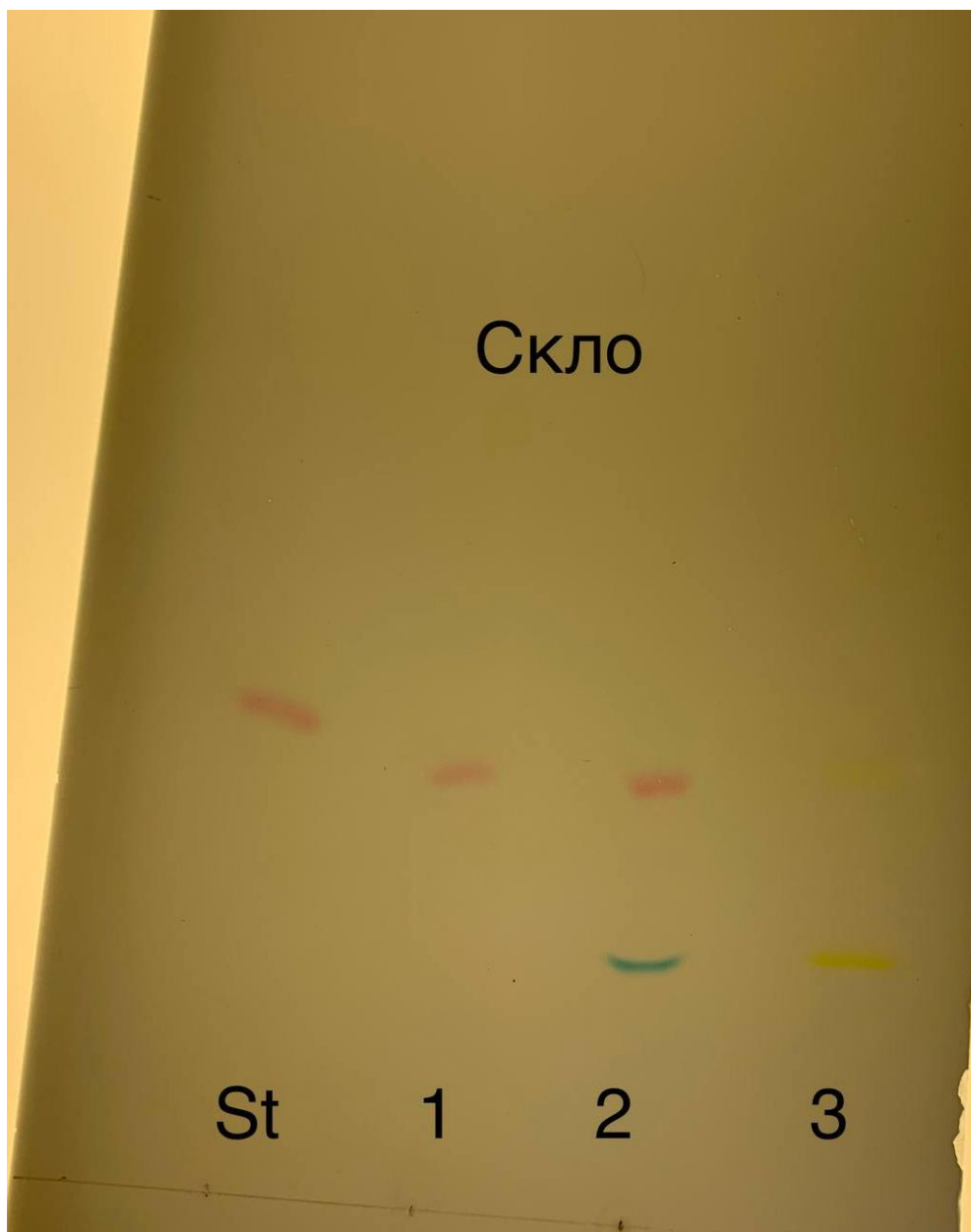
St — стандартний розчин еритрозины.

