

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
БУКОВИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Кафедра медичної та фармацевтичної хімії**

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

за спеціальністю 226 Фармація, промислова фармація

спеціалізація 226.01 Фармація

на тему:

**РОЗРОБКА МЕТОДИКИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТА КІЛЬКІСНОГО
ВИЗНАЧЕННЯ КАРОТИНОЇДІВ У СКЛАДІ РАНОЗАГОЮВАЛЬНОЇ
МАЗІ З ОБЛІПХОВОЮ ОЛІЄЮ**

Виконав: здобувач вищої освіти
V курсу, 2 групи
фармацевтичного факультету, спеціальність 226
Фармація, промислова фармація,
спеціалізація 226.01 Фармація
денна форма здобуття вищої освіти
ЧАЮН Владислав Вікторович

Керівник: доцент закладу вищої освіти
кафедри медичної та фармацевтичної хімії,
кандидат фармацевтичних наук,
ГРУДЬКО Володимир Олексійович

Рецензенти: доцент закладу вищої освіти
кафедри біоорганічної і біологічної хімії та
клінічної біохімії,
кандидат біологічних наук,
ЯРЕМІЙ Ірина Миколаївна
старший викладач закладу вищої освіти
кафедри фармацевтичної ботаніки та
фармакогнозії,
кандидат фармацевтичних наук,
САХАЦЬКА Інна Михайлівна

До захисту допущено

протокол № ____ від _____ р.

засідання кафедри медичної та фармацевтичної хімії

Завідувач кафедри _____ проф. Віталій ЧОРНОУС

Чернівці – 2025

Зміст

Вступ		3
Глава 1	Обліпіха крушиновидна – ботанічна та фармакогностична характеристика, хімічний склад. ранозагоювальні мазі – класифікація застосування	6
	1.1 Обліпіха: ботанічна характеристика, склад та фармакологічні властивості	6
	1.2 Каротиноїди: структура, властивості та біологічна роль	9
	1.3 Ранозагоювальні мазі: класифікація та застосування	12
	1.4 Одержання та характеристика обліпіхової олії	19
Глава 2	Методи якісного та кількісного визначення каротиноїдів	24
	2.1 Підходи до аналізу каротиноїдів у мазях, супозиторіях	24
	2.2 Ідентифікація каротиноїдів	28
	2.3 Кількісне визначення каротиноїдів	34
	2.4 Фактори, що впливають на точність визначення каротиноїдів	41
Глава 3	Розробка методик ідентифікації і кількісного визначення суми каротиноїдів в ранозагоювальній мазі	47
	3.1 Об'єкт дослідження та визначення розчинника	47
	3.2 Розробка методики пробопідготовки	47
	3.3 Спектрофотометричне дослідження мазі	48
	3.4 Ідентифікація β -каротину у ранозагоювальній мазі	51
	3.5. Розрахунок невизначеності пробопідготовки	53
	3.6. Кількісне визначення суми каротиноїдів у ранозагоювальній мазі з обліпіховою олією	55
	3.7 Вивчення валідаційної характеристики «Лінійність» для розробленої спектрофотометричної методики	58
Висновки		62
Список використаної літератури		64

ВСТУП

Фітотерапія має багатовікову історію. Перші документальні згадки про лікування за допомогою рослин містяться в папірусі Еберса (1570 р. до н.е.) та глиняних табличках із бібліотеки асирійського царя Ашурбаніпала (668–631 рр. до н.е.). У праці *Corpus Hippocraticum*, що належить відомому лікарю Гіппократу (460–377 рр. до н.е.), описано 236 лікарських рослин.

Серед найвидатніших арабських знавців лікарських рослин були Авіценна та Абу Райхана Беруні (X–XI ст. н.е.). Європейська фітотерапевтична спадщина включає поему «Ода із Мена» Мацера Флоридуса та салернський Кодекс про здоров'я Арнольда з Віланови. У XVI столітті розвинулася ятрохімія, а Парацельс запропонував методи очищення екстрактів і заклав основи створення новогаленових препаратів.

В Україні досвід застосування лікарських рослин узагальнено в наукових працях таких дослідників, як З. Болтарович, М.А. Носаль, І.М. Носаль, О. Попов, Г. Смик, В. Комендар, В. Копуха, Є. Товстуха та інші.

Сучасна медицина, біологія та фармація стрімко розвиваються, що сприяє зростанню інтересу до фітотерапії. Люди все частіше звертають увагу на унікальні властивості фітопрепаратів і їхній багатий хімічний склад. Рослини продукують сполуки майже всіх груп біологічної дії, тому фітотерапія активно застосовується в більшості країн Європейського Союзу не лише як елемент народної медицини, а й як важлива складова традиційної медицини. Завдяки цьому з'являється можливість глибшого вивчення хімічного складу рослинних лікарських засобів, зокрема таких біологічно активних сполук, як алкалоїди, каротиноїди, флавоноїди та фенольні сполуки.

Сучасні фітопрепарати відповідають вимогам якості, ефективності та безпеки, характеризуються високою біодоступністю, відсутністю токсичних сполук і мінімальним ризиком побічних ефектів.

Важливим етапом впровадження лікарських засобів рослинного походження у фармацевтичну практику є їхня стандартизація. Сьогодні активно розробляються нові підходи до хімічної стандартизації лікарської рослинної

сировини та фітопрепаратів, удосконалюються методи ідентифікації та кількісного визначення біологічно активних речовин.

Перспективним джерелом біологічно активних речовин для створення лікарських засобів є обліпихова олія – препарат, отриманий із плодів обліпихи крушиновидної (*Hippophae rhamnoides* L.). Завдяки унікальному хімічному складу, обліпихова олія широко застосовується у медицині, зокрема у складі мазей із ранозагоювальною, протизапальною та регенеративною дією. Вона є офіційною сировиною, проте для забезпечення ефективності її використання необхідне ретельне дослідження її якісного та кількісного складу.

Фармакологічна активність обліпихової олії значною мірою зумовлена високим вмістом каротиноїдів – природних пігментів, які належать до класу тетратерпенів. Вони відіграють важливу роль у процесах регенерації тканин, захисту клітин від оксидативного стресу та стимуляції імунної відповіді. Основними каротиноїдами, що містяться в обліпиховій олії, є β -каротин, лікопін, зеаксантин і лютеїн. Завдяки своїм антиоксидантним властивостям ці сполуки прискорюють загоєння ран та сприяють відновленню пошкоджених тканин.

Впровадження у виробництво лікарських засобів на основі обліпихової олії потребує розробки ефективних методик контролю їх якості. Сучасний підхід передбачає застосування комплексу фізико-хімічних методів аналізу, зокрема спектрофотометрії та хроматографії, для забезпечення максимальної точності та відтворюваності результатів. Оцінка критеріїв гарантії якості та розробка методик ідентифікації та кількісного визначення каротиноїдів у складі ранозагоювальної мазі з обліпиховою олією є основним завданням даного дослідження.

Актуальність. Вивчення лікарської рослинної сировини та розробка методів аналізу її хімічного складу є важливими напрямками розвитку фармацевтичної науки. На українському ринку представлені препарати, що містять обліпихову олію, однак для їхньої стандартизації необхідні науково обґрунтовані методи визначення основних біологічно активних сполук. Тому

розробка якісної методики ідентифікації та кількісного аналізу каротиноїдів у складі мазей із обліпиховою олією є актуальним завданням сучасної фармацевтичної хімії.

Мета дослідження. Розробити методики ідентифікації та кількісного визначення діючих речовин обліпихи крушевидної у складі ранозагоювальної мазі, придатні для контролю якості серій мазі, виготовлених екстемпорально в умовах аптеки.

Завдання дослідження. Підібрати тести для ідентифікації та розробити методики кількісного визначення каротиноїдів для ранозагоювальної мазі з олією обліпихи.

Об'єкт дослідження. Мазь ранозагоювальна з олією обліпихи виробництва аптеки «Гармонія 2000».

Предмет дослідження. Ідентифікація та кількісне визначення активних інгредієнтів у мазі з олією обліпихи.

