

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

Національний медичний університет імені О. О. Богомольця

Фармацевтичний факультет

Спеціальність – 226 «Фармація, Промислова фармація»

Кафедра хімії ліків та лікарської токсикології

Допущено до захисту
Протокол засідання кафедри
№ _____ від “ _____ ” 2022р.

Завідувач кафедри хімії ліків та
лікарської токсикології
доктор медичних наук, професор,
заслужений діяч науки і техніки
України
Ніженковська І. В.

МАГІСТЕРСЬКА РОБОТА

Хроматографічне визначення сквалену в олії амаранту

Виконала: студентка 5-го курсу, групи
8804 фармацевтичного факультету

Стукало Мирослава

Науковий керівник:

Кандидат хімічних наук, доцент кафедри
хімії ліків та лікарської токсикології

Глушаченко Ольга Олександрівна

Асистент кафедри фармацевтичної,
біологічної та токсикологічної хімії,
кандидат хімічних наук,

Сиротчук Олександр Андрійович

Київ – 2022

ЗМІСТ

ВСТУП	3
Розділ 1. Сквален як складова олії амаранту	4
1.1 Олія амаранту	4
1.2 Характеристика сквалену як хімічної речовини	5
1.3 Метаболізм та фармакологія сквалену	7
1.4 Природні джерела сировини сквалену	8
1.5 Екстракція олії з рослинних джерел	11
1.6 Біологічна роль сквалену і його клінічне використання	14
1.7 Методи кількісного визначення сквалену	17
Розділ 2. Експериментальна частина	21
2.1 Матеріали і методи	21
2.2 Обладнання та умови хроматографування	21
2.3 Приготування розчинів	22
Розділ 3. Розробка методики визначення сквалену в олії амаранту	25
3.1 Вибір колонки	25
3.2 Вибір рухомої фази	31
3.3 Вибір швидкості потоку	37
3.4 Вибір об'єму інжекції	41
Розділ 4. Перевірка придатності системи та валідація методики	48
4.1 Перевірка придатності методики	48
4.2 Специфічність	50
4.3 Лінійність та діапазон застосування	52
4.4 Правильність і збіжність	56
4.5 Дослідження стабільності розчину	57
4.6 Внутрішньолабораторна збіжність та прецизійність	58
4.7 Робастність	59
ВИСНОВКИ	61
ДОДАТКИ	62
Додаток А. Термінологія, що застосована у дослідженні	62
Додаток Б. Сертифікати публікацій	69
СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ	70

ВСТУП

Олія амаранту – жирна олія, яка екстрагується з однорічної трав'янистої рослини амаранту та має неабияку цінність, адже містить у своєму складі комплекс корисних та необхідних речовин для організму людини. Амарантова олія багата своїм складом на амінокислоти (серед них лізин), білки, жири (поліненасичені жирні кислоти, наприклад омега-3 та омега-6), різні мікроелементи та сквален.

Сквален – ациклічний ненасичений тритерпен, який міститься в багатьох рослинних оліях, які слугують гарним та безпечним джерелом для екстрагування цієї речовини.

На сьогоднішній день, амарантова олія набуває все більшого використання як у побуті, так і в інших сферах користування, адже вважається однією з найбільш збагачених амінокислотним складом рослинних олій. Тому, на ринку України представлено багато виробників амарантової олії, серед яких і олії домашнього та фермерського виробництва.

Оскільки, сквален речовина жирної природи, то для розчинення зразків олії і кількісного визначення методом оберненофазової високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) необхідно застосовувати органічні розчинники. Для зменшення впливу на природу при розробці треба врахувати при розробці методики токсичність органічних розчинників, що будуть використані.

Мета роботи полягає у встановленні хроматографічних показників розділення сквалену з іншими компонентами олії амаранту та розробці екобезпечної методики визначення сквалену в олії різних сортів амаранту. Також в роботі передбачено проведення валідації розробленої методики визначення сквалену в олії амаранту та її апробацію на екстрагованій олії з різних сортів амаранту.

Завдання.

1. Встановити фактори утримування і розділення сквалену з компонентами амарантової олії при використанні різних хроматографічних колонок.
2. На основі проведених досліджень розробити екобезпечну хроматографічну методику визначення сквалену в олії різних сортів амаранту.
3. Провести валідацію розробленої методики визначення сквалену в олії амаранту.
4. Провести апробацію розробленої методики визначення сквалену в екстрагованій олії з різних сортів амаранту

Розділ 1. Сквален як складова олії амаранту

1.1 Олія амаранту

Олія амаранту – рідина, жовтуватого кольору, має приємний запах та смак волоського горіху. Вважається, що олія має унікальний склад та є найбагатшим джерелом сквалену, який має високу антиоксидантну властивість, здатність стримувати ріст злоякісних пухлин, підвищувати імунітет організму та прискорювати процеси регенерації шкіри. Ще одним представником складу олії амаранту є фітостерини, які регулюють рівень холестерину, підвищують імунітет та проявляють протипухлинні властивості.

Амарантова олія багата на фосфоліпіди, головним компонентом яких є лецитин, який вважається будівельним матеріалом організму та потужним антиоксидантом.

Лінолева та ліноленова жирні кислоти знижують рівень холестерину в організмі, нормалізують кров'яний тиск та перешкоджають утворенню атеросклеротичних бляшок на стінках судин.

Олія амаранту також багата на мікроелементи:

- Кальцій - бере участь у м'язових і нейронних реакціях, процесах згортання крові, необхідний для нормального формування кісток, зміцнення волосся, нігтів та зубів;
- Залізо – бере участь в утворенні гемоглобіну, потрібен для попередження розвитку анемії та процесах кровотворення;
- Фосфор – бере участь у регуляції нервової системи та нормальному функціонуванні нирок.

Олія амаранту з давніх часів використовується в народній медицині для лікування ожиріння, діабету, неврозів, авітамінозів, запальних процесах сечостатевої системи, опіках, шкірних захворюваннях, виразкових хворобах шлунку і дванадцятипалої кишки, стоматиті, різних захворюваннях нирок і інколи навіть при атеросклерозі.

Завдяки своєму багатому вмісту біологічно активних речовин, олія амаранту вважається висококалорійним продуктом, та вживається у їжу. На сьогоднішній день, вона актуальна в хлібопекарській, кондитерській промисловості, для виготовлення продуктів дитячого харчування, також її застосовують для виготовлення засобів лікувально-профілактичного, дієтичного, косметично-парфумерного та хіміко-фармацевтичного профілю. [1]

1.2 Характеристика сквалену як хімічної речовини

У 1906 році японський дослідник Міцумару Цудзімото виділив неомілювальну фракцію з жиру печінки акули, де виявив існування ненасиченого вуглеводню. [2] Через 10 років він виокремив ненасичений вуглеводень з хімічною формулою $C_{30}H_{50}$, шляхом фракційного вакуумування жиру печінки двох видів глибоководних

акул та назвав його “сквален” (походить від назви роду акул Squalidae). [3]

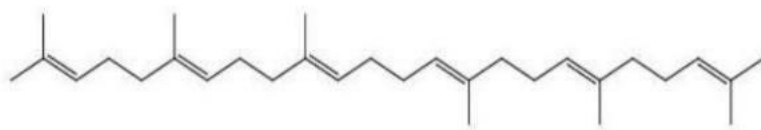


Рис. 1. Хімічна формула сквалену.

Хімічна формула сквалену – $C_{30}H_{50}$ (2,6,10,15,19,23-гексаметилтетракоза-2,6,10,14,18,22-гексаєн) (мал. 1.). Речовина являє собою 30-карбонову сполуку, яка містить в собі шість ненасичених зв’язків, в положеннях 2, 6, 10, 14, 18, 22 та побудована з шести ланок ізопрену [4]. Подвійні зв’язки роблять молекулу сквалену однією із найбільш ненасичених жирів, також він стає чутливим до окиснення [5]. Сквален відноситься до ациклічних тритерпенів та синтезується в рослинах, органах тварин, бактеріях, грибах, також є біогенетичним попередником таких речовин, як стероли, гормони чи вітаміни [6,7].

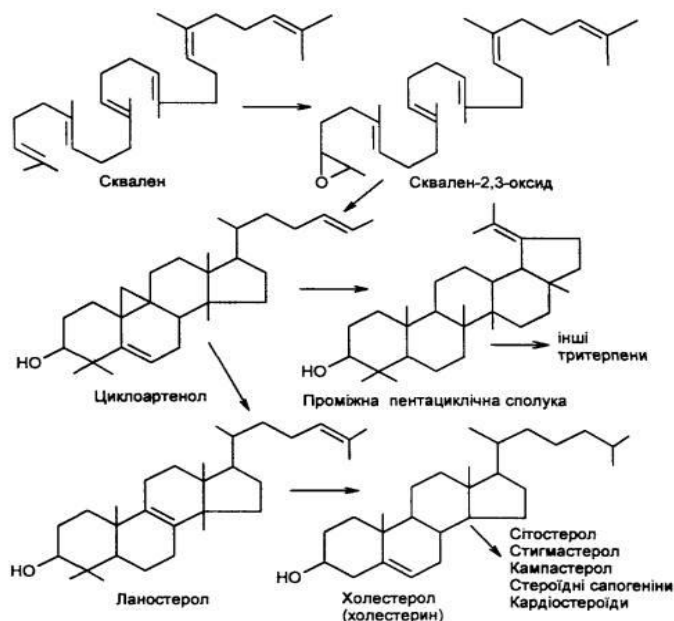
Організм людини здатний утворювати сквален, він синтезується в печінці, велика кількість якого виділяється сальними залозами. Вважається, що найбільша кількість сквалену міститься у крові новонароджених, з віком кількість сквалену в організмі людини спадає. [8]

Сквален – прозора в’язка рідина, нерозчинна у воді, але розчинна в органічних розчинниках, а саме в ацетоні, диетиловому та петролейному ефірах. Речовина частково розчиняється в оцтовій кислоті та етанолі. Молярна маса становить 410,73 г/моль, щільність – 0,855 г/см³. Температура плавлення і кипіння дорівнює -20 і 242 (4 мм.рт.ст) °С відповідно [9,10].

Відповідно до того, що сквален має подвійні зв’язки, він здатний легко окиснюватись до сквален-2,3-окиду, циклоартенолу, ланостеролу.

На кінцевій стадії він перетворюється на холестерин та інші стероли.

(мал. 2) [4]



Мал. 2. Окиснення сквалену

Однією з властивостей сквалену є те, що він легко здатний до гідратування, при цьому утворюючи речовину сквалан, яка зберігає в собі всі властивості свого попередника, має довший термін зберігання – понад 2 роки та менш сприятлива до окиснення, завдяки відсутності подвійних зв'язків у своїй структурі.

1.3 Метаболізм та фармакологія сквалену

Частина сквалену в організмі утворюється в синтезі холестерину, інша ж частина сквалену, понад 60%, надходить з їжею. Сквален є 6-ізопреноїдною одиницею, що містить тритерпеноїд. Він утворюється перетворенням ацетил-КоА в ГМГ-КоА, після цього ГМГ-КоА-редуктаза відновлює його до мевалонату. Фосфорилування та декарбоксілювання мевалонату проходить з утворенням дельта-3-ізопентенілдифосфатом, який потім слугує донором для поліпренілових сполук. Наступним етапом є те, що дельта-3-ізопентенілдифосфат приєднує фенільні групи і утворює молекулу сквалену. [11]

Після наведеного вище синтезу сквалену, далі він або виділяється з організму за допомогою сальних залоз шкіри, або зв'язується з ЛПНЩ та ЛПДНЩ для подальшого транспортування. Сквален у високих концентраціях міститься в жирових клітинах та тканинах людини.

При попаданні в організм, сквален перетворюється в стерини та потрапляє в кишечник без потрапляння в системний кровотік. Однак, приблизно 60-85% сквалену може розподілятися в різних тканинах організму. [12]

1.4 Природні джерела сировини сквалену

Дослідження японського вченого Цудзімото стверджують, що найбільше сквалену міститься у печінці різних видів морських риб, особливо у акул.

У акул, що мешкають на глибині до 400 м, печінка є основним органом для зберігання ліпідів, у такому разі неомильна речовина становить від 50 до 80% печінки.

Доведено, що печінка акули *Centrophorus squamosus* становить 18,1 % від маси тіла, тобто 77,2% маси печінки становить олія, а концентрація сквалену в цій олії становить 79,6%. Приблизно ці ж значення були отримані для *Centroscymnus crepidater*.

Інші дослідження показали, що сквален у великих кількостях міститься й у інших органах. Найвищий відсоток сквалену у *Centrophorus squamosus* міститься у печінці, в шлунку, підшлунковій залозі, серці, селезінці та нирках. Точна кількість сквалену у наведених вище органах може варіюватися в залежності від віку, статтю особин, їхнім географічним розташуванням та сезонністю. [13]

Жир акулячої печінки залишається найбагатшим джерелом сквалену, однак існує ряд причин, які можуть обмежувати його використання.

Наприклад, наявність різних забруднюючих речовин у середовищі перебування акул. Також, використання акулячого сквалену може бути під сумнівом через можливе зараження морських жителів різними патогенами.

Тому щоб уникнути інфікування людей почали використовувати сквален добутий з джерел рослинного походження. Сквален наявний у багатьох рослинних оліях, однак його концентрація сильно варіюється.

Сквален міститься майже у всіх рослинних оліях, хоча більшість з них мають лише незначну його кількість. Вперше сквален рослинного походження був виділений з оливкової олії.[14] Також, сквален був визначений в соєвій олії, олії виноградної кісточки, олії лісових горіхів, кукурудзяній олії та олії арахісу. Вміст речовини в наведених оліях варіюється згідно вирощування в Європі.

Найбільш цікавим для вивчення речовини рослинного походження становить сквален, виділений з олії амаранту. Найживильнішим та низькотоксичним вважається зерно амаранту саме зернових сортів. Вважається, що саме у них міститься найбільше олії, і отже, відповідно сквалену і необхідних людині фосфоліпідів.

Амарант, який ще має іншу (народну) назву щиріця (щариця) – здебільшого однорічна трав'яниста рослина. Листки переважно зеленого, рідше пурпурового, зелено-червоного кольору, залежно від виду та сорту рослини. Квітки дрібні, зелені, червонуваті або пурпурові, зібрані в густі шорсткі суцвіття колосо-волотистого типу, прямі або пониклі. Плід - яйцеподібна коробочка, що відкривається впоперек кришечкою. Зазвичай одна рослина може давати до 500 тисяч дрібних гладеньких блискучих зернин, які й слугують безпосередньо сировиною для добування олії. Термін зберігання зернин до 5 років.

Батьківщиною роду Амарант вважають Південну Америку. З часом цю рослину було завезено до Північної Америки, Індії та Китаю.

В Україні рослина зростає переважно як бур'ян – на узбіччях доріг, насипів, городах, садах.

У світі існує три види різновиду амаранту, зерно яких має високі показники за вмістом олії :

- *Amaranthus cruentus* (Амарант багряний/ Амарант пурпуровий)

На даний момент існує декілька сортів амаранту цього різновиду, які вирощуються на території північної півкулі. Одних з них – “Геліос”. Кількість жиру в зерні становить до 10%. Кількість сквалену в олії, отриманій шляхом холодного віджиму може досягати 7,5-8%. Кількість сквалену в олії, отриманій шляхом екстракції, може досягати до 9%.

“Помаранчевий гігант” – різновид сорту, що використовується для отримання олії шляхом екстракції та методом холодного віджиму. Відсоток жиру в зерні досить високий – майже 8%. Сквалену в олії цього сорту трохи менше – 6,5-7%

“Ацтек” має високі, але не найвищі показники по олійності – до 9% жиру в зерні, найчастіше зустрічаються показники близькі до 8,5%. Сквалену в олії зерна цього сорту близько 7%.

“Харківський – 1” – найбільш використовуваний вид цього цього сорту амаранту, так як більшість амарантової олії, представленої на ринку в Україні виробляється саме з нього. Загалом для отримання олії з нього використовують метод холодного віджиму . Кількість сквалену в олії холодного віджиму сягає 8%, кількість сквалену в олії, виробленій шляхом екстракції і реалізованої як лікувального перпарату, який містить сквален, може досягати 10%.