1. Розчин Корвазан

2. Розчин Анантаваті

3. Розчин Грипостад С

Додаток 3. Пластинка TLC Silica gel 60 F2s4 Glass



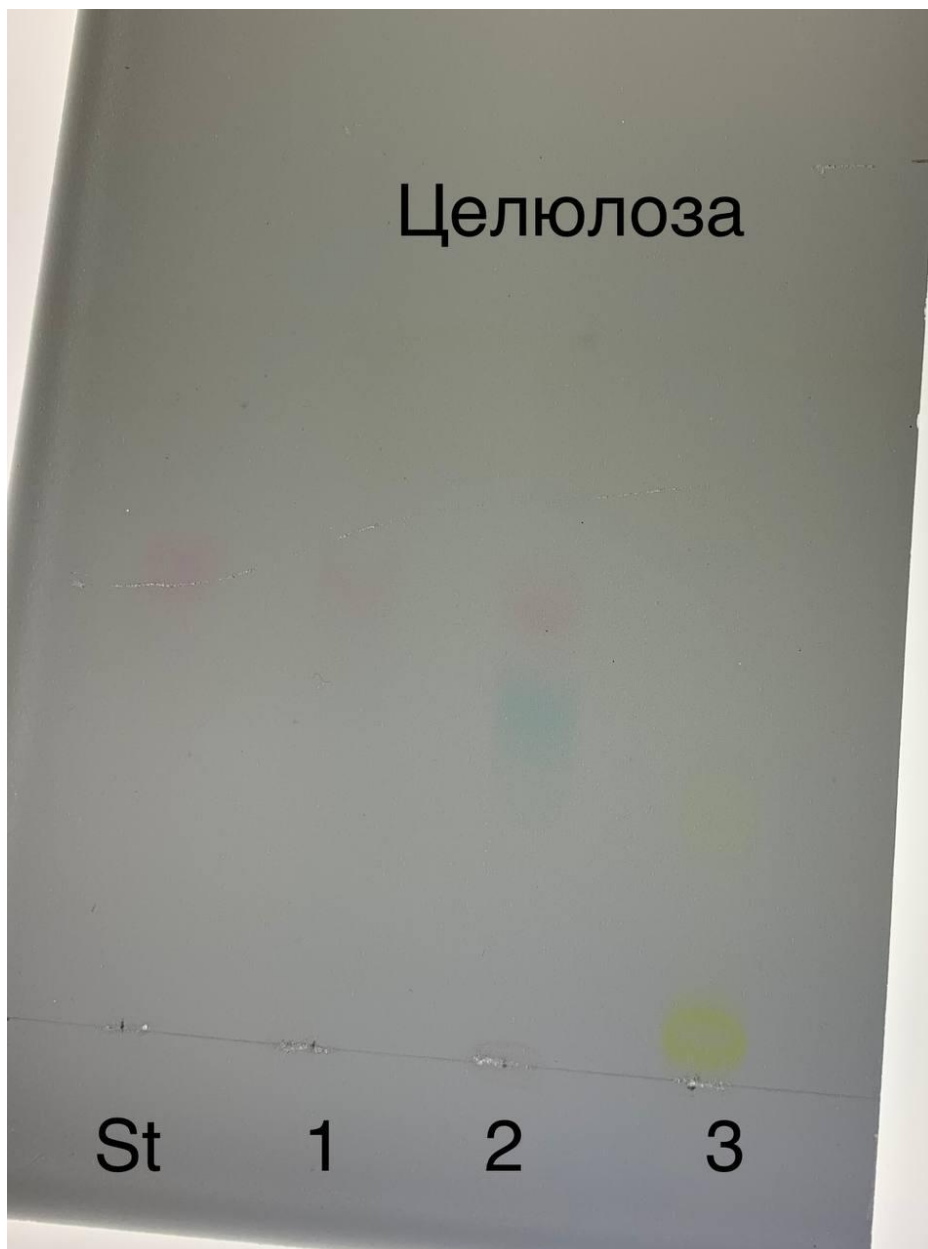
St — стандартний розчин еритрозину.