Методи дослідження. Спектрофотометрія, ТШХ

Практичне значення отриманих результатів. Результати досліджень можуть бути використані для стандартизації складу та контролю якості ранозагоювальної мазі з обліпиховою олією шляхом якісного та кількісного визначення каротиноїдів.

Елементи наукових досліджень. Вивчення хімічного складу ранозагоювальної мазі з обліпиховою олією, розробку та валідацію методик якісного і кількісного визначення каротиноїдів.

Апробація результатів дослідження і публікації. Окремі аспекти дослідження (постановка проблеми, обґрунтування актуальності теми, формулювання завдань дослідження) висвітлювалися в тезах всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «АКТУАЛЬНІ ПИТАННЯ СУЧАСНОЇ МЕДИЦИНИ ТА ФАРМАЦІЇ - 2025» м. Запоріжжя.

Структура і обсяг кваліфікаційної роботи. Робота складається з трьох частин. В першій наведена характеристика та властивості обліпихи крушиновидної, у другій висвітлені методи якісного та кількісного аналізу

каротиноїдів, у третій наведено експериментальні результати кількісного визначення діючих речовин лікарського засобу, що аналізувався.

ГЛАВА 1. ОБЛІПИХА КРУШИНОВИДНА – БОТАНІЧНА ТА ФАРМАКОГНОСТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА, ХІМІЧНИЙ СКЛАД. РАНОЗАГОЮВАЛЬНІ МАЗІ – КЛАСИФІКАЦІЯ ЗАСТОСУВАННЯ

1.1. Обліпіха: ботанічна характеристика, склад та фармакологічні властивості

Обліпіха (*Hippophae rhamnoides* L.) – це листопадний чагарник або невелике дерево, що належить до родини Elaeagnaceae (Лохові). [1] Завдяки унікальному складу біологічно активних речовин ця рослина широко використовується у медицині, косметології та фармацевтиці. Обліпіхова олія, яка є основним продуктом переробки ягід обліпихи, багата на каротиноїди, токофероли, стерини, флавоноїди, органічні кислоти та інші корисні компоненти. [15]



1.1.1. Ботанічна характеристика обліпихи

Обліпіха – це колючий чагарник або невелике дерево, що досягає 1,5–6 метрів у висоту. Рослина має розгалужену кореневу систему, яка здатна фіксувати азот із ґрунту, покращуючи його склад. Листя обліпихи ланцетоподібне, вузьке, сріблясто-зеленого кольору. Квіти дрібні, жовтувато-зелені, утворюються до появи листя і запилюються вітром [24].



Плоди – невеликі ягоди (неправжня кістянка) кулястої або овальної форми, помаранчевого або жовтогарячого кольору, зібрані в щільні китиці на коротких плодоніжках, ніби "обліплюючи" гілки [1].

Вони є надзвичайно багатим джерелом різноманітних біологічно активних речовин, серед яких вітаміни (особливо вітамін С, а також Е, К, групи

В, фолієва кислота), органічні кислоти (наприклад, яблучна, лимонна, винна, щавлева), цукри (глюкоза, фруктоза), флавоноїди (кверцетин, ізорамнетин, кемпферол та їх глікозиди), фенольні сполуки, дубильні речовини, пектини, мінеральні елементи (калій, кальцій, магній, залізо, цинк та ін.), а також значна кількість жирної олії, що міститься як в м'якоті, так і в насінні [12, 20, 37].

Особливо високий вміст каротиноїдів (включаючи β -каротин, лікопін, зеаксантин) визначає характерний яскравий помаранчевий або жовтогарячий відтінок плодів та значну частину їхньої біологічної активності [37].

Обліпіха росте у помірному кліматі Євразії, поширена в Китаї, Монголії, Росії, Україні та країнах Центральної Азії [15].

1.1.2. Хімічний склад обліпихової олії

Обліпихова олія є одним із найбільш цінних продуктів, отриманих із ягід обліпіхи. Вона містить широкий спектр біологічно активних речовин, що визначають її високу фармакологічну активність [19].

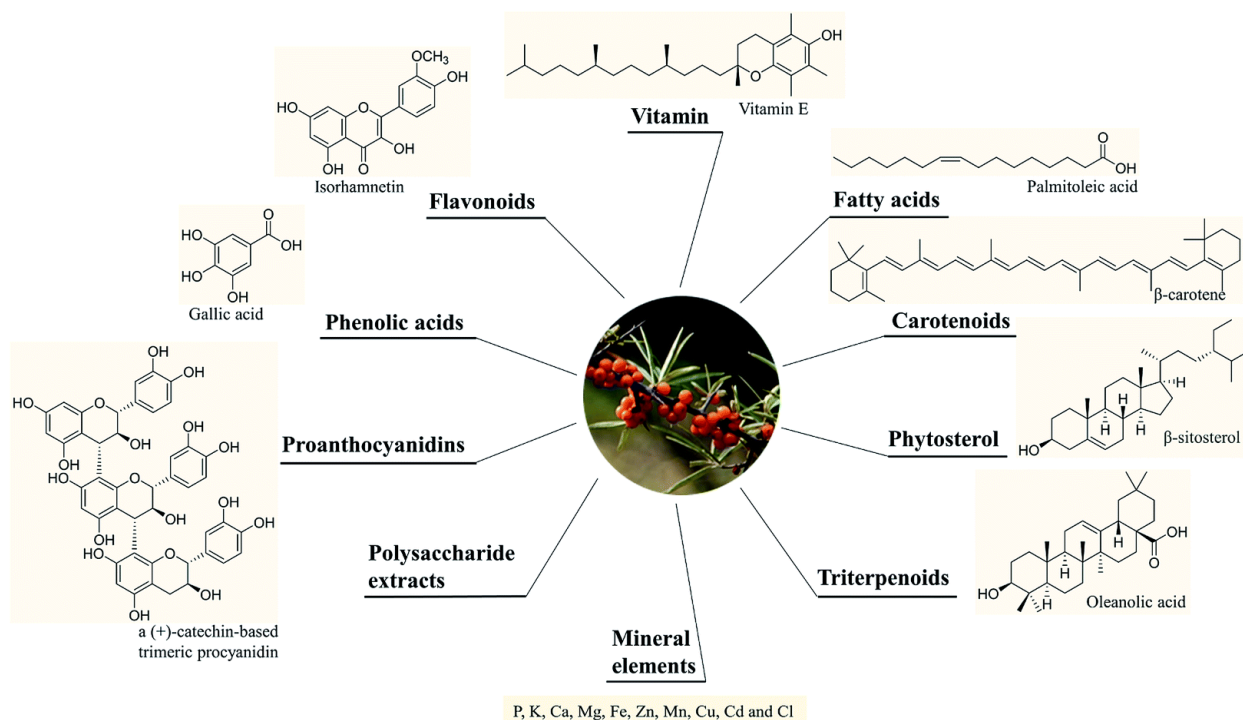
Основними компонентами олії є каротиноїди (β -каротин, лікопін, зеаксантин), які діють як природні антиоксиданти, надають олії характерний колір і сприяють регенерації тканин [20]. Важливу роль відіграють токофероли (вітамін Е), що захищають клітини від окисного стресу та мають протизапальні властивості [12], а також фітостерини – природні стероїдні сполуки, що можуть знижувати рівень холестерину та стимулювати імунну систему [15].

Значний внесок у властивості олії роблять незамінні жирні кислоти (лінолева, ліноленова, олеїнова), що сприяють регенерації шкіри та підтримують її бар'єрну функцію [19].

Крім того, в олії присутні флавоноїди з протизапальною, антимікробною та антиоксидантною дією [24] та органічні кислоти (яблучна, лимонна), які можуть покращувати засвоюваність інших компонентів та стабілізувати метаболічні процеси [1].

Завдяки такому багатому складу обліпихова олія використовується у складі фармацевтичних препаратів, косметичних засобів та харчових добавок.