Сорт “Ультра” вважається високоолійним сортом, використовується переважно для отримання олії шляхом екстракції. Вміст сквалену в

амарантовій олії, отриманій з цього сорту, зазвичай коливається в межах 7-8%.

“Воронезький” – вміст жиру в зерні цього сорту трохи вище середнього – близько 7%. Вважається, що для північних регіонів це один з найкращих показників олійності амаранту, вирощеного на відкритому просторі. Сквалену в олії цього сорту амаранту – 5-6%.

- *Amaranthus hypochondriacus* (Амарант печальний)

В Україні його досить успішно вирощують в південних регіонах, зокрема, в Херсонській та Одеській областях, однак у промисловості його не використовують.

- *Amaranthus caudatus* (Амарант хвостатий)

В Україні досить рідко вирощується для комерційного використання. В основному його використовують в декоративних цілях.

1.5 Екстракція олії з рослинних джерел

Рослинні олії отримують шляхом механічного пресування або хімічної екстракції органічними розчинниками, наприклад, вода, етанол, бензол, тетрахлорид вуглецю, хлороформ, трихлоретилен, ацетон, диетиловий ефір, скраплені гази, гексан, тощо. [15] При хімічній екстракції, з використанням одного з розчинників, вихід рослинної олії становить до 98%, в той час як при використанні механічного пресування – 80%. Крім того, концентрація залишкової олії в макусі в результаті пресування, може становити 2-3%, в той час як при використанні хімічної екстракції становить менше 0,5%. Майже у всіх випадках використовують рафінацію, з метою видалення небажаних речовин, що негативно впливатимуть на органолептичні показники (смак, запах, зовнішній вигляд). Під час використання рафінування покращується стан та стабільність рослинної олії, її смак, зовнішність, запах, але існує

ризик видалення та зміну деяких компонентів, найчастіше це відбувається з вітамінами та фосфоліпідами.

Проводились дослідження про вплив різного виду рафінування на концентрацію сквалену в оливковій олії. Зменшення кількості сквалену склало приблизно 13% при використанні фізичного рафінування, знебарвлення – 7,0%, дезодорації – 15,6%. За причиною того, що сквален міститься в достатньо малих кількостях в рослині, це відносно зниження та зміна складу може суттєво впливати на кінцеву продуктивність процесу.

Як було вже зазначено, найбільша концентрація сквалену в рослинному світі зустрічається в олії, отриманої з рослини амарант. Амарант має великий вміст олії для злаків, але значно нижче ніж такі зернові рослини як соя. Ліпіди в основному містяться в фракції зародка оболонки насіння, що становить приблизно 25% від загальної ваги. Вважається, що середня концентрація сквалену в амарантовій олії становить приблизно 7-8%, в той час як, наприклад в оливковій олії середній показник сквалену становить 1 %.

[16]

У одному з перших досліджень щодо виділення сквалену з насіння було описано екстракцію сквалену гексаном з подальшим його видаленням, дегумуванням і видаленням воску. Сквален був остаточно виділений і очищений шляхом вакуумної дистиляції. Якщо олія, що підлягає фракціонуванню, попередньо не розкислена, то разом зі скваленом від дистиляції виходять жирні кислоти, що призводить до зниження концентрації сквалену в дистиляті та до отримання напівтвердого продукту при кімнатній температурі.

Проводячи дистиляцію при 180° С, було отримано семикратну концентрацію сквалену з виходом 76%. При використанні амарантової олії, попередньо очищеної лугом, спостерігалось збільшення концентрації

сквалену у декілька разів, однак вихід був нижчим, ніж у попередньому екстрагуванні і становив 67,8%. [17]

На сьогоднішній час, використання токсичних речовин, таких як гексан, створюють деякі незручності, тому почали використовувати так звану “технологію екологічної екстракції”. Як розчинник використовують зазвичай діоксид вуглецю. Він досить інертний, летючий та має досить низьку вартість і придатний для екстрагування термолабільних речовин. Завдяки цьому методу можна отримати досить високу чистоту отриманої олії. Тому відповідно цей метод дозволяє отримати сквален високої якості без використання токсичних розчинників.

Польські вчені Сильвестр Чаплінський, Дорота Огородовська, Дорота Деревіака, Рисзард Задерновський проводили дослідження щодо екстракції сквалену з різних видів амаранту такими методами, як: екстракцією надкритичною рідиною CO₂, екстракцією холодним пресуванням і екстракцією етанолом або хлороформом. Найкращими результатами виявились дослідження, де використали метод екстракції надкритичною рідиною. Менший вміст сквалену в олії, отриманий шляхом екстракції органічними розчинниками хлороформом та метанолом становив 6,00 г/100г, та найменший показник отримали при використанні методу холодного віджиму – 5,74г/100г. [18]

Таблиця 1. Концентрації екстрагувань різними методами екстракції.

Метод екстрагування	Концентрація
Екстракція CO ₂	6,95
Екстракція метанолом/хлороформом	6,00
Метод холодного віджиму	5,74

Інший вчений Гамель визначив концентрацію сквалену в олії екстрагованої методом Соксклета з насіння амаранту багряного/пурпурового

(*Amarantus cruentus*) і амаранту хвостатого (*Amarantus caudatus*), результати – 4,8% і 4,9% відповідно.

У 2003 році вчений Берганза та інші визначили від 2,26% до 5,90% для амарантової олії, отриманої шляхом екстракцією органічним розчинником, а саме n-гексаном. Для цього дослідження використали різні сорти амаранту пурпурового.

Деякі більші значення, до 7,2%, отримали вчені з насіння *Amarantus hypochondriacus*.

1.6 Біологічна роль сквалену і його клінічне використання

Сквален вважається дуже перспективною речовиною в розвитку нутриціології та фармацевтичної промисловості. На сьогодні повністю доведена його антиоксидантна, антиканцерогенна та кардіопротекторна властивість.

Сквален широко використовується у створенні та виробництві вакцин. Різні рекомбінантні антигени, такі як вірус грипу, гепатиту В і С, цитомегаловірус, вірус герпесу і ВІЛ були приготовані з емульсіями сквалену та продемонстроване їх безпечне використання на людях різного віку, навіть включаючи новонароджених.

Також, сквален використовується для вакцин проти пухлин. Така вакцина використовувалась для лікування В-клітинної лімфоми, антигени в поєднанні з емульсією сквалену дали специфічну імунну відповідь. Також аналогічна ситуація відбувалась при введенні пацієнтам з метастатичною меланою антиідіотипової вакцини в поєднанні з емульсією сквалену.

Однак, існують різні сумніви щодо позитивного використання сквалену у вакцинах. Базуючись на дослідженнях, у пацієнтів зростає ризик головних болей, неврологічних аномалій, частіше виникнення алергій, підвищена чутливість організму та проблеми з пам'яттю. [19]

Відомо, що сквален вважають одним з найкращих антиоксидантів. Проведені дослідження показали, що сквален зміцнює імунітет організму людини шляхом захисту імунних клітин біомембран проти так званого окислювального стресу під час фагоцитозу. [20] Також, сквален допомагає виводитись ксенобіотикам з організму, шляхом стимулювання ферментів детоксикації печінки – система цитохрому P450. Доведено, що сквален може детоксикувати дибензофурані, гексахлоробіфеніл, гексахлорбензол, 12-0-тетрадеканоїлфорбол-13-ацетат.

В деяких дослідженнях сквален розглядався як антидот для довільно прийнятих ліків, а саме теофіліну та стрихніну.

Сквален стає вільним при накопиченні ксенобіотиків в жирових клітинах і прискорює виділення препаратів стимуляцією жовчовиділення. Також проводились дослідження, які довели що сквален може попередити розвиток окислювальних процесів, спричинених вільними радикалами, травми, зокрема шкіри.

Існує теорія, що печінка акул містить 40% сквалену і відсутність раку в акул пов'язаний саме з цим. [21] Тому, досліджувались і питання антиканцерогенної активності сквалену, повідомлялось, що сквален може пригнічувати розвиток пухлин, перешкоджати ракові захворювання, стимулювати ретикулоендотеліальну систему і збільшувати кількість лейкоцитів.

В загальному, сквален пригнічує канцерогенез за такими механізмами:

- 1) Інгібування фарнезилювання Ras-онкобілка та рестрикційного перетворення 3-гідрокси-3-метилглутарил-коензим А в мевалонат;
- 2) Модулювання біосинтезу та функцій ферментів, що метаболізують ксенобіотики;
- 3) Поглинання вільних радикалів. [22]

Емульсії сквалену застосовували з різними протираковими препаратами і спостерігали їх підвищення ефективності. Вчений Накагава досліджував питання взаємодії сквалену і таких протиракових препаратів, таких як адриаміцин, 5-флуорацил, блеоміцин та цисплатин. Результати показали лише підвищення цитотоксичності цих препаратів.

Було доведено, що сквален проявляє вибіркового цитопротекторний ефект на нормальні клітини, але такий ефект не був виявлений на клітинах уражених раком. Вчений Дас в своїх дослідженнях показав що сквален захищає нормальну оболонку кісткового мозку, але не клітини нейробластоми, токсичність яких викликана протипухлинними препаратами.

Ще одним з переваг сквалену є його захист проти грибкових та бактеріальних інфекцій. Особливо це стосується пацієнтів з дерматитами та ксерозами.

В додаток до цього, були проведені дослідження на щурах, які показали попередження коронарних серцевих хвороб і антиоксидантний ефект проти інфаркту міокарда шляхом інгібування перекисного окислення ліпідів, при використанні сквалену впродовж 45 днів.

Як раніше зазначалось, шкіра людини здатна виділяти сквален і має дещо позитивний вплив на шкіру. Численні дослідження показали, що сквален вважають одним з найкращих пом'якшувальних, зволожуючих та антиоксидантних засобів. Проводились дослідження по відновленню водного балансу шкіри за допомогою сквалену. Спочатку шкіру попередньо обробляли поверхнево-активною речовиною – лаурилсульфатом натрію, а після додавали сквален, шкіра відновлювала водний баланс моментально. Тому, сквален набуває все більшої популярності серед косметологічної промисловості, розробляються різні еліксири, сироватки біологічно активні добавки на основі сквалену. Прикладом є БАД “Скварин”, який є досить перспективним у застосуванні і використовується для профілактики й

комплексної терапії серцево-судинних захворювань, таких як атеросклероз. Біологічно активна добавка допомагає нейтралізувати вільні радикали в організмі та покращувати стан імунної системи організму.[23]

1.7 Методи кількісного визначення сквалену

Найпоширенішими методами кількісного визначення сквалену у складі жирних олій є різні види хроматографії, зокрема високоефективна рідинна та газова хроматографія.

Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) - це метод кількісного та якісного аналізу, а також розділення складних органічних сумішей або речовин. Вважається, що саме методика ВЕРХ є більш ефективною, універсальною та точною, тому її поступово заміняють в монографіях. [24]

Таблиця 2. Різні методики визначення сквалену.

Метод	Колонка	Рухома фаза	Потік	Час хроматограми	Особливості прободготовки	Посилання
ГХ	Капілярна колонка Vf-5 ms з нерухомою неполярною фазою – (5%-феніл)-диметилполісилоксаном: довжина 30 м, діаметр 0,32 мм, товщина плівки 0,25	Газ-носій - Гелій	2,5 мл/хв	11,0 хв	Омилення проводили шляхом додавання КОН в метанолі. Після охолодження проводили екстракцію неомілювальних речовин, шляхом промивання	[4]

	мкм, високотемпера турна (максимальна температура – 350°C).				літиловим етером.	
ВЕРХ	колонка розміром 100 мм × 4.0 мм, заповнена сорбентом ReproSil Pur ODS 3, розмір частинок 3 мкм; температура колонки – 25 °C	дихлормет ан – ацетонітри л (1:2);	1 мл/х в	14 хв		[25]
ГХ- МС	Капілярна колонка OV- 101, 30 m 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness.	Гелій. Початкова температу ра 100 оС, 100-270 оС при 4С/хв, 20 хв при 270 оС. Температу ра інжектора	38 см/с	20хв	Проводили деривацію шляхом додавання 100 мкл BSTFA при кімнатній температурі протягом 15 хв.	[20]

		ГХ становила 250°C; температу ру лінії передачі підтримув али на рівні 320°C.				
ВЕРХ- ДМД	Zorbax Eclipse Plus C18 col- umn (250 mm × 4.6 mm, 5 μm; Agilent).	Метанол- вода=98-2 (компонен т А) та ізопропано л (компонен т В). А:В=90:10	1мл/ хв	33хв	Омилення проводили розчином натрій гідроксиду у метанолі. Потім пробірки струшували 30 хв при 75 °С. Після додавали 3 мл води та екстрагувал и неомильні речовини абсолютефі ром.	[26]
ВЕРХ	ZORBAX Eclipse Plus C18 column (250 mm × 4.6	Метанол- вода(А)=9 8:2 та ізопропано	1,0 мл/х в	37 хв	Проводили омилення з використан ням н- гексану	

	mm, 5 μ m; Agilent)	л(В) А:В- 90%:10% градієнт				
--	----------------------------	-------------------------------------	--	--	--	--

Проаналізувавши дані з таблиці 4, видно, що методики високорідинної хроматографії мають досить тривалий час хроматографування, від 14 до 37 хв, використовуються досить токсичні розчинники, такі як дихлорметан, ацетонітрил, метанол та інші.

У методі газорідинної хроматографії проводяться складні пробопідготовки, з використанням методу деривації та омилення.

Тому, потрібно створити методику, яка була б експреснішою, простішою та з використанням безпечніших розчинників.

Розділ 2. Експериментальна частина

2.1 Матеріали і методи

Для аналізу були обрані такі об'єкти:

- 1) Олія “Amaranth Oil”, ТМ “Selena”

Склад: амарантова олія 100%

Стандартні зразки:

- Сквален, виробництва Sigma, S3626-100ml; Lot МКСМ5169

Реактиви:

- 1) Вода для хроматографії, отримана за допомогою установки Simplicity UV, Millipore, USA;

- 2) Етанол 96%, виробник Державне підприємство “УКРСПІРТ”

- 3) Ізопропанол (2-пропанол), хч, виготовлений Sigma-Aldrich, Франція

2.2 Обладнання та умови хроматографування

Посуд: мірний посуд – мірні колби 25 мл, 50 мл і піпетки 5 мл класу точності А.

Ваги: ваги електронні модель AS 60/220/C Radwag, максимальне допустиме навантаження становить 220 г, а дискретність 0,01/0,1 мг.

Денситометр-віскозиметр: модель: DMA 450m&Lovis 2000 ME виробництва компанії Anton Paar.

Робота виконана на високоефективному хроматографі Shimadzu LC-30 А, виробництва компанії Shimadzu (Японія).

В якості нерухомої фази в дослідженні було використано колонку SUPELCOSIL LC-ABZ. Основні характеристики якої наведені в таблиці.

Таблиця 3. Характеристика колонки, використаної в експерименті.

Колонка	SUPELCOSIL LC-ABZ
Класифікація по USP	L60
Розмір пор, А	120
Вміст С, %	12
Площа поверхні (м ² /г)	170
Покриття привитою фазою (ммоль/м ²)	3.4
Активна група	Amide, alkyl

Умови хроматографування сквалену в олії амаранту (Олія “Amaranth Oil”, ТМ “Selen”)”)

Колонка - SUPELCOSIL LC-ABZ, 15 × 4.6 mm, 5 μm

Рухома фаза – етиловий спирт 91%.

Температура термостата колонки - 40°C.

Швидкість потоку рухомої фази – 1,0 мл/хв.

Об’єм інжекції – 5 мкл.

2.3 Приготування розчинів.

Приготування розчину для визначення придатності хроматографічної системи: У мірну колбу місткістю 50 мл поміщаємо 55 мг вітаміну Е та розчиняємо у ізопропанолі. У другу мірну колбу місткістю 50 мл поміщаємо 48,5 мг і розчиняємо ізопропанолом. У пробірку місткістю 25 мл відмірюємо 5 мл розчину альфа-токоферолу ацетату та 5 мл розчину сквалену, доводимо до позначки 50 мл ізопропанолом.