1. Розчин Корвазан

2. Розчин Анантаваті

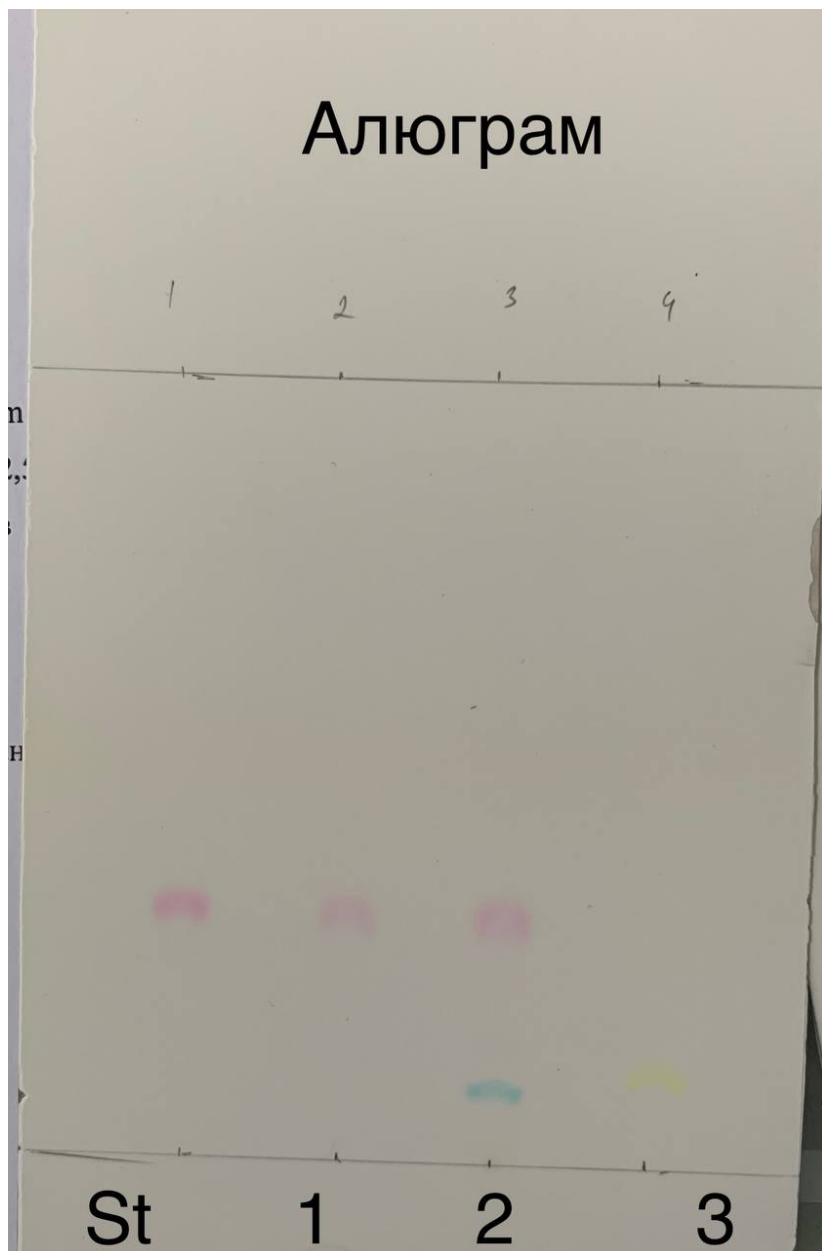
3. Розчин Грипостад С

Додаток 4. Пластинка TLC Cellulose F Glass



St — стандартний розчин еритрозину.