1.1.3. Біологічна активність та застосування у медицині



Обліпихова олія володіє широким спектром фармакологічної активності [15]. Вона відома своєю вираженою ранозагоювальною дією, стимулюючи регенерацію шкірних покривів та прискорюючи загоєння ран, опіків і виразок завдяки високому вмісту каротиноїдів та токоферолів [10].

Також олії притаманна протизапальна активність, що проявляється у зменшенні набряклості та почервоніння тканин [15]. Доведено її антибактеріальні та протигрибкові властивості, зокрема проти золотистого стафілокока [15]. Крім того, відзначають імуностимулюючий ефект олії [15] та її гастропротекторну дію, що полягає у захисті слизової оболонки шлунка та зменшенні ризику виразкової хвороби [4].

Завдяки цим властивостям обліпихову олію широко застосовують у лікуванні різноманітних станів, включаючи опіки, рани, дерматити, екземи, захворювання шлунково-кишкового тракту (виразкова хвороба, гастрити), ЛОР-патології (фарингіт, ларингіт) та гінекологічні захворювання (ерозія шийки матки, вагініт) [12].

1.2. Каротиноїди: структура, властивості та біологічна роль

Каротиноїди — це природні пігменти, які широко розповсюджені в рослинах, грибах, бактеріях і деяких видах водоростей. Вони відіграють важливу біологічну роль як антиоксиданти, фотопротектори та попередники вітаміну А. Завдяки своїм фізико-хімічним властивостям каротиноїди знаходять застосування у фармацевтичній, косметичній та харчовій промисловості [6].

1.2.1. Загальна характеристика каротиноїдів

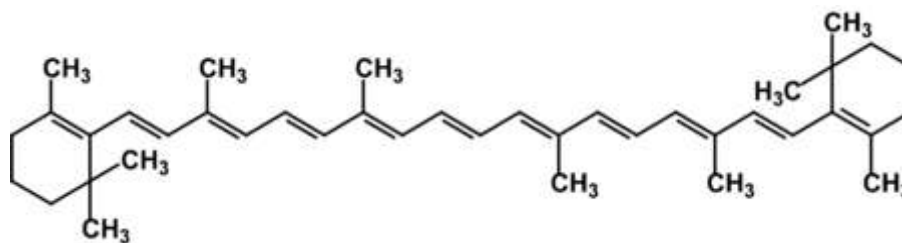
Каротиноїди є групою тетратерпенових органічних сполук, що зазвичай складаються з 40 атомів Карбону. Вони містять у своїй структурі протяжну кон'юговану систему подвійних зв'язків, що зумовлює їхні характерні фізико-хімічні властивості, включаючи інтенсивний колір (жовтий, оранжевий, червоний) та здатність поглинати світло переважно у видимій частині спектра [16].

Залежно від хімічної структури, зокрема наявності атомів кисню, каротиноїди поділяються на дві основні групи: каротини, які є виключно вуглеводнями і не містять кисню (наприклад, β -каротин, α -каротин, лікопін), та ксантофіли — їхні кисневмісні похідні, що містять гідроксильні, кето-, епоксидні або інші кисневмісні групи (наприклад, лютеїн, зеаксантин, астаксантин) [6]. Більшість каротиноїдів є ліпофільними сполуками, тобто вони добре розчиняються в жирах та багатьох органічних розчинниках і практично не розчиняються у воді. Ця властивість пояснює їхню значну концентрацію у багатьох природних оліях, зокрема в обліпиховій олії [16].

1.2.2. Основні представники каротиноїдів (β -каротин, лікопін, лютеїн тощо)

Серед понад 600 ідентифікованих каротиноїдів найбільш вивченими та важливими для людини є декілька [6].

До них належить β -каротин, один із найвідоміших каротиноїдів, що є попередником вітаміну А і міститься в моркві, гарбузі, обліпісі та солодкому перці.

Рис. 1.1 β -каротин

Лікопін надає характерний червоний колір томатам, кавунам та грейпфрутам і відомий потужними антиоксидантними властивостями. Ксантофіли лютеїн і зеаксантин є критично важливими для здоров'я очей, оскільки вони накопичуються в сітківці та захищають її від оксидативного стресу та шкідливого синього світла. Астаксантин, що зустрічається переважно в мікроводоростях та морепродуктах (креветках, лососі), також виявляє надзвичайно виражену антиоксидантну активність [6].

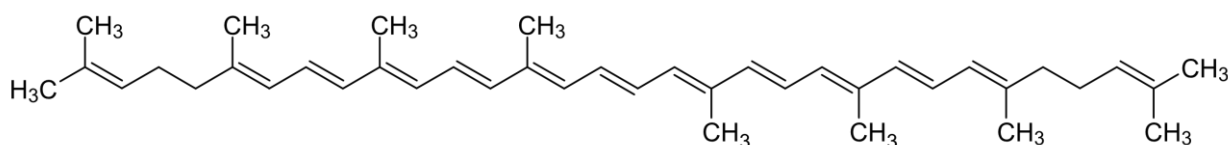


Рис. 1.2. Лікопін

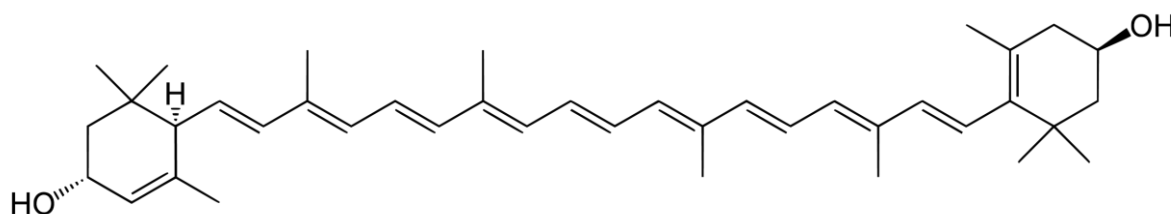


Рис. 1.3. Лютеїн

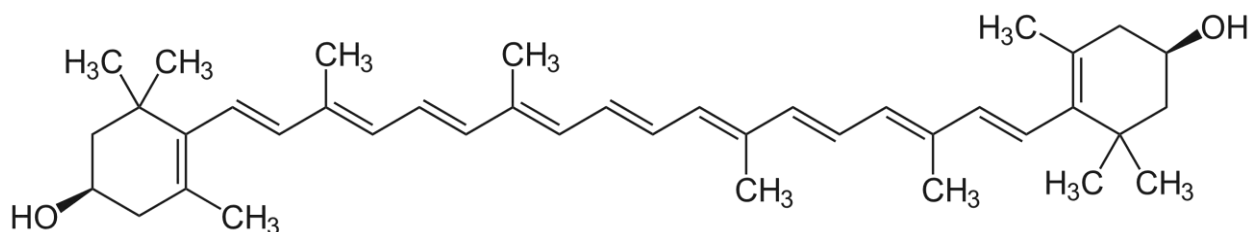


Рис. 1.4. Зеаксантин

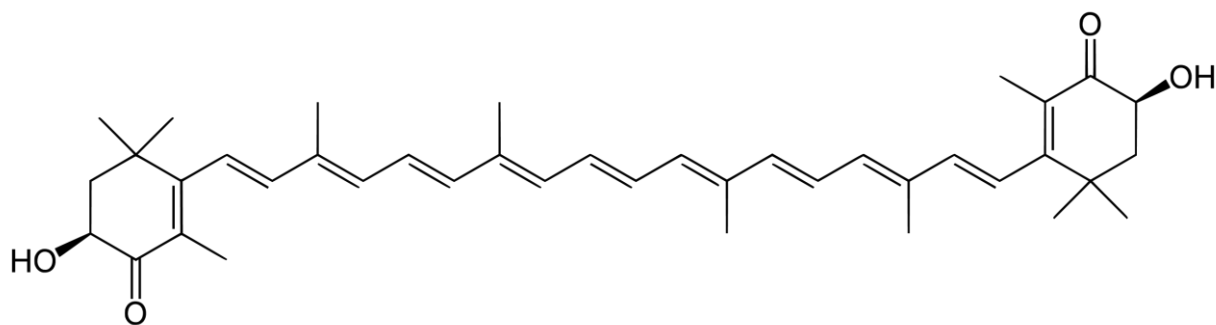


Рис. 1.5. Астаксантин

1.2.3. Антиоксидантні властивості та біологічна активність

Каротиноїди є природними антиоксидантами, що знижують рівень окисного стресу в організмі, захищаючи клітини від дії вільних радикалів. Це пояснює їхню роль у профілактиці хронічних захворювань, зокрема: серцево-судинних патологій; нейродегенеративних розладів (хвороба Альцгеймера, Паркінсона); онкологічних процесів [6].