Приготування стандартного зразка сквалену: У мірну колбу місткістю 50 мл поміщаємо сквален масою 50 мг, доводимо до позначки

ізопропанолом. Потім піпеткою 5 мл відмірюємо раніше приготований розчин сквалену і поміщаємо в мірну колбу місткіст. 25 мл, доводимо до позначки ізопропанолом.

Приготування розчинів сквалену для визначення лінійності методики.
Для приготування вихідного розчину сквалену з концентрацією 0,2 мг/мл, наважки стандартного зразку масою помістили в колбу на 50 мл і довели до мітки ізопропанолом.

Готувалось 9 розчинів з різною концентрацією:

- 1) $m = 59,50$ мг, розведення 5:25, 0,12 мг/мл;
- 2) $m = 69,06$ мг, розведення 5:25, 0,14 мг/мл;
- 3) $m = 80,42$ мг, розведення 5:25, 0,16 мг/мл;
- 4) $m = 91,44$ мг, розведення 5:25, 0,18 мг/мл;
- 5) $m = 101,86$ мг, розведення 5:25, 0,2 мг/мл;
- 6) $m = 109,16$ мг, розведення 5:25, 0,22 мг/мл;
- 7) $m = 121,73$ мг, розведення 5:25, 0,24 мг/мл;
- 8) $m = 129,52$ мг, розведення 5:24, 0,26 мг/мл;
- 9) $m = 135,79$ мг, розведення 5:25 0,28 мг/мл.

Підготовка зразків сквалену для перевірки внутрішньолабораторної сходимості методики. Аналітиком 1 було приготовано два стандартних зразка сквалену з масами 48,52 мг та 46,58 мг відповідно. Дані наважки помістили в колби місткістю 50 мл, розчинили ізопропанолом та зробили розведення 5:25.

Також, було приготовано 6 зразків олії амаранту з масами наважок 148,68 мг, 152,21 мг, 149,69 мг, 148,74 мг, 150,46 мг, 152,27 мг відповідно. Наважки помістили в колби на 50 мл, довели до мітки ізопропанолом.

Відповідно аналітиком 2 було приготовано два стандартних зразка сквалену масами 48,84 мг та 48,86 мг відповідно. Дані наважки було

поміщено в колби місткістю 50 мл та розчинено ізопропанолом. Було зроблено розведення 5:25.

Також, було приготовано 6 зразків олії амаранту масами 146,6 мг; 152,9 мг; 160,8 мг; 162 мг; 161,5 мг та 165,6 мг відповідно. Наважки було поміщено у мірні колби місткістю 50 мл та доведено до мітки ізопропанолом.

Розділ 3. Розробка методики визначення сквалену в олії амаранту

3.1 Вибір колонки

Для вибору колонки було проведено інжектування стандартного зразку сквалену з токоферолом ацетат та зразка сквалену з компонентами олії з використанням 7 хроматографічних колонок.

Таблиця 4. Характеристика колонок використаних для дослідження.

Колонка	Класифікація по USP	Розмір пор, А	Вміст С, %	Площа поверхні (м ² /г)	Покриття привитою фазою (ммоль/м ²)	Активна група
Ascentis Phenyl	L11	100	19	450	5.2	Phenyl
Discovery C8	L7	180	7.5	200	3.4	C8 (octyl)
Discovery HS F5	L43	120	12	300	4.0	PFP (pentafluorophenyl)
Discovery HS C18	L1	120	20	300	3.2	C18 (octadecyl)
SUPELCOS IL ABZ PLUS	L60	120	12	170	3.4	Amide, alkyl
SUPELCOS IL LC-ABZ	L60	120	12	170	3.4	Amide, alkyl
SUPLEX PKB -100	L68	120	12.5	170	3.4	Amide, alkyl

За проведенням інжектування стандартного розчину сквалену з компонентами олії було отримано дані наведені в таблиці 4.

Таблиця 5. Хроматографічні параметри піку сквалену з компонентами олії при зміні колонки з використанням 96% етанолу в якості рухомої фази..

Колонка	Ret.time (t _R)	Symmetry (A _S)	N	RS (EP)
Ascentis Phenyl	3,304	1.146	5200	--
Discovery C8	2,999	0,996	4927	1,502
Discovery HS F5	2.611	1,788	1408	1,437
Discovery HS C18	6.878	0,901	6047	11,850
SUPELCO SIL ABZ PLUS	2,832	1,298	4160	3,620
SUPELCO SIL LC-ABZ	3,200	1,125	4321	3,456
SUPLEX PKB -100	3,274	1,140	5128	4,041

При виборі колонки за допомогою стандартного розчину сквалену з токоферолом ацетат було отримані дані наведені в таблиці 5.

Таблиця 6. Хроматографічні парметри піку сквалену у стандартному розчині сквалену з токоферолом ацетат з використанням 96% етанолу в якості рухомої фази.

Колонка	Ret.time (t _R)	Symmetry (A _S)	N	RS (EP) (жирних олій)
---------	----------------------------	----------------------------	---	--------------------------

Ascentis Phenyl	3,274	1,100	3519	--
Discovery C8	3,022	--	7018	1,692
Discovery HS F5	2,536	1,474	3180	1,923
Discovery HS C18	6,753	0,967	8843	7,800
SUPELCO SIL ABZ PLUS	3,212	1,330	5444	2,542
SUPELCO SIL LC-ABZ	3,135	1,157	4555	2,388
SUPLEX PKB -100	3,275	1,129	6937	3,060

<Chromatogram>

uV

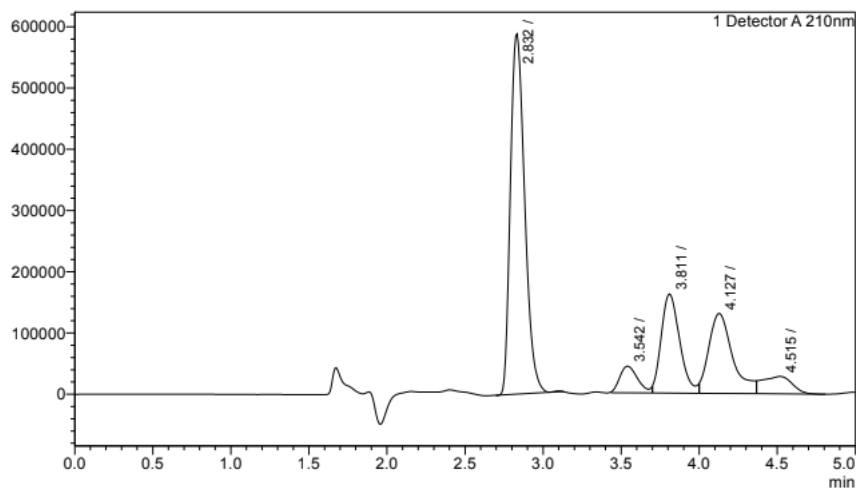


Рис 2. Хроматограма розчину сквалену з компонентами олії з використанням колонки SUPELCO SIL LC-ABZ PLUS.

Як видно із таблиці 4 отримано основні хроматографічні характеристики для 7 колонок при хроматографуванні амарантової олії. Окрім піку сквалену на хроматограмі виявляються піки тригліцеридів жирних кислот амарантової олії, які елюються після сквалену, що може з однієї сторони носити загрозу для розділення сквалену з ними або навпаки –

подовжувати хроматограму, якщо розділення покращене. Так високий коефіцієнт розділення $R_s=11.85$ отримано на хроматографічній фазі Discovery HS C18, що забезпечує утримування тригліцеридів від 10 до 15 хв хроматограми, а це погіршує екобезпечні характеристики методики.

З іншого боку на хроматографічних фазах Ascentis Phenyl, Discovery C8, Discovery F5 отримано розділення, менше 2,0, а це означає, що тригліцериди можуть негативно впливати на інтерпретацію площі піку сквалену і результат визначення внаслідок цього буде спотворений. Оптимальне розділення, висока ефективність хроматографічного піку та відносно невеликий час для отримання однієї хроматограми отримано для хроматографічних фаз, що містять амідну полярну вставку – Supelcosil ABZ, Supelcosil LC-ABZ+, Suplex pKb-100. Час утримування для сквалену при цьому вдвічі менший ніж при хроматографуванні на Discovery C18.

При проведенні інжекції розчину сквалену з компонентами олії на колонці SUPELCOSIL LC-ABZ PLUS час утримування сквалену становив 2,832 хв, число теоретичних тарілок 4160, а коефіцієнт розділення сквалену з компонентами олії – 3,620.

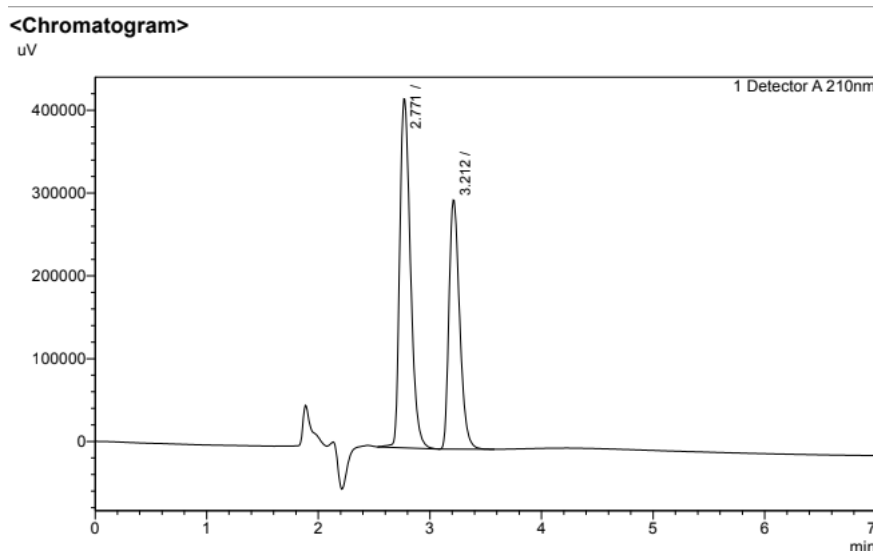


Рис.3 Хроматограма стандартного розчину сквалену з токоферолом ацетат з використанням колонки SUPELCOSIL LC-ABZ PLUS.

При проведенні інжекції стандартного зразку сквалену з токоферолом ацетат ефективність становить 5444, час утримування піку сквалену – 3,212 хв, а коефіцієнт розділення сквалену та токоферолу – 1,330.

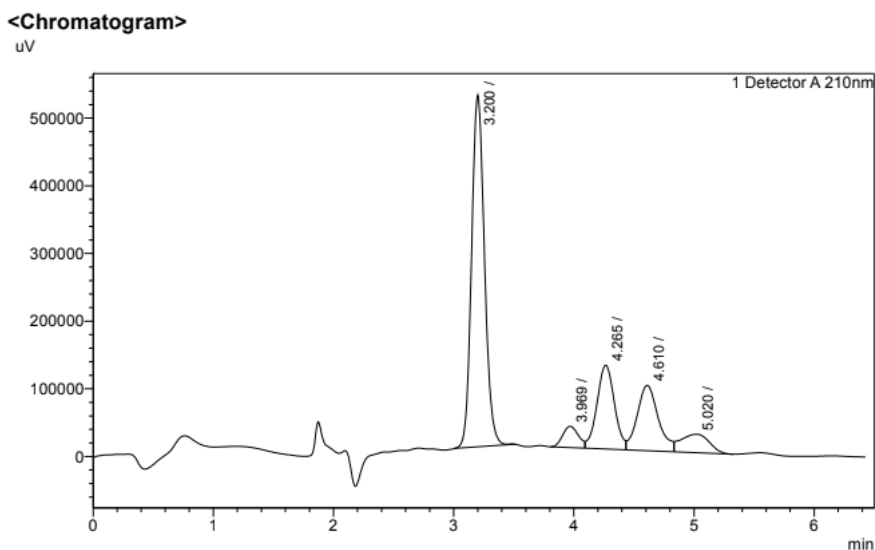


Рис 4. Хроматограма розчину сквалену з компонентами олії з використанням колонки SUPELCOSIL LC-ABZ.

За використання колонки SUPELCOSIL LC-ABZ у розчині сквалену з компонентами олії час утримування становить 3,200 хв, коефіцієнт розділення сквалену з компонентами олії – 3,456, а число теоретичних тарілок – 4321.

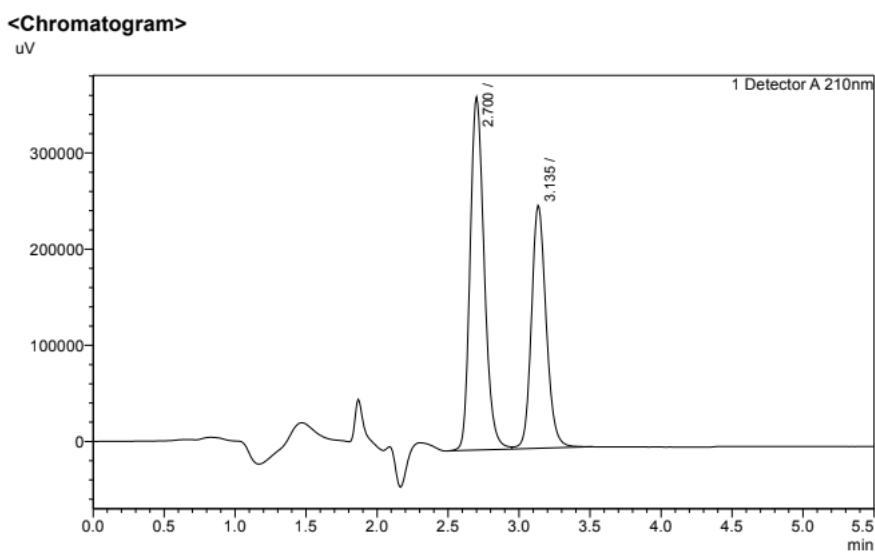


Рис.5 Хроматограма стандартного розчину сквалену та токоферолу ацетат з використанням колонки SUPELCOSIL LC-ABZ.

За проведення інжекції з використанням колонки SUPELCOSIL LC-ABZ час утримування сквалену становить 3,135 хв, число теоретичних тарілок – 4555, а коефіцієнт розділення сквалену та токоферолу становить 2,388.

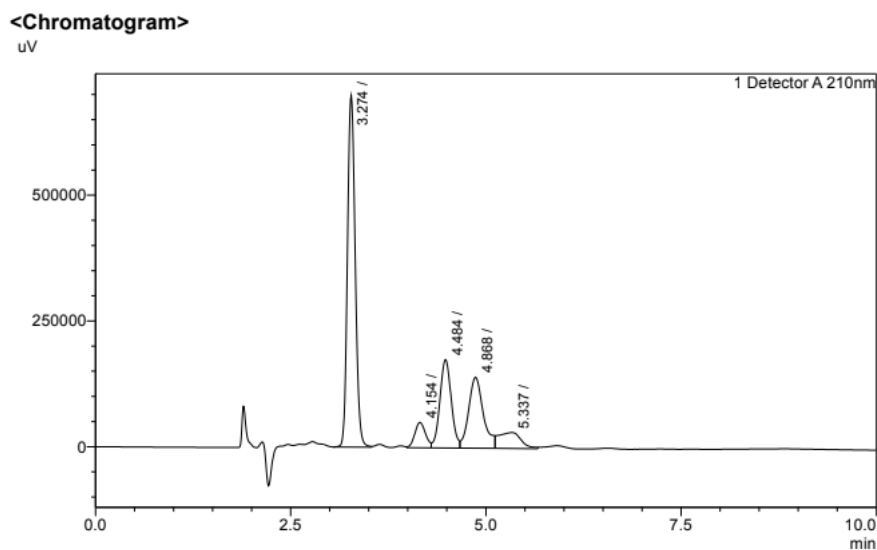


Рис.6 Хроматограма розчину сквалену з компонентами олії з використанням колонки SUPLEX РКВ-100.