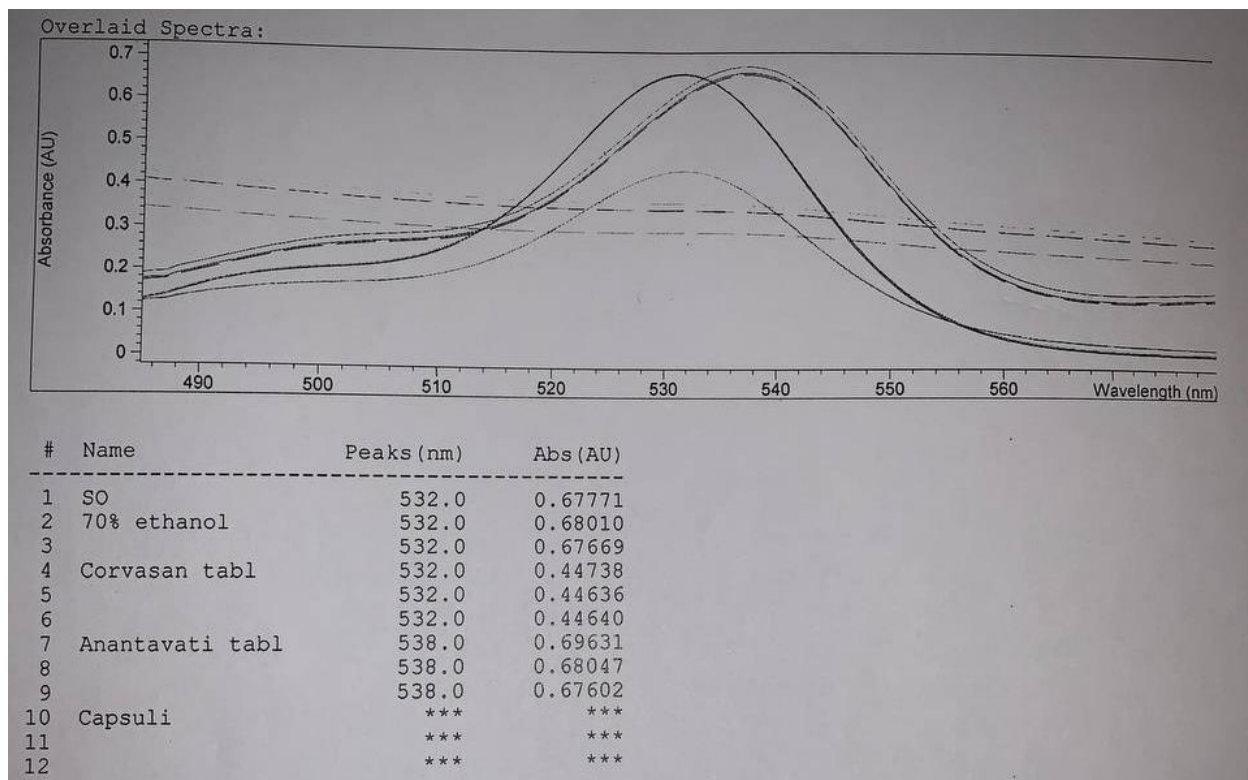
1. Розчин Корвазан
2. Розчин Анантаваті
3. Розчин Грипостад С