Механізм антиоксидантної дії каротиноїдів полягає у здатності нейтралізувати активні форми кисню, запобігаючи пошкодженню мембранних ліпідів, білків та ДНК.

Усі, α -, β -, γ -каротини можуть перетворюватися на ретинол (вітамін А), що необхідний для нормального функціонування зору, імунної системи та шкірного покриву [6]. Відмінність полягає у тому, що оскільки окиснення молекули каротиноїда починається випадково, з одного з крайніх іононових циклів, а у β -каротину з обох боків наявні β -іононові цикли, тобто з молекули β -каротину при біотрансформації обов'язково утвориться ретинол, а у випадку α - чи γ -каротинів ретинол утворюється при окисненні лишень однієї з двох молекул каротиноїда.

Таким чином, каротиноїди є важливими біоактивними сполуками, що мають широкий спектр фармакологічних властивостей та перспективні для використання у фармацевтиці та медицині [6].

1.3. Ранозагоювальні мазі: класифікація та застосування

Ранозагоювальні лікарські засоби, такі як мазі та супозиторії, призначені для зовнішнього або місцевого застосування з метою сприяння відновленню ушкоджених тканин. Вони стимулюють репаративні процеси, допомагають запобігти інфікуванню рани чи ураженої ділянки та зменшують локальну запальну реакцію. Такі препарати широко використовуються в дерматології, хірургії, проктології, гінекології, травматології та косметології для лікування різноманітних ушкоджень шкіри та слизових оболонок, включаючи механічні травми, опіки, трофічні виразки, пролежні, анальні тріщини та інші патологічні стани [15].

Дія ранозагоювальних препаратів зазвичай є комплексною і може включати антисептичний ефект для пригнічення росту патогенної мікрофлори; протизапальний – для зменшення набряку, гіперемії та болю; регенеративний - для стимуляції проліферації клітин (наприклад, фібробластів, кератиноцитів) та синтезу компонентів позаклітинного матриксу (зокрема колагену), що прискорює епітелізацію та загоєння; а також зволожувальний та захисний ефекти, що створюють оптимальне вологе середовище для відновлення тканин та захищають ранову поверхню від висихання і зовнішніх подразників [31].

Ранозагоювальні мазі і супозиторії розрізняються за механізмом дії та складом активних компонентів. Вони можуть містити як природні біологічно активні речовини (наприклад, каротиноїди, компоненти ефірних олій, рослинні екстракти, продукти бджільництва), так і синтетичні чи напівсинтетичні субстанції: антисептики, антибіотики, протизапальні агенти (стероїдні чи нестероїдні), ферменти, вітаміни, стимулятори регенерації (наприклад, декспантенол, метилурацил) [21]

1.3.1. Основні групи ранозагоювальних мазей

Існує кілька класифікацій ранозагоювальних препаратів (мазей, супозиторіїв), що базуються на їхньому механізмі дії, складі або типі ранового процесу, для якого вони призначені [23].

Одним із підходів є класифікація за основним механізмом дії. До першої групи відносять антисептичні та антибактеріальні препарати, які містять антимікробні компоненти (наприклад, фурацилін, хлоргексидин, сполуки срібла, антибіотики) і призначені для запобігання або лікування інфікування рани.

Прикладом комбінованого засобу може слугувати мазь "Левомеколь"; вона поєднує антибактеріальну дію хлорамфеніколу з регенеруючою дією метилурацилу, а її спеціальна гідрофільна поліетиленоксидна основа має високу осмотичну активність, завдяки чому здатна адсорбувати рановий ексудат, сприяючи очищенню та, на певних стадіях, підсушуванню рани [31].

Друга група – це регенеруючі препарати, що безпосередньо стимулюють процеси відновлення тканин: проліферацію клітин, синтез колагену та еластину. До них належать засоби на основі декспантенолу (наприклад, "Бепантен"), похідних крові (актовегін, солкосерил) або інших стимуляторів репарації.

Окремо виділяють ензимні (ферментні) препарати, які містять протеолітичні ферменти (трипсин, хімотрипсин, колагеназа) і сприяють очищенню рани від некротичних тканин та фібрину, що також стимулює подальшу регенерацію [23].

Класифікація ранозагоювальних препаратів також можлива за складом їхніх активних речовин. Препарати на основі натуральних компонентів часто включають продукти екстракції або пресування з рослинної сировини, такі як рослинні олії (наприклад, обліпихова, шипшинова, які самі по собі є екстрактами), а також інші природні субстанції, як прополіс, чи концентровані екстракти з лікарських рослин (наприклад, алое вера, календули); такі засоби зазвичай характеризуються м'якою дією та доброю переносимістю [21]. Іншу групу становлять засоби на основі синтетичних речовин, куди входять препарати з антисептиками (наприклад, хлоргексидин), антибіотиками (наприклад, хлорамфенікол), або хімічними стимуляторами регенерації (наприклад, метилурацил) [31].

Існують також комбіновані препарати, що поєднують кілька активних речовин різного механізму дії для досягнення синергічного ефекту (наприклад, антибіотик + анестетик, антибіотик + кортикостероїд) [31].

Крім того, вибір препарату часто залежить від стадії та типу ранового процесу, хоча ця класифікація більш характерна для мазей. Для мокнучих ран застосовують засоби, що мають підсушуючі та абсорбційні властивості, сприяють зменшенню ексудації, часто на основі оксиду цинку або гідрофільних полімерів. Для сухих ран, навпаки, потрібні препарати, що створюють оклюзійний ефект, запобігають пересиханню та підтримують вологе середовище, для чого використовують жирові або емульсійні основи (наприклад, на основі вазеліну, ланоліну, гліцерину).

Для ран у стадії грануляції та епітелізації важливим є стимулювання цих процесів за допомогою відповідних активних речовин та використання основи, що не перешкоджає клітинній міграції та газообміну [31].

Завдяки різноманітності механізмів дії та складу, ранозагоювальні мазі та інші лікарські форми застосовуються у клінічній практиці для ефективного лікування ушкоджень шкіри та слизових оболонок різної етіології [31].

1.3.2. Механізм дії мазей на основі природних компонентів

Мазі на основі природних компонентів займають важливе місце у фармакотерапії ушкоджень шкіри завдяки своїй високій біосумісності, мінімальній токсичності та комплексному впливу на рановий процес [21].

До складу таких препаратів входять біологічно активні речовини, отримані з рослинних та тваринних джерел, які забезпечують антисептичну, протизапальну, антиоксидантну та репаративну дію [15].