При використанні колонки SUPLEX РКВ-100 час утримування сквалену становить 3,274 хв, коефіцієнт розділення сквалену та компонентів олії – 4,041, а ефективність (N) – 5128.

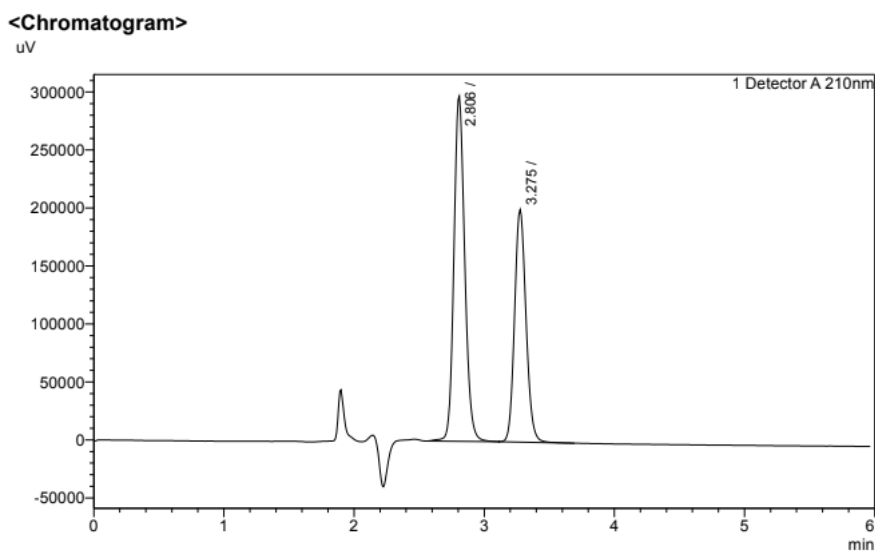


Рис. 7. Хроматограма стандартного розчину сквалену з токоферолом ацетат з використанням колонки SUPLEX PKB-100.

При проведенні дослідження стандартного розчину сквалену з токоферолом з використанням колонки SUPLEX PKB-100 число теоретичних тарілок становить 6937, коефіцієнт розділення речовин – 3,060, а час утримування сквалену становить 3,275.

Тому, проаналізувавши отримані дані з досліджень, було вирішено для розробки методики визначення сквалену обрати наступні хроматографічні фази: SUPELCOSIL ABZ PLUS, SUPELCOSIL LC-ABZ та SUPLEX PKB - 100. Дані колонки є схожі за своїми властивостями, належать до однієї класифікації та мають однакову прищеплену групу (Таблиця 1).

3.2 Вибір рухомої фази

Було проведено інжектування зразків з рухомою фазою етилового спирту з вмістом 96 об. %, 93 об. % та 91 об. %.

Отримані дані при дослідженні стандартного зразку сквалену з компонентами олії:

- Використання рухомої фази з вмістом етанолу 96 об. %:

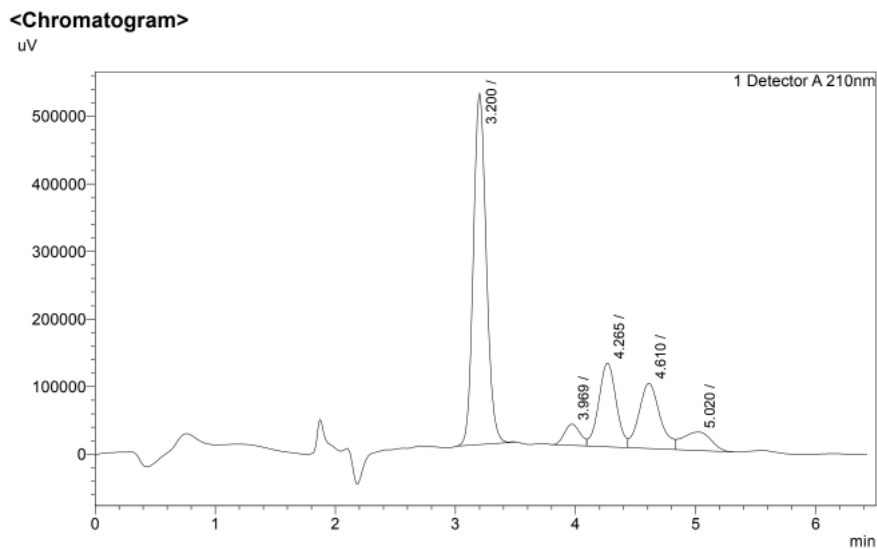


Рис.8. Хроматограма розчину олії амаранту для перевірки придатності системи на колонці SUPELCOSIL ABZ з рухомою фазою, що містить 96,0 об. % етилового спирту.

При такій рухомій фазі число теоретичних тарілок (ефективність) становить 4321, прояв піку відбувається на приблизно 3,2 хвилині, однак спостерігається погане розділення між піками. Тому було прийняте рішення про зниження вмісту етилового спирту в рухомій фазі до 93%

- Використання рухомої фази з вмістом етилового спирту 93%

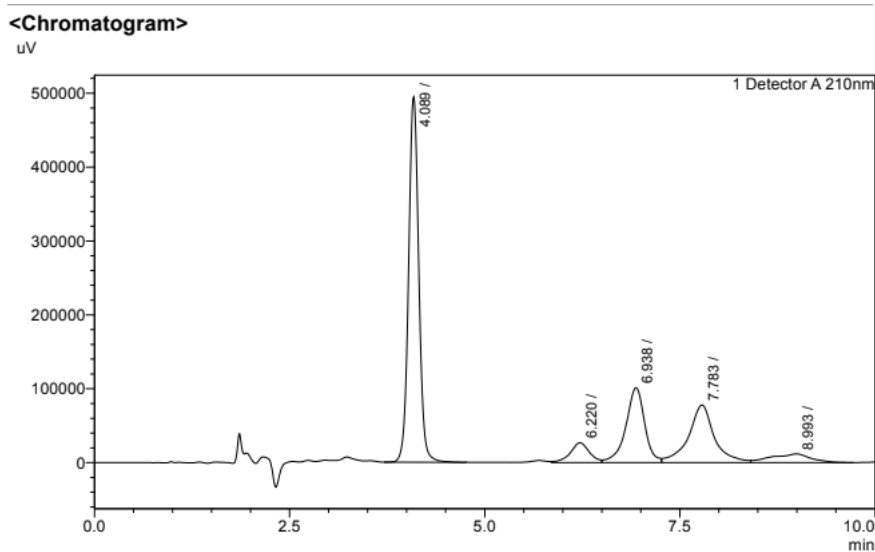


Рис.9. Хроматограма розчину олії амаранту для перевірки придатності системи на колонці SUPELCOSIL ABZ з рухомою фазою, що містить 93,0 об. % етилового спирту.

При такій рухомій фазі з вмістом спирту 93% число теоретичних тарілок (N) становить 5119, пік сквалену з'являється приблизно на 4 хвилині.

- Використання рухомої фази з вмістом етилового спирту 91 об.%

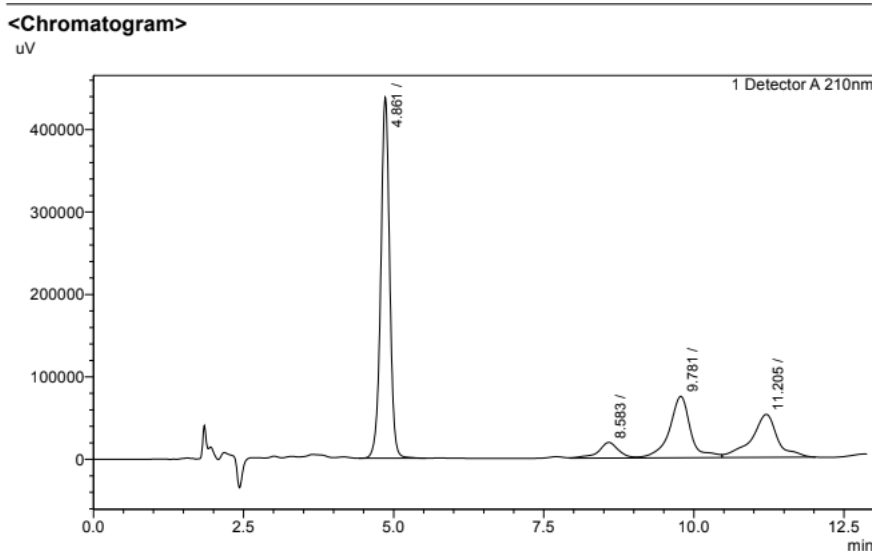


Рис. 10. Хроматограма розчину олії амаранту для перевірки придатності системи на колонці SUPELCOSIL ABZ з рухомою фазою, що містить 91,0 об.% етилового спирту.

При використанні рухомої фази з вмістом 91 об.% етилового спирту ефективність становить 5517, час утримання становить 4,861.

Таблиця 7. Результати досліджень придатності системи на колонці SUPELCOSIL ABZ з рухомими фазами місткістю 96 об.%, 93 об.% та 91 об.%.

	t_R час утримання, хв	час N теор.тарілок)	(кільк. As коєфіцієнт симетрії піку	Rs коєфіцієнт розділення сквалену компонентами олії	3

96%	3,200	4321	1,125	3,456
93%	4,089	5119	1,040	6,565
91%	4,861	5517	0,976	9,308

Отже, за результатами даних при перевірці придатності системи з рухомими фазами 96 об. %, 93 об. % та 91 об. % найбільш оптимальним є використання рухомої фази з вмістом етилового спирту 91%. При дослідженні спостерігалась така закономірність: з послабленням рухомої фази спостерігалось підвищення ефективності, часу утримування та коефіцієнту розділення сквалену та компонентів олії.

При дослідженні стандартного зразку сквалену з токоферолом ацетатом було отримано такі дані при:

- Використанні рухомої фази з вмістом 96 об.% етилового спирту:

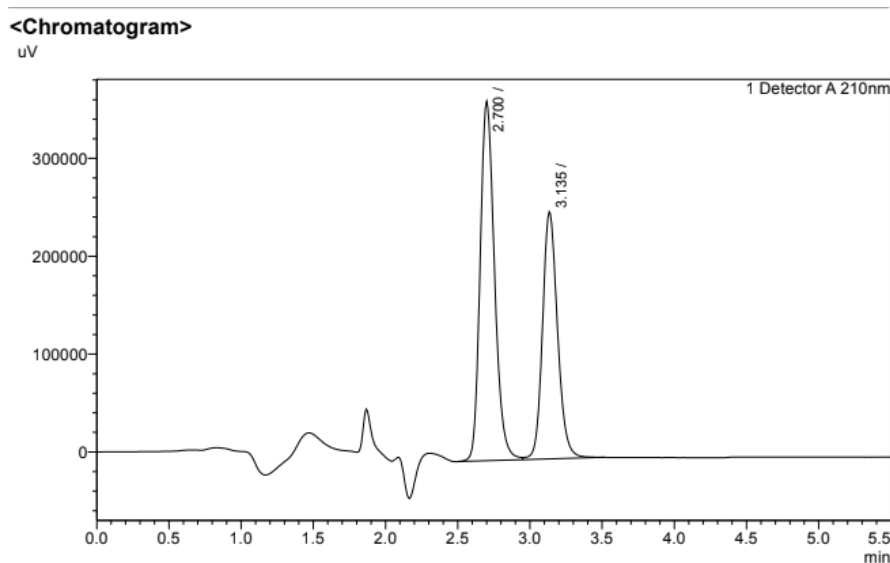


Рис.11. Хроматограма стандартного розчину сквалену з токоферолом ацетат для перевірки придатності системи на колонці SUPELCOSIL ABZ з рухомою фазою з вмістом 96 об.% етилового спирту.

При використанні рухомої фази зі вмістом спирту 96 об.% число теоретичних тарілок (ефективність) становила 3612, час утримання сквалену становить 2,700. Коефіцієнт розділення сквалену та токоферолу ацетату становить 2,388. Було прийнято рішення послабити фазу.

- Використання рухомої фази зі вмістом 93 об.% етилового спирту

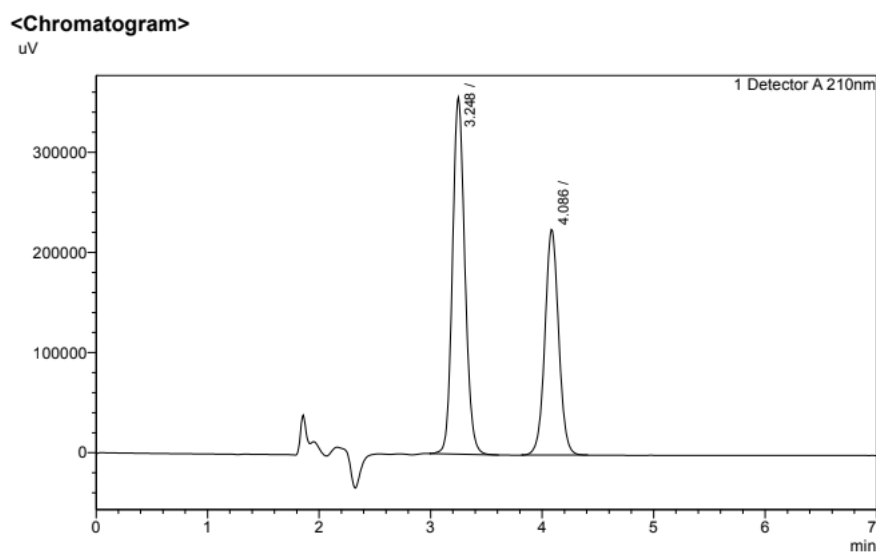


Рис.12. Хроматограма стандартного розчину сквалену з токоферолом ацетат для перевірки придатності системи на колонці SUPELCOSIL ABZ з рухомою фазою зі вмістом 93 об.% етилового спирту.

При використанні даної фази ефективність становить 4181, час утримування – 3,248. Коефіцієнт розділення сквалену з токоферолом ацетат становить 3,976. Для підвищення показника розділення було прийнято рішення про послаблення рухомої фази до 91 об.%.

- Використання рухомої фази зі вмістом 91 об.% етилового спирту.

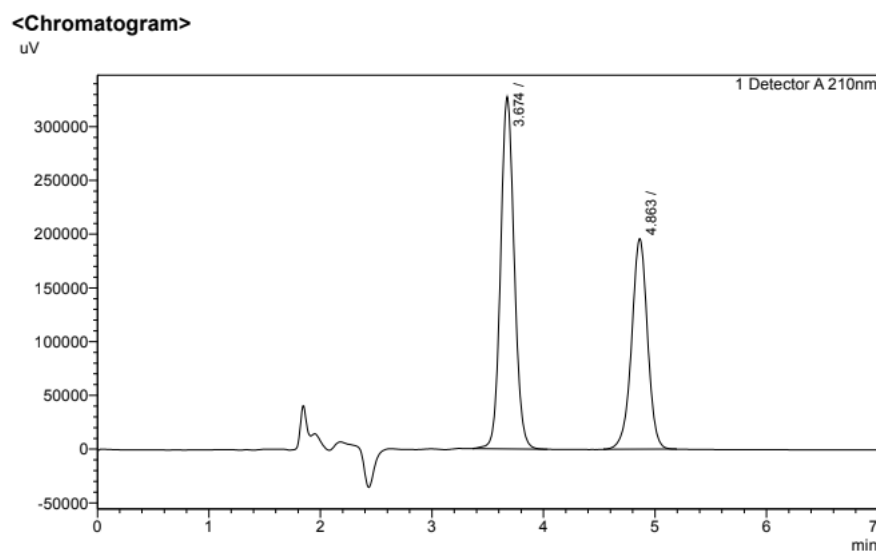


Рис.13. Хроматограма стандартного розчину сквалену з токоферолом ацетат для перевірки придатності системи на колонці SUPELCOSIL ABZ з рухомою фазою зі вмістом 91 об.% етилового спирту.

При використанні даної рухомої фази час утримування сквалену становить 3,674, число теоретичних тарілок – 4439, коефіцієнт розділення – 5,016.