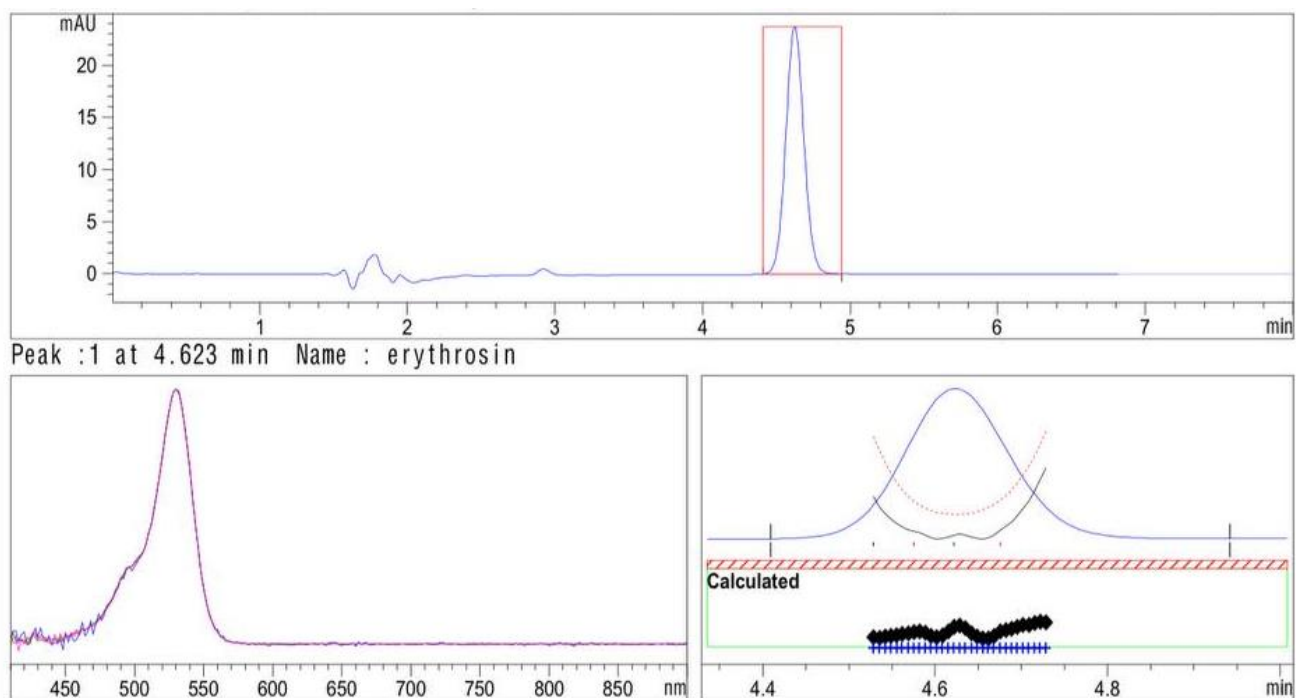
St — стандартний розчин еритрозину.

1. Розчин Корвазан
2. Розчин Анантаваті
3. Розчин Грипостад С

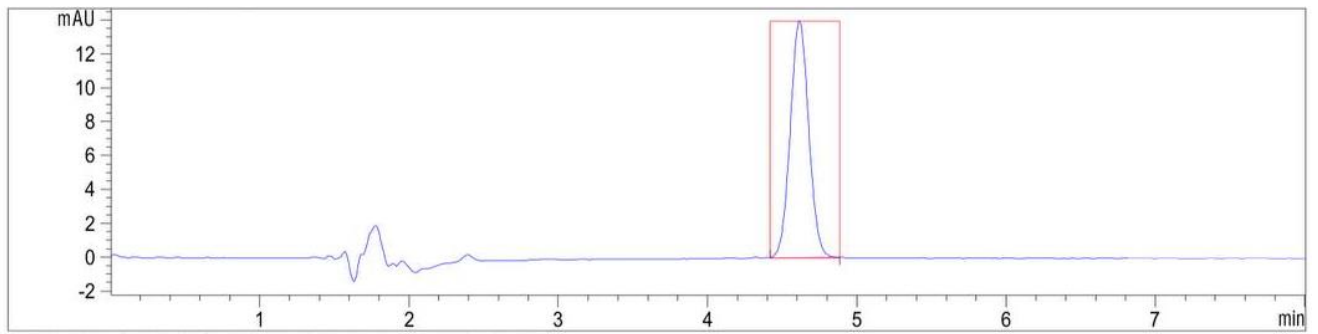
Додаток 5. Спектри.