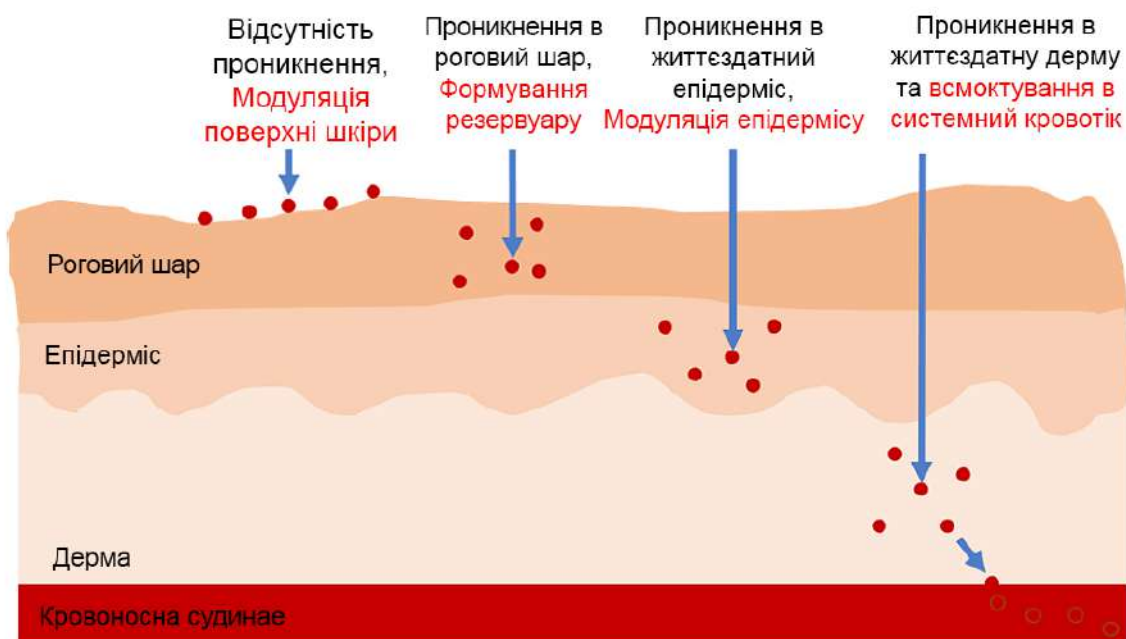


Рис. 1.2 Схема різних місць дій активних інгредієнтів для місцевого застосування

1. Протизапальний ефект

Ранова поверхня часто супроводжується запальною реакцією, що включає активацію прозапальних цитокінів, утворення вільних радикалів та залучення імунокомпетентних клітин. Природні компоненти, такі як флавоноїди, дубильні речовини та каротиноїди, інгібують активність прозапальних ферментів (циклооксигенази-2, ліпооксигенази) і зменшують продукцію медіаторів запалення (простагландинів, інтерлейкінів) [15]. Наприклад, каротиноїди обліпихової олії знижують рівень оксидативного стресу в ушкоджених тканинах, що сприяє швидшому загоєнню [14].

2. Антибактеріальна та антисептична дія

Багато природних речовин мають здатність пригнічувати ріст патогенних мікроорганізмів, що сприяє профілактиці інфекційних ускладнень при ушкодженнях шкіри та слизових оболонок. Антибактеріальна та противірусна активність природних компонентів, зокрема тих, що містяться в обліпісі, може бути зумовлена їхньою здатністю пошкоджувати клітинні структури мікроорганізмів або втручатися в їхні метаболічні процеси, наприклад,

інгібувати біосинтез важливих макромолекул [15]. Деякі компоненти основи, такі як ланолін або віск, можуть також створювати додатковий захисний бар'єр на поверхні рани [31].

3. Антиоксидантна активність

Окислювальний стрес відіграє важливу роль у патогенезі ранового процесу та загоєнні ушкоджень слизових оболонок, спричиняючи пошкодження клітинних мембран, білків та ДНК вільними радикалами. Антиоксиданти природного походження, такі як вітаміни А, С, Е, поліфеноли та каротиноїди, що містяться в багатьох лікарських рослинах та препаратах на їх основі, здатні нейтралізувати вільні радикали та активні форми кисню, захищаючи клітини від пероксидного окиснення [15].

Наприклад, β -каротин та токофероли, що у значній кількості містяться в обліпиховій олії, сприяють прискоренню регенерації тканин, зокрема, завдяки їхній здатності стабілізувати клітинні мембрани та захищати їх від окисного пошкодження [12].

4. Стимуляція регенерації та епітелізації

Природні біоактивні речовини, що входять до складу препаратів для місцевого застосування, можуть безпосередньо впливати на фази ранового процесу, стимулюючи проліферацію клітин епітелію та фібробластів, синтез колагену та інших компонентів позаклітинного матриксу, а також ангіогенез (утворення нових кровоносних судин) [14].

Певні компоненти, такі як пантотенова кислота (провітамін В5), відомі своєю здатністю підвищувати проліферацію фібробластів і стимулювати синтез глікозаміногліканів, що сприяє утворенню грануляційної тканини. Фітостероли, стероїдоподібні сполуки рослинного походження, що присутні, зокрема, в обліпиховій олії, також можуть активувати метаболізм клітин шкіри та пришвидшувати процеси загоєння [19]. Інші природні компоненти, наприклад, слизисті речовини (мукополісахариди), які містяться в алое вера та льняному насінні, діють переважно шляхом створення захисної плівки на поверхні рани, що запобігає її пересиханню та вторинному інфікуванню.

5. Зволоження та захисна функція

Ранова поверхня або ушкоджена слизова оболонка потребує створення оптимального, зокрема, достатньо вологого середовища для ефективного та швидкого загоєння. Зволожуючі та оклюзійні компоненти, що часто входять до складу основ мазей та супозиторіїв (наприклад, гліцерин, ланолін, віск, вазелін), а також природні жирні кислоти, допомагають підтримувати необхідний рівень гідратації тканин та перешкоджають утворенню надмірно жорстких рубців [31].

Наприклад, незамінні жирні кислоти, такі як лінолева та ліноленова, що у значній кількості містяться в оліях рослинного походження (включаючи обліпихову), сприяють відновленню ліпідного бар'єру шкіри та збереженню водного балансу в ушкоджених тканинах [19].

6. Імуномодулюючий ефект

Деякі природні компоненти здатні стимулювати місцевий імунітет та посилювати захисні функції організму. Наприклад, сапоніни, що містяться в екстрактах ехінацеї та женьшеню, активують макрофаги, стимулюючи їхню фагоцитарну активність, що сприяє швидкому очищенню рани від патогенів та некротичних тканин.

1.3.3. Переваги використання обліпихової олії в мазях

Обліпихова олія є одним із найцінніших природних компонентів, що широко застосовується у фармації та медицині завдяки унікальному складу та багатогранній біологічній активності [15].

Її використання у складі ранозагоювальних мазей забезпечує комплексну дію на ушкоджені тканини, сприяючи швидшому відновленню шкірного покриву, зменшенню запалення та захисту від інфекцій [21].

1. Висока біологічна активність

Обліпихова олія містить широкий спектр біологічно активних сполук, що зумовлюють її терапевтичну дію [12]. Серед них ключову роль відіграють каротиноїди (β-каротин, лікопін, зеаксантин, лютеїн), які забезпечують

антиоксидантний та протизапальний ефекти і стимулюють регенерацію клітин [15].

Важливими є також токофероли (вітамін E), що захищають клітинні мембрани від окислювального стресу і сприяють загоєнню ран, та фітостероли, які покращують метаболізм клітин шкіри та посилюють її бар'єрну функцію.

Крім того, олія багата на ненасичені жирні кислоти, зокрема лінолеву, олеїнову та унікальну пальмітолеїнову кислоту (омега-7), які відновлюють ліпідний бар'єр шкіри та запобігають трансепідермальній втраті вологи [19].

2. Прискорення процесу загоєння ран

Обліпихова олія активує процеси репарації пошкоджених тканин, зокрема, завдяки стимуляції проліферації фібробластів та синтезу колагену [14]. Це сприяє формуванню нової сполучної тканини (грануляції) та подальшій епітелізації, а також може зменшувати ризик утворення гіпертрофічних або келоїдних рубців [14].

Завдяки вмісту біологічно активних компонентів, таких як β -каротин та токофероли, олія також може покращувати мікроциркуляцію в ураженій ділянці, що забезпечує краще постачання кисню та поживних речовин до клітин, необхідних для процесів загоєння [11].

3. Антиоксидантний ефект

Вільнорадикальні процеси відіграють ключову роль у розвитку ушкоджень шкіри та уповільненні процесу загоєння [15]. Антиоксиданти, що містяться в обліпиховій олії, нейтралізують активні форми кисню, зменшуючи оксидативний стрес у тканинах [14]. Це сприяє зниженню запалення, зменшенню почервоніння та набряку в ділянці рани.