Таблиця 8. Результати досліджень стандартного розчину сквалену з додаванням токоферолу ацетат для перевірки придатності системи зі вмістом 96 об.%, 93 об.% та 91 об.% етилового спирту.

	t _R час утримування, хв	N (кільк. Теор.тарілок)	As коефіцієнт симетрії піку	Rs коефіцієнт розділення сквалену та токоферолу ацетат
96%	2,700	3612	1,223	2,388
93%	3,248	4181	1,133	3,976
91%	3,674	4439	1,087	5,016

Отже, за результатами зведеними в Таблиці 2, найбільш оптимальним є використання рухомої фази з вмістом 91 об. % етилового спирту. Послаблення рухомої фази у зразку сквалену та токоферолу ацетат призводить до збільшення показників: часу утримування, ефективності та коефіцієнту розділення сквалену з токоферолом ацетат.

Для остаточного вибору рухомої фази було здійснено дослідження з використанням модельного розчину, що містить в собі стандартний зразок сквалену та олійний компонент.

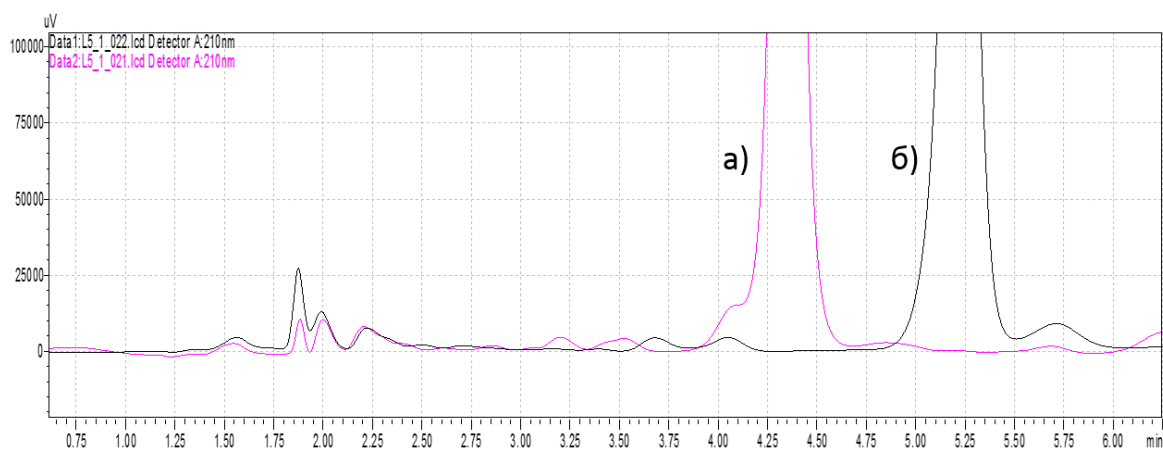


Рис.14. а) хроматограма модельного розчину(100%) на колонці Supelcosil LC-ABZ 150*4.6 (5мкм), рухома фаза 93,4% етиловий спирт;

б) хроматограма модельного розчину(100%) на колонці Supelcosil LC-ABZ 150*4.6 (5мкм), рухома фаза 91,5% етиловий спирт .

На рис.14 видно, що розділення з невідомим компонентом олії покращується при зменшенні вмісту етилового спирту до 91,0 об. %, зокрема на хроматограмі а) розділення менше 1, а на хроматограмі б) 1,4.

3.3 Вибір швидкості потоку

Швидкість потоку впливає на ефективність хроматографічної колонки. Під ефективністю розуміють здатність системи опиратись розмиванню хроматографічних піків речовин, що розділюються. Ефективність розділення на колонці можна виразити числом теоретичних тарілок даної колонки. Чим більше число теоретичних тарілок, тим більше ефективність колонки.

Для вибору швидкості потоку проводилось 4 хроматографування з різними варіаціями швидкості потоку, а саме: 0,8 мл/хв; 1,0 мл/хв; 1,5 мл/хв та 2,0 мл/хв.

- Швидкість потоку 0,8 мл/хв

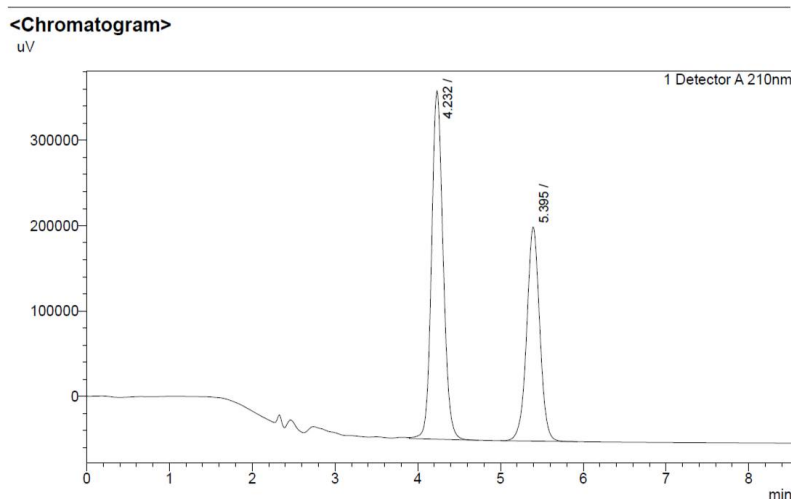


Рис.15. Хроматограма стандартного розчину сквалену з токоферолом ацетат для перевірки придатності системи при швидкості потоку 0,8 мл/хв.

При швидкості потоку 0,8 мл/хв тиск дорівнював 72 bar. Число теоретичних тарілок дорівнювало 4552, час утримування піку сквалену – 4,232, а коефіцієнт розділення – 4,394. Умови хроматографування:

Рухома фаза – спирт етиловий 93,3%

Температура колонки - 40°

Колонка – SUPELCOSIL LC-ABZ; 15 × 4.6 mm, 5 μm

- Швидкість потоку 1,0 мл/хв

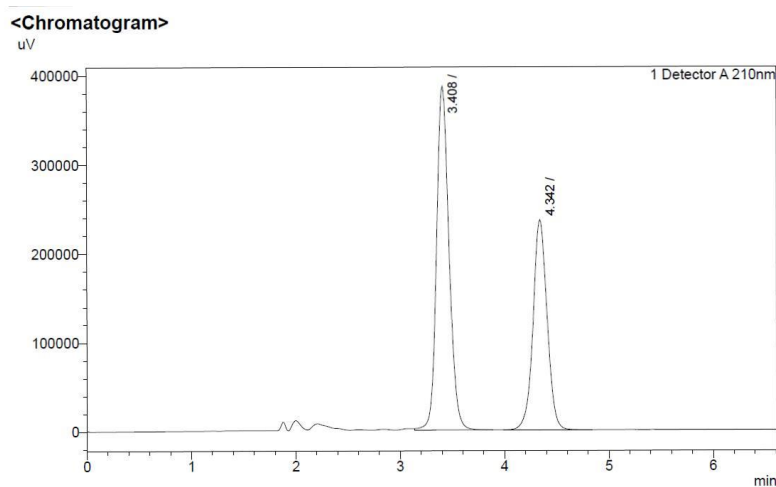


Рис.16. Хроматограма стандартного розчину сквалену з токоферолом ацетат для перевірки придатності системи при швидкості потоку 1,0 мл/хв.

При швидкості потоку 1,0 мл/хв тиск дорівнював 89 bar. Час утримування сквалену дорівнює 3,408, число теоретичних тарілок – 4062 та коефіцієнт розділення сквалену 4,131. Умови хроматографування:

Рухома фаза – спирт етиловий 93,3%

Температура колонки - 40°

Колонка – SUPELCOSIL LC-ABZ; 15 × 4.6 mm, 5 μm

- Швидкість потоку 1,5 мл/хв

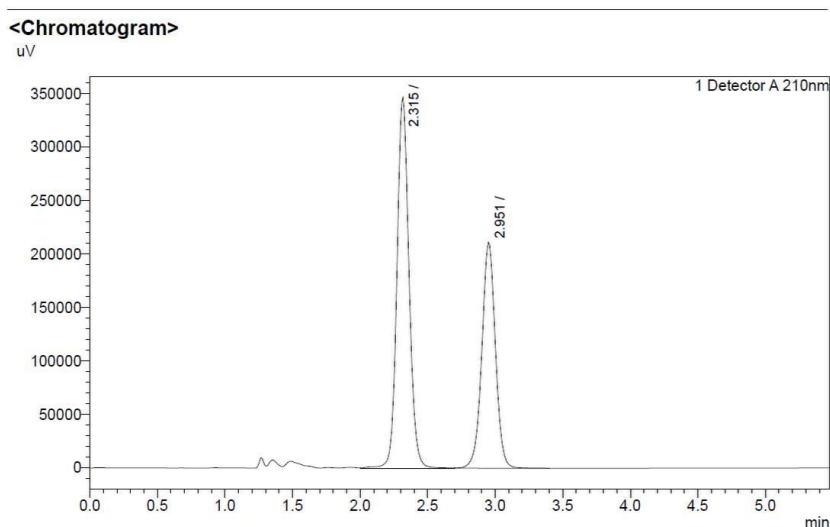


Рис.17. Хроматограма стандартного розчину сквалену з токоферолом ацетат для перевірки придатності системи при швидкості потоку 1,5 мл/хв.

При швидкості потоку 1,5 мл/хв тиск дорівнював 133 bar. При даному швидкості потоку час утримування сквалену становить 2,315, коефіцієнт розділення піку сквалену та токоферолу ацетат – 3,777. Число теоретичних тарілок (ефективність) становить 3380. Умови хроматографування:

Рухома фаза – спирт етиловий 93,3%

Температура колонки - 40°

Колонка – SUPELCOSIL LC-ABZ; 15 × 4.6 mm, 5 μm

- Швидкість потоку 2,0 мл/хв

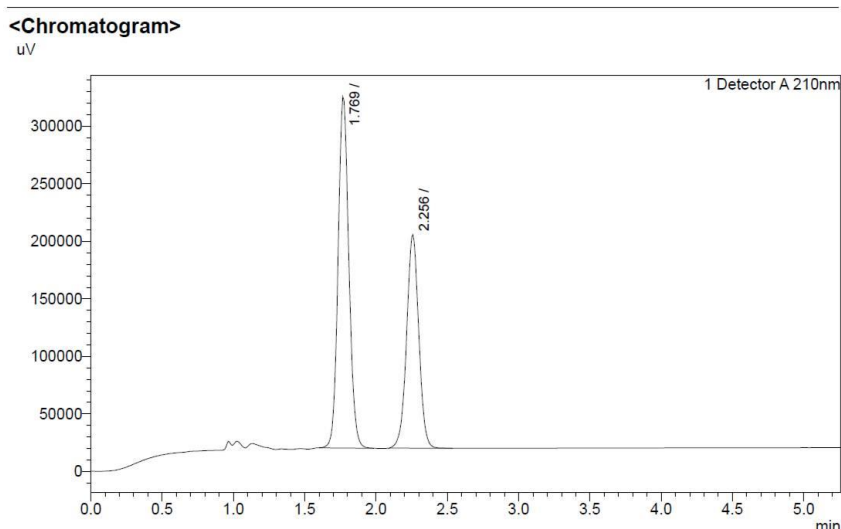


Рис.18. Хроматограма стандартного розчину сквалену та токоферолу ацетату для перевірки придатності системи при швидкості потоку 2,0 мл/хв.

При швидкості потоку 2,0 мл/хв тиск дорівнював 177 bar, час утримування піку сквалену становив 1,769, коефіцієнт розділення піку сквалену та токоферолу ацетат – 3,381, а число теоретичних тарілок – 2706. Умови хроматографування:

Рухома фаза – спирт етиловий 93,3%

Температура колонки - 40°

Колонка – SUPELCOSIL LC-ABZ; 15 × 4.6 mm, 5 μm

За проведеними дослідженнями та порівнянням отриманих даних, наведених у таблиці 3 найбільш ефективним є використання швидкості потоку 1,0 мл/хв, який забезпечує високу ефективність хроматографічного піку і не призводить до роботи хроматографічної системи під підвищеним тиском, який зумовлює в'язка етаноловмісна рухома фаза.

Таблиця 9. Результати досліджень стандартного розчину сквалену з токоферолом ацетатом отримані при виборі швидкості потоку.

Швидкість потоку	Ефективність (N)	Коефіцієнт	Ret. Time
------------------	-------------------	------------	-----------

		розділення (Rs(EP))	
0,8 мл/хв	4554	-	4.232
	5950	4.394	5.395
1,0 мл/хв	4062	-	3.408
	5270	4.131	4.342
1,5 мл/хв	3380	-	2.315
	4374	3.777	2.951
2,0 мл/хв	2706	-	1.769
	3486	3.381	2.256

3.4Вибір об'єму інжекції

Для вибору об'єму інжекції проводилось 6 хроматографувань з варіаціями об'єму інжекції : 1 мкл; 2 мкл; 5 мкл; 10 мкл; 20 мкл та 50 мкл.

- Об'єм інжекції 1мкл

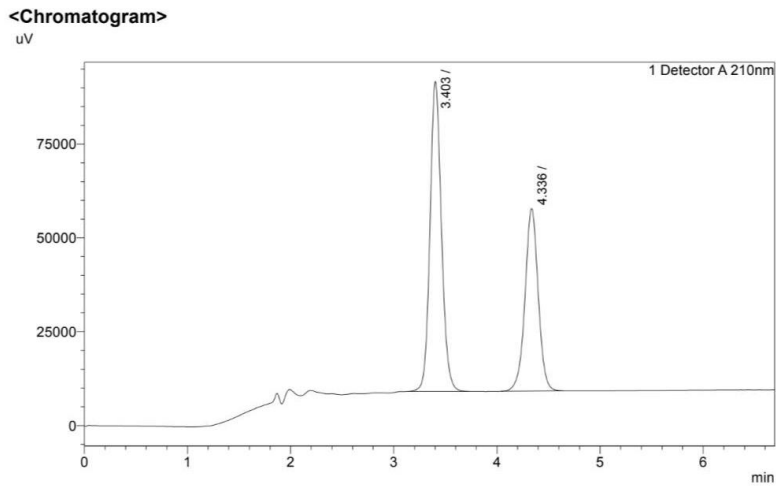


Рис.19. Хроматограма стандартного розчину сквалену з токоферолом ацетат для перевірки придатності системи при об'ємі інжекції 1 мкл.

При об'ємі інжекції в 1 мкл час утримування сквалену становить 3,403, коефіцієнт розділення піку сквалену та піку токоферолу ацетат - 4,400, число теоретичних тарілок – 4692. Умови хроматографування:

Рухома фаза – спирт етиловий 93,3%

Температура колонки - 40°

Швидкість потоку 1,0 мл/хв

Колонка – SUPELCOSIL LC-ABZ; 15 × 4.6 mm, 5 μm

- Об'єм інжекції 2 мкл

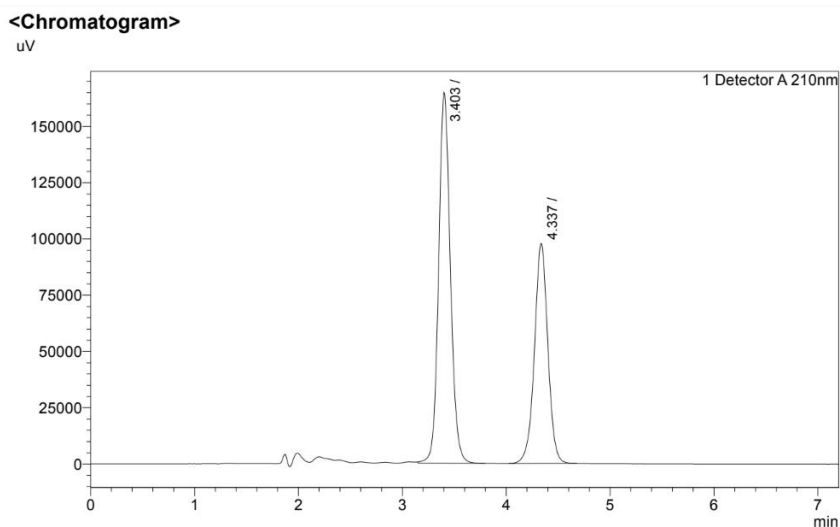


Рис.20. Хроматограма стандартного розчину сквалену з токоферолом ацетат для перевірки придатності системи при об'ємі інжекції 2 мкл.