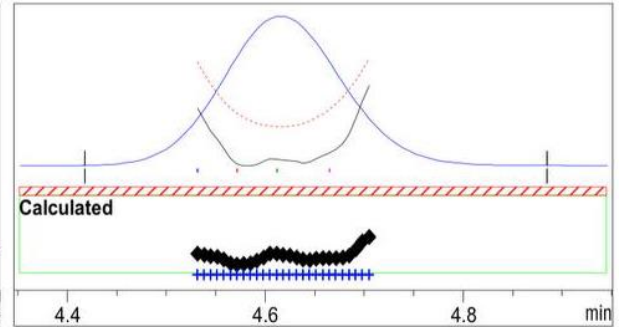
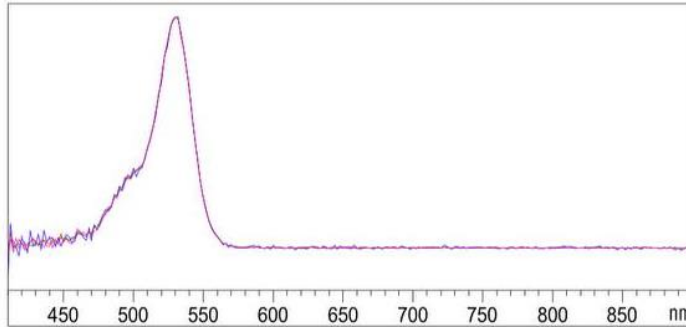
Додаток 6. Хроматограма Еритрозину.



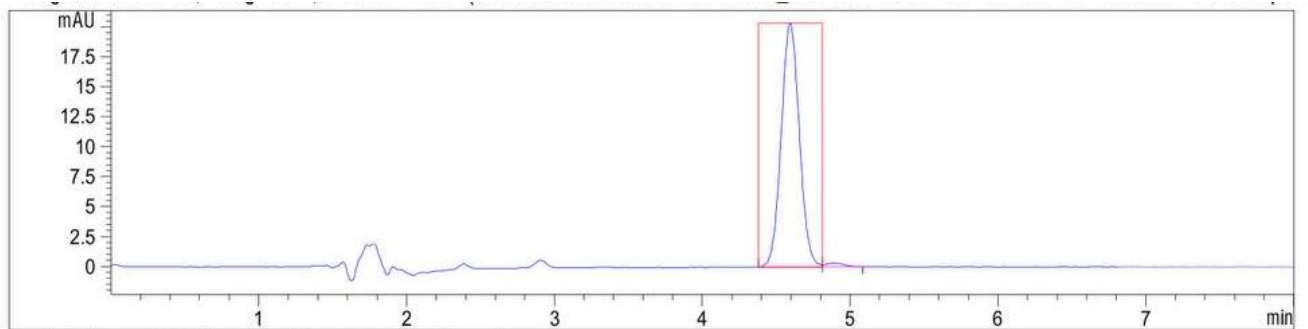
Додаток 7. Хромтограма табл. Корвазан.



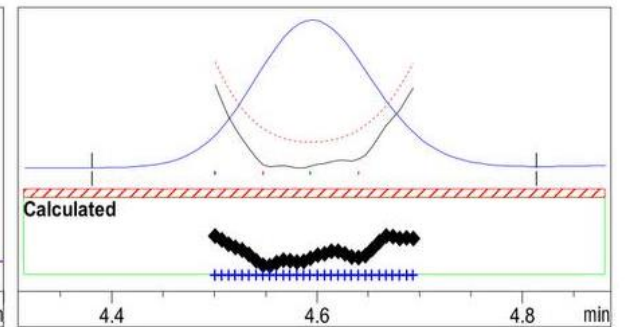
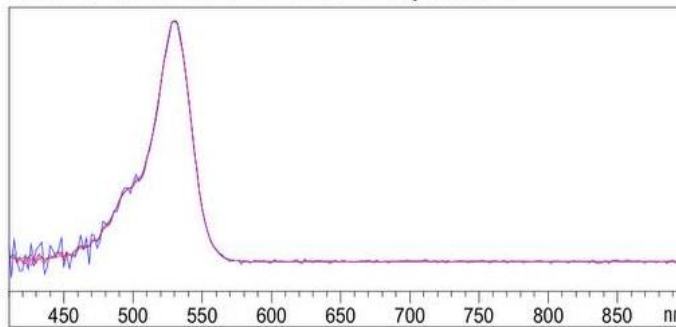
Peak :1 at 4.615 min Name : erythrosin



Додаток 8. Хроматограма табл. Анантаваті.



Peak :1 at 4.594 min Name : erythrosin



Додаток 9. Хроматограма капс. Грипостад С.