4. Протизапальна та антисептична дія

Біологічно активні компоненти обліпихової олії здатні пригнічувати активність запальних медіаторів, таких як простагландини, інтерлейкіни та фактор некрозу пухлин (TNF- α). Це допомагає зменшити біль, свербіж та набряк у ділянці рани [15].

Крім того, обліпихова олія має природні антибактеріальні властивості, які перешкоджають розмноженню патогенних мікроорганізмів. Вона ефективна проти ряду грампозитивних та грамнегативних бактерій, що є збудниками інфекцій шкіри та м'яких тканин [15].

5. Покращення зволоження та еластичності шкіри

Завдяки вмісту жирних кислот та ліпофільних компонентів, обліпихова олія сприяє відновленню водно-ліпідного балансу шкіри. Це особливо важливо при лікуванні хронічних виразкових уражень, тріщин та сухих екзем. Олія пом'якшує шкіру, підвищує її еластичність та попереджає лущення [19].

6. Захист від утворення рубців

При застосуванні обліпихової олії також може зменшуватися ризик утворення гіпертрофічних та келоїдних рубців. Це може пояснюватися її здатністю впливати на процеси синтезу та ремоделювання колагену, зокрема через регуляцію активності матриксних металопротеїназ, допомагаючи зберігати баланс між фіброзною та еластичною тканиною, а також стимулювати оновлення клітин шкіри [14]. Крім того, завдяки вмісту β -каротину та токоферолів, олія покращує мікроциркуляцію в ураженій ділянці, що забезпечує краще постачання кисню та поживних речовин до клітин, необхідних для якісної регенерації [11].

7. Безпека та відсутність токсичності

Обліпихова олія є олійним розчином суми каротиноїдів, які як правило, добре переносяться більшістю пацієнтів при місцевому застосуванні. Зазвичай вона не містить агресивних хімічних сполук чи синтетичних консервантів (хоча склад готового лікарського засобу залежить від виробника та основи). Завдяки своїй природній основі та профілю безпеки, підтвердженому досвідом застосування та оглядом клінічних даних, її вважають придатною для використання у складі різних лікарських форм, в тому числі для застосування у пацієнтів з чутливою шкірою [15]

1.4. Одержання та характеристика обліпихової олії

Враховуючи значний терапевтичний та косметичний потенціал обліпихової олії, зумовлений її унікальним хімічним складом та біологічною активністю, важливе значення мають технологічні аспекти її одержання. Метод виробництва, тип сировини та подальша обробка безпосередньо впливають на якість кінцевого продукту, вміст у ньому ключових біологічно активних речовин (каротиноїдів, токоферолів, жирних кислот, стеринів) та, відповідно, на його ефективність [20]. У даному розділі розглянуто основні джерела сировини, сучасні методи одержання обліпихової олії, відмінності між основними типами олії, а також підходи до її підготовки та стандартизації для використання у фармацевтичній галузі.

1.4.1. Джерела сировини та типи олії (з насіння, з м'якоті)

Основним джерелом для отримання обліпихової олії є плоди (ягоди) обліпихи крушиноподібної (*Hippophae rhamnoides* L.). Унікальність цієї рослини полягає в тому, що олію накопичують дві різні частини плоду: насіння та м'ясиста частина оплодня (м'якоть або перикарп). У процесі переробки ягід ці частини зазвичай розділяють, що дозволяє отримувати два принципово різні типи олії [38].

Таким чином, розрізняють олію обліпихову з насіння (Sea Buckthorn Seed Oil) та олію обліпихову з м'якоті (Sea Buckthorn Pulp Oil або Fruit Oil). Ці два типи олії суттєво відрізняються за своїм хімічним складом, зокрема за профілем жирних кислот, вмістом каротиноїдів, токоферолів та інших біологічно активних речовин, що, відповідно, визначає відмінності в їхніх властивостях та сферах застосування [38]. Знання про тип олії (з насіння чи м'якоті, або їх суміш) є важливим при оцінці її якості та очікуваної біологічної дії.

1.4.2. Методи одержання обліпихової олії (пресування, екстракція, центрифугування)

Для одержання обліпихової олії з сировини (насіння або м'якоті плодів) застосовують різні технологічні підходи, вибір яких залежить від вихідної сировини, бажаної якості кінцевого продукту та масштабу виробництва.

Основними методами є механічне пресування, екстракція органічними розчинниками, надкритична флюїдна екстракція та центрифугування.

Механічне пресування, зокрема холодне або шнекове, є фізичним методом, що часто використовується для отримання олії з насіння. Цей метод дозволяє отримати олію без використання хімічних розчинників, що цінується для продуктів з маркуванням "холодного віджиму", однак вихід олії може бути неповним [38].

Екстракція органічними розчинниками, такими як гексан або петролейний ефір, є високоефективним методом для вилучення олії як з насіння, так і з м'якоті (макухи). Цей метод дозволяє отримати високий вихід олії, проте потребує ретельного видалення залишків розчинника з кінцевого продукту, що викликає певні занепокоєння щодо його безпеки та екологічності [16].

Надкритична флюїдна екстракція (SFE) з використанням діоксиду вуглецю є сучасною "зеленою" технологією. Вона дозволяє ефективно та селективно вилучати олію при відносно низьких температурах, що мінімізує деградацію термолабільних компонентів (каротиноїдів, вітамінів) та уникає використання органічних розчинників. Цей метод підходить для екстракції олії як з насіння, так і з м'якоті, але потребує складного та дорогого обладнання [36].

Центрифугування застосовується переважно для відокремлення олії з м'якоті плодів після їх подрібнення та віджиму соку. Сік, що містить суспендовані частинки м'якоті та олію, розділяють на фракції (сік, олія, осад) за допомогою центрифуг [37]. Іноді також використовують водну екстракцію або ферментативну обробку для полегшення вивільнення олії. Кожен з методів має свої переваги та недоліки щодо виходу олії, її якості, вартості процесу та впливу на навколишнє середовище [38].

Ще одним методом, що використовується для отримання продукту, збагаченого біологічно активними речовинами обліпихи, є мацерація (настоювання) подрібненої сировини (наприклад, висушених ягід або макухи

після віджиму соку) на іншій рослинній олії, такій як соняшникова, оливкова або кукурудзяна. В процесі мацерації, яка може тривати від кількох днів до кількох тижнів, часто при легкому нагріванні, ліпофільні компоненти обліпихи, включаючи каротиноїди, токофероли та жирні кислоти, переходять в олію-носії. Після завершення процесу сировину відфільтровують, а отримана збагачена олія використовується у фармацевтичних та косметичних цілях під назвою «Обліпихова олія» (хоча це, по суті, олійний екстракт або інфуз).

Цей метод є відносно простим і не вимагає складного обладнання. Використання олії-носія дозволяє контролювати насиченість кінцевого продукту, концентрація власне компонентів обліпихи (зокрема каротиноїдів та токоферолів) в ньому буде оптимальною. Такий розчин, власне і отримав назву «обліпихова олія». Слід також враховувати, що олія з кісточок обліпихи, отримана пресуванням, сама по собі міститиме мало специфічних цінних сполук [36].

1.4.3. Підготовка, стандартизація та контроль якості олії

Після одержання сирої обліпихової олії тим чи іншим методом екстракції, вона може потребувати певних етапів підготовки та очищення перед використанням у фармацевтичних чи косметичних цілях. Зазвичай це включає фільтрацію або відстоювання для видалення механічних домішок (залишків рослинної тканини) та, можливо, освітлення чи видалення надлишкової вологи [37]. Однак, часто обліпихову олію використовують у мінімально обробленому вигляді для максимального збереження біологічно активних речовин, особливо якщо вона отримана методом холодного пресування або SFE.