При закові стандартного розчину сквалену з токоферолом ацетат в об'ємі інжекції 2 мкл ефективність становить 4566, час утримування сквалену – 3,403, коефіцієнт розділення сквалену з токоферолом ацетат – 4,354. Умови хроматографування:

Рухома фаза – спирт етиловий 93,3%

Температура колонки - 40°

Швидкість потоку 1,0 мл/хв

Колонка – SUPELCOSIL LC-ABZ; 15 × 4.6 mm, 5 μm

- Об'єм інжекції 5 мкл

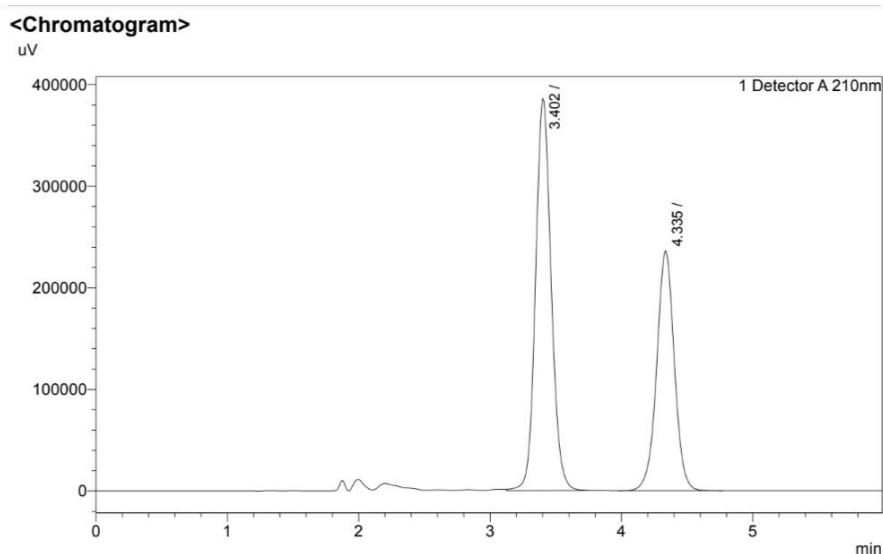


Рис.21. Хроматограма стандартного розчину сквалену з токоферолом ацетат для перевірки придатності системи при об'ємі інжекції 5 мкл.

За використання інжекції об'ємом 5 мкл час утримування піку сквалену становить 3,402, ефективність – 4067, коефіцієнт розділення сквалену з токоферолом ацетат – 4,140. Умови хроматографування:

Рухома фаза – спирт етиловий 93,3%

Температура колонки - 40°

Швидкість потоку 1,0 мл/хв

Колонка – SUPELCOSIL LC-ABZ; 15 × 4.6 mm, 5 μm

- Об'єм інжекції 10 мкл

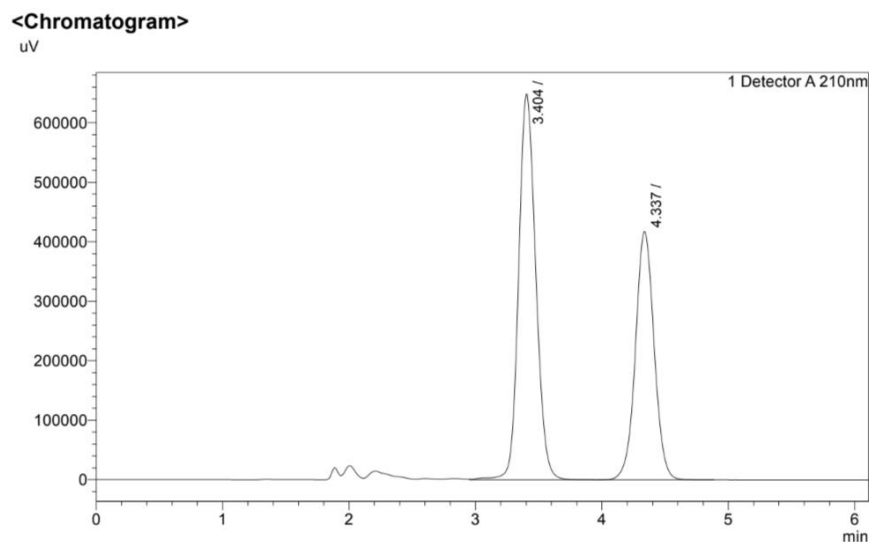


Рис. 22. Хроматограма стандартного розчину сквалену з токоферолом ацетат для перевірки придатності системи при об'ємі інжекції 10 мкл.

При інжекції об'ємом 10 мкл час утримування сквалену дорівнює 3,404, число теоретичних тарілок – 3080, коефіцієнт розділення піку сквалену та піку токоферолу ацетат - 3,658. Умови хроматографування:

Рухома фаза – спирт етиловий 93,3%

Температура колонки - 40°

Швидкість потоку 1,0 мл/хв

Колонка – SUPELCOSIL LC-ABZ; 15 × 4.6 mm, 5 μm

- Об'єм інжекції 20 мкл

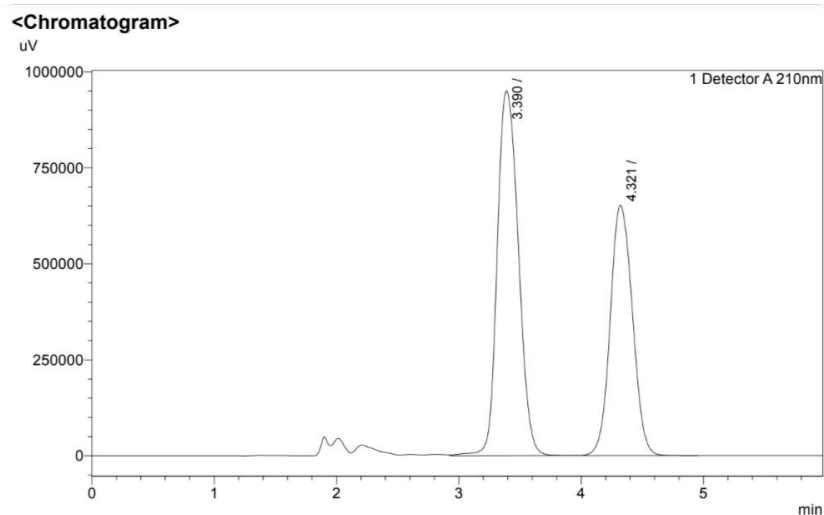


Рис. 23. Хроматограма стандартного розчину сквалену з токоферолом ацетат для перевірки придатності системи при об'ємі інжекції 20 мкл.

При інжекції об'ємом 20 мкл число теоретичних тарілок (ефективність) становить 1769, коефіцієнт розділення сквалену з токоферолом ацетат – 2,831, а час утримування піку сквалену – 3,390. Умови хроматографування:

Рухома фаза – спирт етиловий 93,3%

Температура колонки - 40°

Швидкість потоку 1,0 мл/хв

Колонка – SUPELCOSIL LC-ABZ; 15 × 4.6 mm, 5 μm

- Об'єм інжекції 50 мкл

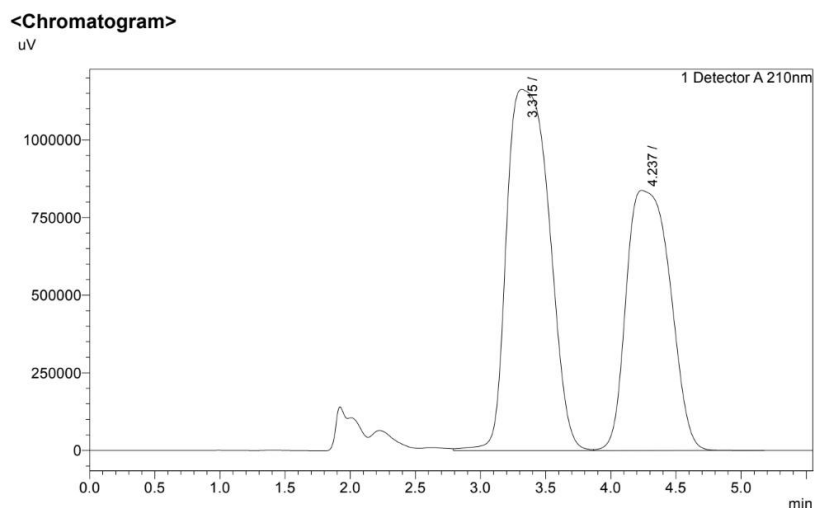


Рис. 24. Хроматограма стандартного розчину сквалену з токоферолом ацетат для перевірки придатності системи при об'ємі інжекції 50 мкл.

При інжекції об'ємом в 50 мкл час утримування сквалену становить 3,315, ефективність – 443, коефіцієнт розділення сквалену та токоферолу ацетат – 1,444, час утримування піку сквалену – 3,315. Умови хроматографування:

Рухома фаза – спирт етиловий 93,3%

Температура колонки - 40°

Швидкість потоку 1,0 мл/хв

Колонка – SUPELCOSIL LC-ABZ; 15 × 4.6 mm, 5 μm

Таблиця 10. Результати дослідження стандартного розчину сквалену з токоферолом ацетат отримані під час вибору об'єму інжекції.

Об'єм інжекції	Ефективність (N)	Коефіцієнт розділення (Rs(EP))	Ret.time
1 mcl	4692	-	3.403
	5869	4.400	4.336
2 mcl	4566	-	3.403

	5759	4.354	4.337
5 mcl	4067	-	3.402
	5287	4.140	4.335
10 mcl	3080	-	3.404
	4248	3.658	4.337
20 mcl	1769	-	3.390
	2628	2.831	4.321
50 mcl	443	-	3.315
	679	1.444	4.237

Зі збільшенням об'єму інжекції зменшується ефективність. Це пов'язано з ефектом сильного розчинника – ізопропанола, який не дозволяє молекулам аналіту рівномірно осідати на нерухомій фазі на старті хроматографічної колонки, а навпаки сприяє швидкій міграції частини молекул вглиб колонки. Тому, за проведеними дослідженнями та порівнянням отриманих даних, наведених у таблиці 4 найбільш ефективним є використання об'єму інжекції в діапазоні від 1-5 мкл.

Для подальшого вибору об'єму інжекції було проведено 6 послідовних інжекцій стандартного зразку сквалену і визначено стандартне відносне відхилення площі та часу утримування сквалену для інжекції 2 мкл і інжекції 5 мкл, які наведені в таблиці 11.

Таблиця 11. Результати перевірки придатності системи з розрахунком стандартного відносного відхилення інжекції.

	5 mcl	2 mcl
Інжекція 1	3516430	1417102
Інжекція 2	3515582	1419823
Інжекція 3	3516947	1419250

Інжекція 4	3516570	1425957
Інжекція 5	3515104	1424636
Середнє значення	3516126,6	1421353,6
SD	758,9484831	3768,600974
RSD, %	0,02	0,27

З даних наведених в таблиці 5 видно, що збіжність інжекції 5 мкл краща ніж 2 мкл, тому для методики обрано об'єм інжектування 5 мкл.

Розділ 4. Перевірка придатності системи та валідація методики

4.1 Перевірка придатності методики

Перед проведенням валідації методики було проведено перевірку придатності розробленої методики.

Для високорідинної хроматографії система вважається придатною: якщо стандартне відносне відхилення часу утримування 6 інжекцій стандартного зразку становить не більше 0,5%; якщо стандартне відносне відхилення площ піків 6-ти стандартних зразків сквалену становлять не більше 1%.

Тому, було розраховано стандартне відносне відхилення площ піків послідовних інжекцій. Відносне стандартне відхилення (RSD) площ піків при інжекції при 5 мкл становить 0,02%.

Таблиця 12. Результати перевірки придатності системи з розрахунком відносного стандартного відхилення площ піків та часів утримання.

№ інжекції	S, mAU*s	Ret.time, хв
------------	----------	--------------

Інжекція 1	3480749	4.343
Інжекція 2	3516430	4.344
Інжекція 3	3515582	4.344
Інжекція 4	3516947	4.344
Інжекція 5	3516570	4.346
Інжекція 6	3515104	4.444
Середнє значення	3510230,3	4,344
SD	14458,7	0,00098
RSD, %	0,41	0,023

Ефективність піку сквалену під час перевірки придатності системи становить 6101, за умови, що придатна система становить не менше 1500 теоретичних тарілок.

Розділення сквалену з токоферолом ацетат повинна становити не менше 1,5 на хроматограмі розчину для перевірки придатності системи. При дослідженні було встановлено, що коефіцієнт розділення речовин становить 5.686. Результати дослідження наведені у таблиці 7 та на рисунку 25.

Таблиця 13. Результати встановлення ефективності хроматографічної системи.

Речовина	Ret.time	N
Сквален	5.455	6101
Токоферол ацетат	3.999	4665

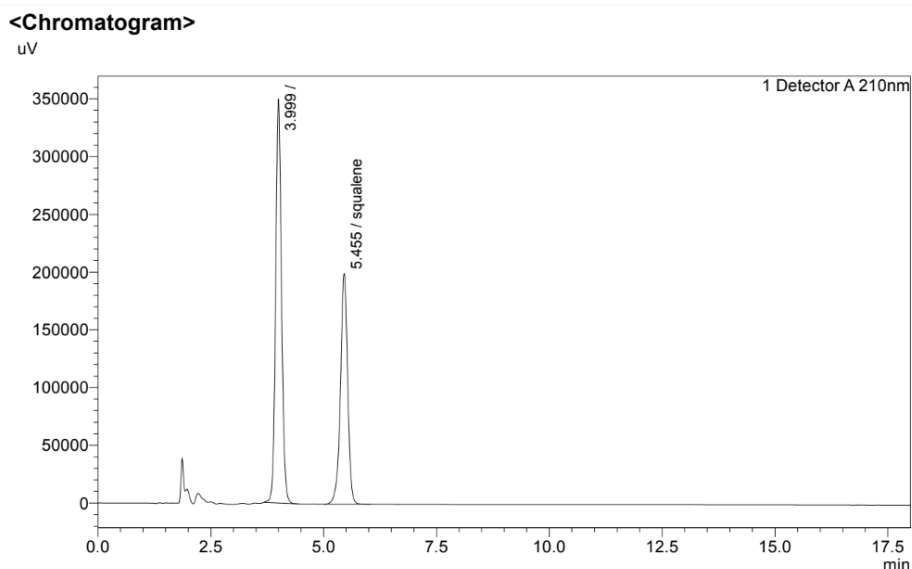


Рис. 27. Хроматограма розчину сквалену та токоферолу ацетат для перевірки придатності системи.

Симетрія піку сквалену за умов придатності системи повинна становити 0,8-2,0. З На хроматограмі (рисунок 27) симетрія піку сквалену становить 0,927.

Отже, зі згаданого вище дослідження, всі визначені параметри входять у межі норми, тому системи вважається придатною.

4.2 Специфічність

Для перевірки специфічності (селективності) хроматографічної системи було проведено хроматографування стандартного розчину сквалену з токоферолом ацетат для перевірки якості розділення двох даних речовин. На рисунку 28 показано що сквален та токоферол ацетат розділяються по базовій лінії, а коефіцієнт розділення речовин становить 5.686.

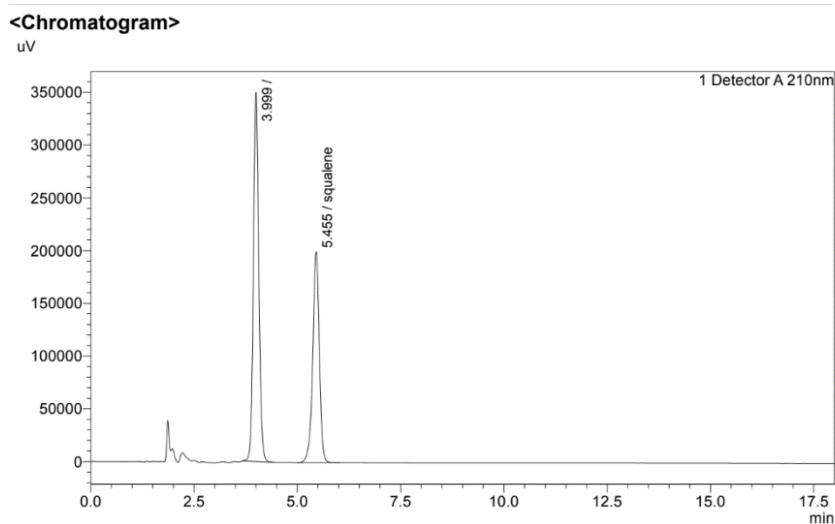


Рис.28. Хроматограма для перевірки придатності системи.