Для забезпечення стабільної якості, безпеки та ефективності обліпихової олії як фармацевтичної субстанції або компонента лікарського засобу, вона підлягає стандартизації та контролю якості. Вимоги до якості жирних олій регламентовані фармакопеями (наприклад, Європейською Фармакопеєю [30]) або іншими нормативними документами. Стандартизація зазвичай включає контроль органолептичних показників (колір, запах, консистенція), визначення фізико-хімічних констант (густина, показник заломлення), показників якості

жирної олії (кислотне число, перекисне число, йодне число, число омилення) та ідентифікацію й кількісне визначення основних груп біологічно активних речовин.

До ключових БАР, вміст яких контролюється, належать каротиноїди (часто визначають сумарний вміст або вміст β -каротину), токофероли (вітамін Е), жирні кислоти (визначають жирнокислотний склад методом ГХ), а також стерини. Також проводяться випробування на чистоту, включаючи тести на відсутність або допустимий вміст важких металів, пестицидів та мікробіологічну чистоту [24].

Комплексна стандартизація дозволяє гарантувати відповідність олії встановленим вимогам та її придатність для подальшого використання.

ГЛАВА 2: МЕТОДИ ЯКІСНОГО ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КАРОТИНОЇДІВ

2.1. Підходи до аналізу каротиноїдів у мазах, супозиторіях

Аналіз каротиноїдів у мазах та супозиторіях є важливим етапом контролю якості відповідної фармацевтичної продукції. Оскільки каротиноїди є чутливими до зовнішніх факторів (світла, температури, окиснення), необхідно ретельно підходити до вибору методів їхнього виділення, ідентифікації та кількісного визначення з матриці у складі конкретної лікарської форми [18].

Якісний та кількісний аналіз каротиноїдів у мазах та супозиторіях вимагає ретельного підбору аналітичних підходів, зокрема методів підготовки проби та інструментального аналізу. Необхідно обрати оптимальні розчинники та умови для переведення каротиноїдів в аналізований розчин, а також метод вимірювання (наприклад, спектрофотометрія з відповідною довжиною хвилі або хроматографія), який дозволить мінімізувати або усунути заважаючий вплив матриці (допоміжних речовин основи). Основною метою цих процедур є забезпечення достовірного визначення вмісту каротиноїдів без їх деградації в процесі аналізу [16].

2.1.1. Особливості виділення та підготовки проб

Процес підготовки проб для аналізу каротиноїдів у мазах та супозиторіях включає кілька ключових етапів, вибір яких залежить від типу основи лікарської форми:

Розчинення або диспергування лікарської форми

Оскільки каротиноїди є переважно жиророзчинними (ліпофільними) сполуками, їх ефективне вивільнення з матриці лікарської форми та переведення в аналізований розчин залежить від властивостей самої основи (ліпофільної чи гідрофільної) та присутності допоміжних компонентів (емульгаторів, загусників, восків, поліетиленгліколів тощо), що необхідно враховувати при виборі розчинника та умов підготовки проби [16].

Для *ліпофільних основ* (мазей на вуглеводневій основі, жирових супозиторних основ типу Вітепсол, масла какао) зазвичай використовується

відповідний органічний розчинник (гексан, діетиловий ефір, хлороформ), який ефективно розчиняє і каротиноїди, і частково основу [16].

Для *гідрофільних основ* (мазей на основі ПЕО, ПЕГ, желатин-гліцеринових супозиторіїв) може знадобитися інший підхід: або розчинення основи у воді чи водно-спиртових сумішах з подальшою екстракцією каротиноїдів незмішуваним органічним розчинником (рідинно-рідинна екстракція), або використання розчинників типу ацетону чи етанолу, що розчиняють і основу, і каротиноїди[18].

Видалення компонентів основи та очищення екстракту

Для видалення нерозчинних залишків основи або допоміжних речовин застосовується фільтрація (через мембранні або паперові фільтри) або центрифугування (для розділення фаз і видалення твердих часток).

У випадку розчинення ліпофільних основ в органічних розчинниках може застосовуватися охолодження екстракту для осадження жирових компонентів основи.

Для видалення ліпідів, що заважають аналізу (особливо при спектрофотометрії), може бути застосоване омилення, проте цей метод потребує ретельного контролю умов для уникнення деградації каротиноїдів[18].

Ці методи дозволяють отримати чистіший розчин екстракт каротиноїдів без механічних та інших домішок, що заважають визначенню заважаючих домішок[18].

Концентрування екстракту

Випаровування розчинника (наприклад, на роторному випарнику при зниженому тиску та температурі) дозволяє отримати більш концентровану фракцію каротиноїдів, що підвищує чутливість подальшого аналізу

Переведення у відповідне середовище для подальшого аналізу

Отриманий концентрат або очищений екстракт розчиняють у відповідному розчиннику залежно від методу аналізу.

Для спектрофотометрії – у н-гексані, етанолі, ацетоні чи іншому прозорому в УФ/Вид-області розчиннику, що забезпечує стабільність

каротиноїдів. Для хроматографічних методів (ТШХ, ВЕРХ) – у розчиннику або суміші розчинників, сумісних із рухомою фазою[16].

Особливості підготовки проб значною мірою залежать від типу основи лікарської форми (гідрофільна або гідрофобна/ліпофільна), концентрації каротиноїдів і цільового аналітичного методу[18].

2.1.2. Вибір розчинників та екстракційних методів

Правильний вибір розчинника та методу пробопідготовки відіграє ключову роль у забезпеченні ефективності виділення каротиноїдів з матриці мазі чи супозиторія. Основними критеріями вибору є:

- **Розчинність каротиноїдів та компонентів основи:** Розчинник має ефективно розчиняти каротиноїди, водночас вибірково (або не вибірково, з подальшим очищенням) діючи на основу [28].

- **Полярність розчинника:** Каротиноїди є переважно неполярними або слабкополярними, тому для їх екстракції з ліпофільних основ використовують неполярні або слабкополярні органічні розчинники. Для гідрофільних основ підхід може вимагати комбінації полярних та неполярних розчинників [28].

- **Стабільність каротиноїдів у розчиннику:** Важливо уникати окиснення, ізомеризації та деградації каротиноїдів під час екстракції, тому перевага надається деаерованим розчинникам, а процес проводять за можливості без доступу світла та при низьких температурах [28].

Найбільш поширені розчинники для екстракції каротиноїдів:

- **Гексан:** Висока ефективність для неполярних каротиноїдів (β -каротин, лікопін) з ліпофільних матриць, добре підходить для спектрофотометрії.

- **Ацетон:** Ефективно розчиняє широкий спектр каротиноїдів, змішується з водою, що може бути корисним при роботі з гідрофільними основами, проте може екстрагувати більше супутніх домішок.

- **Етанол:** Менш токсичний розчинник, придатний для аналізу фармацевтичних продуктів, може використовуватися в сумішах.
- **Діетиловий ефір, хлороформ, метанол:** Часто використовуються в комбінації з іншими розчинниками для покращення екстракції або розділення.

Методи екстракції каротиноїдів з мазей та супозиторіїв:

1. Традиційна рідинно-рідинна екстракція (PPE)

Полягає у багаторазовій обробці лікарської форми органічним розчинником або послідовній екстракції після розчинення основи (особливо гідрофільної) у воді.

Використовується як для ліпофільних, так і для гідрофільних основ (з відповідною модифікацією) [2].

2. Ультразвукова екстракція (УЗЕ)

Застосування ультразвукових хвиль сприяє руйнуванню матриці лікарської форми та покращує контакт розчинника з аналітом, що підвищує вихід каротиноїдів [23]. Метод дозволяє зменшити час екстракції та об'єм розчинників.

3. Суперкритична флюїдна екстракція (SFE)

Використання суперкритичного CO₂ (часто з модифікаторами) дає змогу ефективно та селективно екстрагувати каротиноїди без ризику термічної деградації чи окиснення [28]. Метод екологічно безпечний ("зелена хімія"), однак потребує спеціального дороговартісного обладнання.

4. Мацерація та перколяція

Тривалий контакт лікарської форми з органічним розчинником для повного переходу каротиноїдів у рідку фазу. Менш ефективні для напівтвердих форм порівняно з УЗЕ [27].