Для підтвердження відсутності піків, які можуть заважати при визначенні сквалену, було проведено хроматографування розчинника – 2-пропанолу (ізопропанолу) (Рисунок 29). Таких піків не було виявлено.

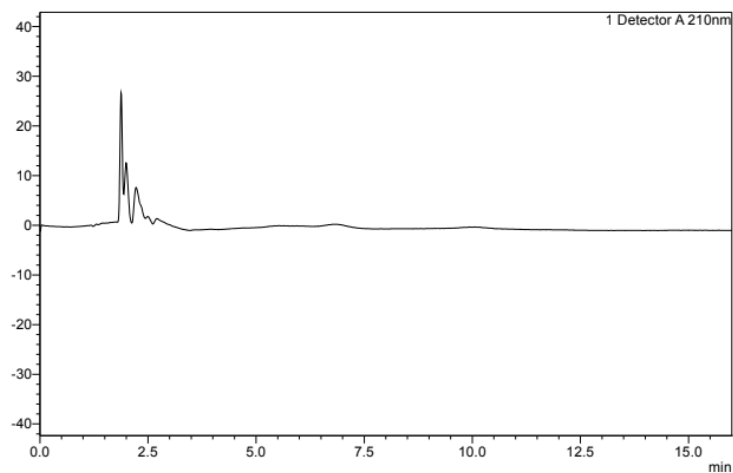


Рис.29. Хроматограма розчинника.

Під час дослідження було зрозуміло, що час утримування стандартного зразку та зразків олії співпадають. Час утримування стандартного зразку становить 5.229 , а досліджуваного розчину – 5.223

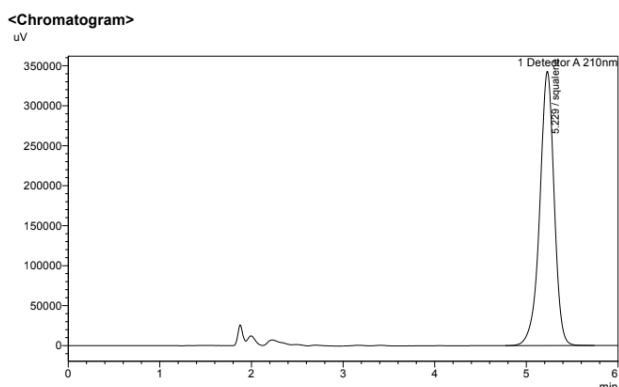


Рис.30. Хроматограма розчину стандарту.

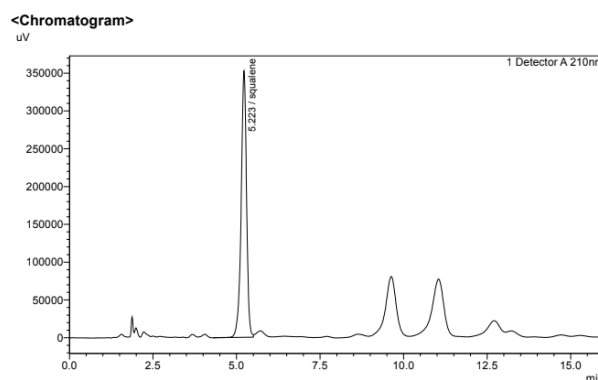


Рис. 31. Хроматограма досліджуваного розчину.

Тому, дана система є специфічною (селективною).

4.3 Лінійність та діапазон застосування

Для розрахунку лінійності сигнали (A_i та A_{st}) було представлено в нормалізованих координатах за такими формулами:

$$X_i = \frac{C_i}{C_{st}} \times 100\%$$

$$Y_i = \frac{A_i}{A_{st}} \times 100\%$$

Критерії прийнятності. Підхід базується на застосуванні принципу незначущості. Довірчий інтервал Δ_2 є значущим на рівні $p = 5\%$ (і незначущим на рівні $100 - p\% = 95\%$) порівняно з інтервалом Δ_1 , якщо сумарна невизначеність Δ_p перевищує Δ_1 не більше ніж на $p\%$, нерівність виконується:

$$\Delta_p = \sqrt{\Delta_1^2 + \Delta_2^2} \leq \left(1 + \frac{p}{100}\right) \times \Delta_1$$

$$\Delta_2 \leq 0.32 \times \Delta_1$$

Критерії прийнятності для залишкового стандартного відхилення S_0 розраховується за формулою:

$$\frac{s_0}{b} \leq \frac{\text{Max} \Delta_{As}}{t(95\%, n - 2)}$$

де: b - нахил кривої.

Критерії прийнятності для коефіцієнта кореляції (r) розраховують за формулою:

$$r \leq \sqrt{1 - \frac{SD_0^2}{SD_{rang}^2}}$$
$$SD_0 = \frac{Max\Delta_{As}}{t(95\%, n - 2)}$$

де: SD_{rang} – стандартне відхилення розраховане зі значень точок калібровки в процентах від номіналу

Критерії прийнятності для вільного члена лінійної залежності (a):

- статистична незначущість

$$a \leq t(95\%, n - 2) \times S_a$$

де: S_a – залишкова сума квадратів відхилень

- практична незначущість

$$a \leq \left| \frac{Max\Delta_{As}}{1 - \left(\frac{X_{min}}{100}\right)} \right|$$

де: X_{min} – найнижча точка калібрувальної кривої

Якщо значення вільного члена перевищує критерій статистичної незначущості, то його порівнюють з критерієм практичної незначущості.

Якщо значення відповідає критеріям практичної незначущості, то вважається, що він задовольняє вимоги вільного члена.

При проведенні валідації методики визначення сквалену, було отримано такі дані щодо лінійності методики

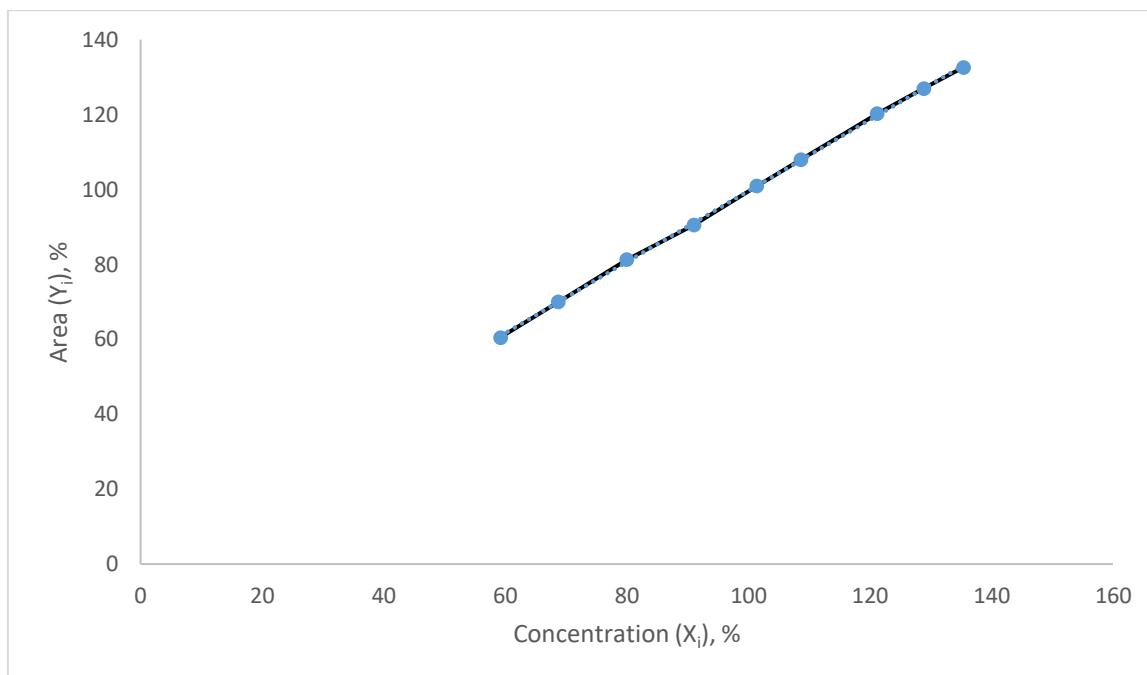


Рис. 32. Залежність сигналу сквалену від концентрації в нормалізованих координатах.

Таблиця 14. Результати визначення валідаційних параметрів

Концен-трація, мг/мл	Концен-трація (X _i), %	Площа	Середня Площа(Y _i), %	Правильність, %
0,119	63,8	2256173	60,5	102,17
0,13812	75,3	2609087	70,0	101,80
0,16084	78,5	3031736	81,3	101,58
0,18288	95,7	3373666	90,5	99,41
0,20372	96,9	3762612	100,9	99,53

0,21832	107,6	4022604	107,9	99,29
0,24346	121,7	4480343	120,2	99,17
0,25904	134,6	4735697	127,0	98,52
0,272	153,8	4943239	132,6	97,94
0,20204	Стандартний розчин 1	3735612		
0,19986	Стандартний розчин 2	3722132		

Таблиця 15. Характеристика калібрувальної кривої

Результати	Критерії прийнятності			
A	4.73	a_{\max} (Stat)	1.18	Відп.

		a_{\max} (Prac)	5.12	
S_a	0.624			
B	0.948			
S_b	0.006			
R	0.9997	Γ_{\min}	0.9923	Відп.
S_0/b	0.486	S_0/b_{\max}	3.39	Відп.

4.4 Правильність і збіжність.

Дослідження правильності і збіжності проводили з використанням даних калібрувальної кривої, які отримали при дослідженні лінійності та діапазону методики.

Правильність розраховували за такою формулою:

$$Z_i = \frac{Y_i}{X_i}$$

$$\delta = |\bar{Z} - 100|$$

Критерії прийнятності для правильності (δ , %):

- статистична незначущість

$$\delta \leq \frac{\Delta_{As}}{\sqrt{n}}$$

$$\Delta_{As} = t(95\%, n - 2) \times S_0$$

де: Δ_{As} – невизначеність аналізу

- практична незначущість

Практично незначущою похибкою вважають ту похибку, що менша максимально допустимої невизначеності аналізу

$$\delta \leq 0.32 \times \text{Max} \Delta_{As}$$

Якщо значення правильності методики перевищує критерій статистичної незначущості, то його порівнюють з критерієм практичної незначущості. Якщо ж значення задовольняє критерій практичної незначущості, то він відповідає вимогам правильності методики.

Збіжність було прораховано завдяки 9 визначенням правильності за формулою:

$$Z_i = \frac{Y_i}{X_i}$$

Критерій прийнятності. Невизначеність аналізу в заданому діапазоні концентрацій не перевищує максимальну невизначеність аналізу ($Max\Delta_{As}$)

$$t(95\%, n - 1) \times S_Z \leq Max\Delta_{As}$$

Таблиця 16. Результати правильності та збіжності

Результати		Критерії прийнятності		
Правильність (δ), %	0.07	δ_{max} (Stat)	0.96	Pass
		δ_{max} (Prac)	2.05	
Збіжність (Δ_{As}), %	2.88	$\Delta_{As}Max$	6.4	Pass

4.5 Дослідження стабільності розчину

Стабільність розчину- це здатність речовини зберігати свої фізико-хімічні та фармакологічні властивості протягом заданого терміну придатності.

Основним показником, що перевіряють при визначенні стабільності є кількісний вміст речовини у розчині чи лікарській формі.

Об'єктом досліджень було обрано зразок розчину сквалену (ST1) та модельний розчин сквалену (Mod. Sol. 5), наважкою 101,02 мг та 101,85 мг відповідно.

Інтервал досліджень розчину ST1 становив близько 20 годин, за цей час площа піку змінилась на -0.1%. Розчин Mod.Sol 5 досліджувався з інтервалом у 16 годин 29 хвилин, розчин змінився на 0.07%. Тому за даними показниками, що наведені у таблиці можна стверджувати, що розчини сквалену є стабільними з критерієм не більше 2,048%.

Таблиця 17. Результати дослідження стабільності модельного розчину сквалену та стандартного розчину сквалену.

	ST1		Mod. Sol. 5	
Дата та час дослідження	16.02.2023 16:42	17.02.2023 11:46	16.02.2023 19:37	17.02.2023 12:06
Площа піку 1	3742160	3747963	3688709	3687470
Площа піку 2	3747891	3751283	3689880	3684628
Площа піку 3	3743217	3747782	3688498	3686934
Середнє значення	3744422.667	37490009.333	3689029	3686344
%	-0.1		0.07	
Різниця часу	19 годин 46 хвилин		16 один 29 хвилин	

4.6 Внутрішньолабораторна збіжність та прецизійність

Внутрішньолабораторну збіжність було визначено шляхом порівняння 6 розчинів із концентрацією діючої речовини 0,2 мг/мл.

Внутрішньолабораторна прецизійність була визначена порівнюючи отримані результати двох аналітиків, дослідження були проведені у різні дні. Отримані результати прецизійності наведені у таблиці 12.

Таблиця 18. Результати визначення прецизійності методики.

Розчин	Кількісний вміст сквалену, %	
	Аналітик 1	Аналітик 2
1	6.52	6.47
2	6.48	6.48
3	6.48	6.55
4	6.46	6.53
5	6.49	6.55
6	6.48	6.57
Середнє значення	6.49	6.52
RSD st, %	0,11%	0,08%
RSD внутрішньолабораторної прецизійності,%	0,28%	0,61%
Відносна різниця середніх значень, %	0,46	

Дані дослідження підтверджують, що відносне стандартне відхилення та відносна різниця середніх значень не перевищує 6,4%, що свідчить про належну відтворюваність результатів.

4.7 Робастність

Робастність методу визначалась за зміною хроматографічної колонки (нерухомої фази) з SUPELCOSIL ABZ на SUPLEX PKB-100. Відповідно до цього було проведено хроматографування стандартних зразків сквалену та випробовуваних зразків олії з метою кількісного визначення сквалену.

В таблиці 19 наведені результати визначення робастності.

Таблиця 19. Результати вивчення робастності методики кількісного визначення сквалену в олії амаранту методом високорідинної хроматографії.

	Кількісне визначення сквалену
SUPELCOSIL ABZ	6,47%
SUPLEX РКВ 100	6,62%
Різниця,%	2,3%

З даних наведених у таблиці 19 можна стверджувати, що методика кількісного визначення сквалену у олії амаранту є робастною, оскільки різниця між значеннями кількісного визначення не перевищує максимально допустиму 6,4%.

ВИСНОВКИ

1. У проведених дослідженнях було встановлено, що фактори утримування сквалену при використанні різних хроматографічних колонок можуть відрізнятися і залежати від характеристик колонок.
2. Показано, що оптимальне розділення з компонентами олії досягається при використанні нерухомих фаз з прищепленими алкільними групами з амідними вставками (Supelcosil LC-ABZ, Suplex рКb-100). Екобезпечність методики досягається застосуванням «зеленого» розчинника – етанолу.
3. Проведена валідація розробленої методики визначення сквалену в олії амаранту показала її високу прецизійність, специфічність, лінійність, правильність та робасність у відповідності до вимог ДФУ.
4. Апробація розробленої методики визначення сквалену в екстрагованій олії дозволила успішно визначити кількість сквалену в досліджених зразках з високою точністю та достовірністю.

ДОДАТКИ

Додаток А. Термінологія, що застосована у дослідженні

Час утримування речовини, t_R , – час перебування речовини, яку досліджують, у колонці (рис. А-1). Практично його визначають від моменту введення розчину речовини в колонку до моменту реєстрації максимального сигналу.

Об'єм утримування, V_R , – об'єм рухомої фази, витрачений на елюювання аналіту, який можна розрахувати за формулою:

$$V_R = t_R \times F_c,$$

де F_c – об'ємна швидкість рухомої фази.

На практиці для порівняння даних, отриманих на різному хроматографічному обладнанні, використовують приведений час (об'єм) утримування, значення якого не залежить від параметрів приладу та об'ємів, не пов'язаних з хроматографічною колонкою. Приведений час (об'єм) утримування дорівнює різниці між загальним часом (об'ємом) елюювання та «мертвим» часом (об'ємом), останній визначають як час (об'єм) утримування речовини, що не утримується на колонці:

$$V'_R = V_R - V_M,$$

$$t'_R = t_R - t_M = \frac{V_R - V_M}{F_c} = \frac{V'_R}{F_c},$$

де

V'_R – приведений об'єм утримування;

V_M – «мертвий» об'єм утримування;

t'_R – приведений час утримування;

t_M – «мертвий» час утримування.

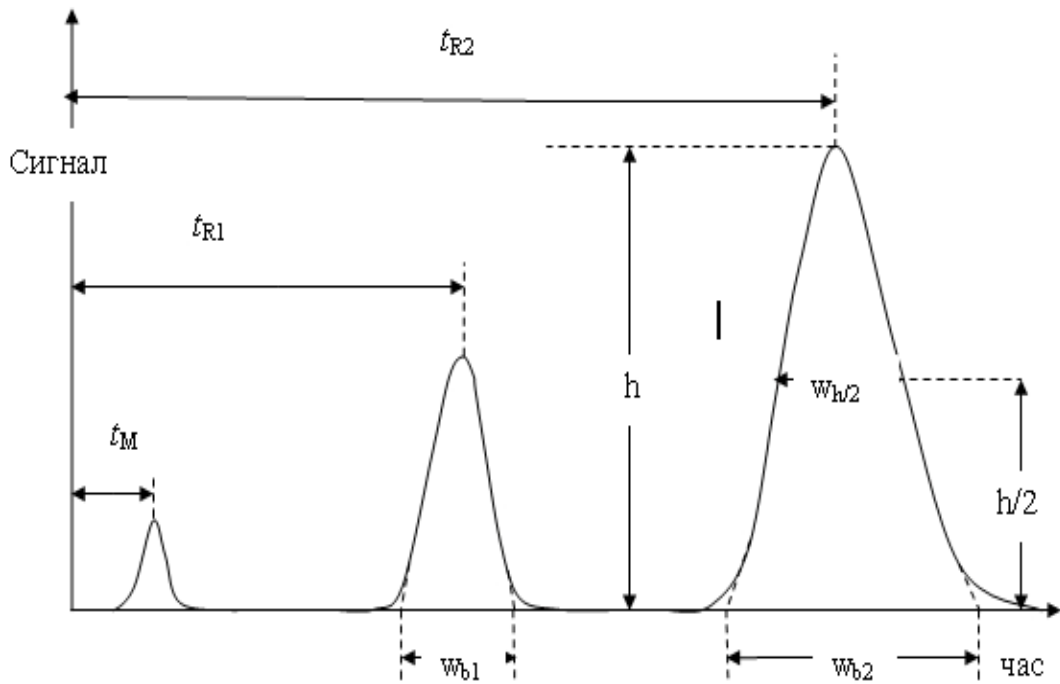


Рис. А-1 Схематичне зображення хроматограми та її головні параметри

Найбільш важливим параметром утримування в рідинній хроматографії є фактор утримування, k :

$$k = K_C \times \frac{V_S}{V_M} = \frac{t'_R}{t_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M},$$

де

V_S – об'єм стаціонарної фази у колонці;

V_M – об'єм рухомої фази в колонці;

K_C – коефіцієнт розподілу речовини між нерухоною та рухоною фазами.

Здатність хроматографічної системи, що складається з рухомої та стаціонарної фази, розділяти речовини характеризують фактором розділення, $\alpha_{i,j}$, що може набувати значень від 1 до ∞ :

$$\alpha_{i,j} = \frac{V'_{Ri}}{V'_{Rj}} = \frac{t'_{Ri}}{t'_{Rj}} = \frac{k_i}{k_j},$$

де

i – індекс речовини, що більше утримується;

j - індекс речовини, що менше утримується.

Розділення двох речовин характеризують ступенем розділення, R_S :

$$R_S = \frac{2 \times (t_{R2} - t_{R1})}{w_{b1} + w_{b2}} = \frac{1.18 \times (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}},$$

де

w_{b2} , w_{b1} – ширина хроматографічних піків на рівні основи;

w_{h2} , w_{h1} – ширина хроматографічних піків на рівні половини висоти піку.

Розділення хроматографічних піків тим краще, чим більше різниця у факторах утримування та менша ширина піків.

Валідація – експертна оцінка і представлення документально оформлених доказів у відповідності з принципами належної виробничої практики, які з високим ступенем достовірності підтверджують, що будь-які методики, процеси, обладнання, продукція, дії або системи дійсно відповідають своєму призначенню і встановленим вимогам, а їх використання веде до очікуваних результатів.

Основною метою валідації є документальне доведення, що будь-які методики, процеси, обладнання, продукція, дії або системи дійсно відповідають своєму призначенню і встановленим вимогам і їх використання забезпечує стабільний випуск готової продукції необхідної якості.

Валідація аналітичної методики – одержання і документування експериментальних доказів, що засвідчують відповідність вибраної аналітичної методики своєму призначенню.

Аналітична методика – детальний опис способу здійснення аналізу, включаючи підготовку зразків, стандартних зразків і реактивів, використання приладу, побудову калібрувальних графіків, використання формул для розрахунку.

Ідентифікація – підтвердження істинності аналізованого об'єкту.

Дослідження на чистоту – визначення вмісту домішок в аналізованому об'єкті, дослідження на споріднені речовини, важкі метали, вміст залишків розчинників.

Кількісне визначення – визначення вмісту чи активності аналізованої речовини в об'єкті [30].

Методологія валідації аналітичних методик передбачає визначення таких типових валідаційних характеристик:

Специфічність (Specificity) – здатність однозначно оцінювати аналізовану речовину в присутності інших компонентів, які можуть бути у зразку. Це можуть бути домішки, продукти розкладу, допоміжні речовини тощо.

При кількісному визначенні специфічність може бути встановлена шляхом порівняння результатів, отриманих при застосуванні аналітичної методики для визначення аналізованої речовини в зразку в присутності очікуваної кількості інших компонентів із результатами, отриманими для тієї ж аналізованої речовини без додавання інших речовин [29].

Правильність (Accuracy) – характеризує ступінь відповідності між отриманим значенням та відомим істинним значенням або довідковою

величиною. Висновок про правильність можна зробити після того, як встановлено прецизійність, лінійність і специфічність [30].

Правильність оцінюють не менше ніж для дев'яти визначень та не менше ніж для трьох різних концентрацій, що охоплюють весь діапазон застосування. Визначення повинні включати всі стадії методики.

Правильність виражають у відсотках знайденого значення від введеної кількості або як різниця між середнім і істинним значенням з урахуванням відповідних довірчих інтервалів [30].

Точність (Precision) – характеризує ступінь близькості (або ступінь розкиду) результатів для серії вимірювань, виконаних на різних пробах одного й того ж однорідного зразка. Прецизійність (точність) аналітичної методики зазвичай характеризують дисперсією, стандартним відхиленням або відносним стандартним відхиленням для серії вимірювань.

Збіжність характеризує ступінь узгодженості результатів вимірювань (випробувань), отриманих одним і тим же методом на ідентичних об'єктах випробувань, в одній і тій же лабораторії, одним і тим же оператором, з використанням одного і того ж обладнання, в межах короткого проміжку часу.

Внутрішньолабораторна прецизійність (intermediate precision) характеризує вплив внутрішньо лабораторних варіацій: різні дні, різні аналітики, різне обладнання та інше.

Відтворюваність характеризує міру збігу результатів вимірювань, отриманих одним і тим же методом, на ідентичних зразках, в різних лабораторіях, різними операторами, з використанням різного обладнання, відносно довгий проміжок часу між вимірами, роздільні, ймовірно ідентичні зразки, взяті з однієї партії матеріалу [30].

Межа виявлення (Detection Limit) – являє собою мінімальну кількість речовини, яку визначають у зразку, і яка може бути виявлена (але не обов'язково визначена кількісно). Межу виявлення виражають в значеннях концентрації аналізованої речовини в зразку (мкг/л) [30].

Межа кількісного визначення (Quantitation Limit) – мінімальна кількість речовини яку визначають у зразку, яка може бути кількісно визначена з належною правильністю та точністю.

Значення межі кількісного визначення повинно бути підтверджено аналізом необхідної кількості зразків з вмістом аналізованого речовини, близьким до межі кількісного визначення [29].

Лінійність (Linearity) – здатність методики (в межах діапазону застосування) давати величини, прямо пропорційні концентрації (кількості) речовини, яку визначають у зразку.

Діапазон застосування (Range) – інтервал між мінімальною та максимальною концентраціями (кількостями) речовини, яку визначають у зразку (включно ці концентрації), для якого показано, що аналітична методика має належну точність, правильність та лінійність. Діапазон аналітичної методики встановлюють за допомогою перевірки того, що дана методика забезпечує допустиму правильність, точність, лінійність при аналізі ряду зразків, що містять визначувану речовину в кількості, що знаходиться на верхній і нижній межі необхідного діапазону, а також всередині нього [28,29].

Робастність (Robustness) – здатність аналітичної методики не піддаватися впливу незначних, заданих (контрольованих) аналітиком змін в умовах виконання методики. Є показником надійності методики при її використанні у зазначених умовах. Робастність аналітичної методики визначають за допомогою аналізу окремих ідентичних зразків із однієї і тієї ж однорідної серії в різних лабораторіях, за допомогою різних аналітиків,

різних приладів, різних серій реактивів, різного часу аналізу, в змінених природних умовах (температура, вологість). Міра стійкості аналітичної методики може бути отримана шляхом порівняння відтворюваності отриманих результатів з відтворюваністю дослідження при нормальних умовах [30].

Додаток Б. Сертифікати публікацій



СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. В.П. Гальцев, П.І. Стоцький, Сєнік В.Б. “Огляд застосування амаранту та один способів отримання амарантової олії, як джерела сквалену”, Аграрний вісник Причорномор’я, 2016.
2. Е. Н. Музалевская et al., “Сквален: филиологические и фармакологические свойства,” 2015.
3. Г. И. Высочина, Химия растительного сырья, № 2, 5-14 (2013).
4. Визначення сквалену – унікального фітостерину ліпідів методом газорідної хроматографії / Кіщенко В. А., Левчук І. В., Осейко М. І., Голубець О. В., Литвиненко О. А. // Вісник НТУ «ХП». Серія: Нові рішення в сучасних технологіях. – Х: НТУ «ХП», – 2013. - № 11 (985). – С. 137-141. – Бібліогр.:15 назв.
5. S. Lopez, B. Bermudez, S. Montserrat-de la Paz et al., “Membrane composition and dynamics: a target of bioactive virgin olive oil constituents,” *Biochimica et Biophysica Acta–Biomembranes*, vol. 1838, no. 6, pp. 1638–1656, 2014
6. G. P. Ghimire, H. T. Nguyen, N. Koirala, and J. K. Sohng, “Advances in biochemistry and microbial production of squalene and its derivatives,” *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 26, no. 3, pp. 441–451, 2016.
7. Kiss R., Gaudet D., Engert J. C. Squalene syntese: a critical enzyme in cholesterol biosynthesis pathway // *Clin. Cenet*. 2009. 19-29.
8. L. H. Reddy and P. Couvreur, “Squalene: a natural triterpene for use in disease management and therapy,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 61, no. 15, pp. 1412–1426, 2009.
9. K. Wołosik, M. Kna’s, A. Zalewska, and M. Niczyporuk, “+e importance and perspective of plant-based squalene in cosmetology,” *Journal of Cosmetic Science*, vol. 64, no. 1, pp. 19–65, 2013
- 10.S. Lopez, B. Bermudez, S. Montserrat-de la Paz et al., “Membrane composition and dynamics: a target of bioactive virgin olive oil constituents,” *Biochimica et Biophysica Acta–Biomembranes*, vol. 1838, no. 6, pp. 1638–1656, 2014
- 11.K. Gopakumar and T. K. Thankappan, “Squalene, its source, uses and industrial applications”.
- 12.URL:<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/638072#section=Viscosity>.
- 13.J. F. Remme, W. E. Larsen, and I. S. Stoknes, “Bioactive lipids in deep-sea sharks,” Report A0510 Project: Search for Bioactive Lipids in

Internal Organs From Deep-Sea Sharks, More Research, Ålesund, Norway, 2005

14. H. T. Lu, Y. Jiang, and F. Chen, "Determination of squalene using high-performance liquid chromatography with diode array detection," *Chromatographia*, vol. 59, no. 5–6, pp. 367–371, Mar. 2004, doi: 10.1365/s10337-003-0176-6.
15. URL: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/2323/ekstrakciya>
16. Mlakar S. G., Turinek M., Jakop M., Bavec M., Bavec F. Grain amaranth as an alternative and perspective crop in temperate climate. *Journal for Geography*. 2010;5(1):135–145
17. Shweta Srivastava, Yadahally N. Sreerama, Usha Dharmaraj Effect of processing on squalene content of grain amaranth fractions. *Journal of Cereal Science*. 2021
18. Czaplicki S., Ogrodowska D., Zadernowski R., Derewiaka D. Characteristics of biologically-active substances of amaranth oil obtained by various techniques. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*.
19. Lippi G, Targher G, Franchini M. Vaccination, squalene and antisqualene antibodies: facts or fiction *Eur J Intern Med*. 2010; 21: 70-73.
20. Owen RW, Mier W, Giacosa A, Hull WE, Spiegelhalder B, Bartsch H. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chem Toxicol*. 2000; 38: 647-659.
21. Shodiev D., Haqiqatkhon D., Zulaykho A. Useful properties of the amaranth plant // *ResearchJet Journal of Analysis and Inventions*. – 2021.- Т.2.-№5-6 (86).-С.74-78.
22. Smith TJ. Squalene: potential chemopreventive agent. *Expert Opin Invest. Drugs*. 2000; 9: 1841-1848
23. LEBSKA, Tatiana, Lyubov GRIGORIEVA, and Petro KARPOVEC. "Особливості хімічного складу та перспективи використання біологічно активної добавки" Сквямарин". *Commodities and markets* 9.1 (2010): 67-73.
24. URL: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/237/хроматографиya>
25. Зінченко О.А., Боброва М.Є. "Визначення сквалену в рослинних оліях методом високоефективної рідинної хроматографії". 2012
26. C. Yuan, Y. Ju, R. Jin, L. L. Ren, and X. Liu, "Simultaneous HPLC–DAD Analysis of Tocopherols, Phytosterols, and Squalene in Vegetable Oil Deodorizer Distillates," *Chromatographia*, vol. 78, no. 3–4, pp. 273–278, Feb. 2015, doi: 10.1007/s10337-014-2826-2.
27. C. Yuan et al., "Simultaneous Analysis of Tocopherols, Phytosterols,

and Squalene in Vegetable Oils by High-Performance Liquid Chromatography,” *Food Analytical Methods*, vol. 10, no. 11, pp. 3716–3722, Nov. 2017, doi: 10.1007/s12161-017-0927-x.

28. Валідація аналітичних методик і випробувань. Державна Фармакопея України. Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е видання. Харків : РІРЕГ, 2001. С.58 – 67. Доповнення 1. 2004. С. 2 – 4.
29. Георгіянц В.А. Валідація аналітичних методик у фармації : теорія, нормативні аспекти, проблеми практики. В.А. Георгіянц. О.А. Євтіфєєва. *Фармацевтичний часопис*. 2007. №2. С.13 – 18.
30. Гризодуб А.И. Валидация спектофотометрических методик количественного анализа лекарственных средств в соответствии с требованиями ГФУ. *Фармаком*. 2002. №3. С.42 – 50.