Таким чином, вибір методів підготовки проб та екстракції залежить від фізико-хімічних властивостей каротиноїдів, типу основи мазі чи супозиторія та цілей аналізу. Використання оптимальних розчинників та сучасних екстракційних технологій дозволяє забезпечити високу точність та відтворюваність визначення каротиноїдів у досліджуваних лікарських формах.

2.2. Ідентифікація каротиноїдів

Якісний аналіз каротиноїдів у мазах є важливим етапом фармацевтичного контролю, оскільки дозволяє підтвердити наявність цих сполук, визначити їхню структуру та оцінити можливі домішки. Завдяки специфічним спектральним характеристикам та хроматографічним властивостям каротиноїдів, їх ідентифікація може здійснюватися різними аналітичними методами.

2.2.1. Критерії ідентифікації каротиноїдів

Каротиноїди — це ліпофільні сполуки, які мають високу чутливість до світла, кисню та температури. Тому їхній якісний аналіз базується на специфічних фізико-хімічних властивостях, таких як:

1. Спектральні характеристики

Каротиноїди мають інтенсивне світлопоглинання у **видимому діапазоні (350–550 нм)** завдяки системі спряжених подвійних зв'язків.

Максимуми поглинання (λ_{max}) для основних каротиноїдів: β -каротин – 450–480 нм, лікопін – 470–505 нм, лютеїн – 445–475 нм.

Спектральні характеристики каротиноїдів визначаються методом **ультрафіолетової (УФ) та видимої спектрофотометрії** [15].

2. Флуоресцентні властивості

Деякі каротиноїди можуть проявляти слабку флуоресценцію в УФ-діапазоні, що використовується для додаткової ідентифікації за допомогою флуоресцентної спектроскопії [26].

3. Розчинність у різних середовищах

Каротиноїди є жиророзчинними сполуками, добре розчиняються у гексані, ацетоні, бензолі та інших неполярних розчинниках. Знання їхньої розчинності допомагає правильно вибрати розчинник для аналізу.

4. Хроматографічні параметри

Кожен каротиноїд має специфічний R_f (фактор рухомості) у тонкошаровій хроматографії (ТШХ) та час утримування (R_t) у ВЕРХ.

Хроматографічні методи дозволяють не лише підтвердити наявність каротиноїдів, а й розділити суміш на окремі компоненти.

5. Хімічні реакції на каротиноїди

Поряд із фізико-хімічними методами (спектроскопія, хроматографія), для ідентифікації каротиноїдів та вивчення їх структури історично використовували хімічні реакції, що базуються на взаємодії реагентів з функціональними групами або полієновою системою молекули. Хоча ці класичні тести на сьогодні значною мірою замінені більш інформативними інструментальними методами, вони іноді можуть застосовуватися як допоміжні засоби для підтвердження наявності певних структурних особливостей досліджуваних пігментів

Реакція Карра-Прайса (Carr–Price reaction): При додаванні розчину трихлориду стибію (SbCl_3) у хлороформі до розчину каротиноїдів (особливо тих, що мають активність вітаміну А) спостерігається поява швидко зникаючого синього забарвлення, яке може переходити в червоно-фіолетове [16].

Реакція з концентрованою сульфатною кислотою: Додавання концентрованої H_2SO_4 до розчину каротиноїдів зазвичай викликає появу синьо-зеленого або зелено-синього забарвлення. Наприклад, β -каротин у сірчаній кислоті спочатку дає зелений, а потім синій колір[16].

Таким чином, ідентифікація каротиноїдів у мазях здійснюється шляхом комбінації спектроскопічних, хроматографічних та хімічних методів, що забезпечує високу точність та надійність аналізу.

2.2.2. Тонкошарова хроматографія (ТШХ) у визначенні каротиноїдів

Тонкошарова хроматографія (ТШХ) є одним із найпоширеніших методів якісного аналізу каротиноїдів у фармацевтичних і харчових продуктах, зокрема у мазях. Цей метод ґрунтується на розподілі компонентів суміші між двома фазами.

Нерухомою фазою, що представлена тонким шаром сорбенту (наприклад, силікагель, оксид алюмінію або целюлоза), нанесеним на скляну, алюмінієву

або пластикову пластинку. Рухомою фазою, яка є сумішшю органічних розчинників і рухається через капілярні сили, переносячи розчинені каротиноїди вздовж сорбенту [15].

1. Основні етапи ТШХ-аналізу каротиноїдів

1.1. Підготовка проби

Перед хроматографічним аналізом каротиноїди екстрагують із мазі відповідним органічним розчинником (гексан, ацетон, діетиловий ефір, хлороформ). Отриманий екстракт фільтрують і концентрують випарюванням розчинника.

1.2. Підготовка пластинок

Для аналізу каротиноїдів методом ТШХ найчастіше використовують стандартні пластинки, покриті силікагелем (наприклад, марки G або GF₂₅₄), який є полярним адсорбентом і забезпечує ефективне розділення багатьох каротиноїдів. Поряд із силікагелем, для специфічних завдань або для розділення сполук з різними властивостями (наприклад, менш полярних каротинів або сполук основного характеру) застосовують також інші нерухомі фази, зокрема пластинки з оксидом алюмінію або інші адсорбенти з різною активністю та селективністю [16].

1.3. Нанесення зразків

Зразки каротиноїдних екстрактів наносяться на стартову лінію пластинки мікропіпеткою або капілярною трубкою. Концентрація та об'єм нанесення мають бути оптимальними для отримання чітких зон розділення.

1.4. Розвиток хроматограми

Пластинку поміщають у камеру для хроматографування, що містить рухому фазу (суміш розчинників). Каротиноїди мігрують по сорбенту з різною швидкістю залежно від їхньої полярності, розчинності та взаємодії з нерухомою фазою.

1.5. Візуалізація каротиноїдів

Після розвитку пластинку висушують і аналізують переглядаючи забарвлені зони у видимому світлі або під дією ультрафіолету (365 нм) або обробляють специфічними реактивами (наприклад, 10% розчином фосфомолібденової кислоти). Каротиноїди можуть проявляти природну жовто-оранжеву або червону флуоресценцію.

1.6. Ідентифікація компонентів

Ідентифікація каротиноїдів здійснюється шляхом порівняння значень R_f (коефіцієнта рухливості) досліджуваних зразків зі стандартними зразками β -каротину, лікопіну, лютеїну та інших каротиноїдів [26].

2. Вибір рухомої фази для аналізу каротиноїдів

Оптимальний вибір розчинників у складі рухомої фази визначає якість розділення каротиноїдів. Найчастіше застосовують такі суміші:

- Гексан – ацетон (8:2) – для розділення β -каротину та лікопіну.
- Бензол – ацетон (7:3) – для аналізу сумішей каротиноїдів.
- Хлороформ – метанол (9:1) – для полярних каротиноїдів, таких як зеаксантин і астаксантин.
- Гексан – диетиловий етер (8:2) – для аналізу ліпофільних сполук, як β -каротин.

3. Переваги та недоліки ТШХ у визначенні каротиноїдів

Перевагами тонкошарової хроматографії (ТШХ) є простота виконання, доступність обладнання та реактивів, а також можливість візуальної ідентифікації забарвлених каротиноїдів безпосередньо на хроматограмі. Метод дозволяє проводити швидкий якісний аналіз сумішей каротиноїдів без надто складної підготовки проби. Однак, до недоліків ТШХ відносять обмежену точність та відтворюваність при кількісному аналізі (хоча сучасні HPTLC системи з денситометрією покращують цей аспект), потенційні труднощі з розділенням сполук близької полярності або аналізом високополярних каротиноїдів без модифікації системи, а також чутливість до зовнішніх умов (вологість, температура) та ризик деградації каротиноїдів на відкритій пластинці під дією світла та кисню [17].

Таким чином, ТШХ залишається ефективним інструментом переважно для якісного аналізу каротиноїдів у мазах та супозиторіях, що дозволяє швидко ідентифікувати основні компоненти, контролювати чистоту фракцій при виділенні або виявляти наявність основних продуктів деградації [17].

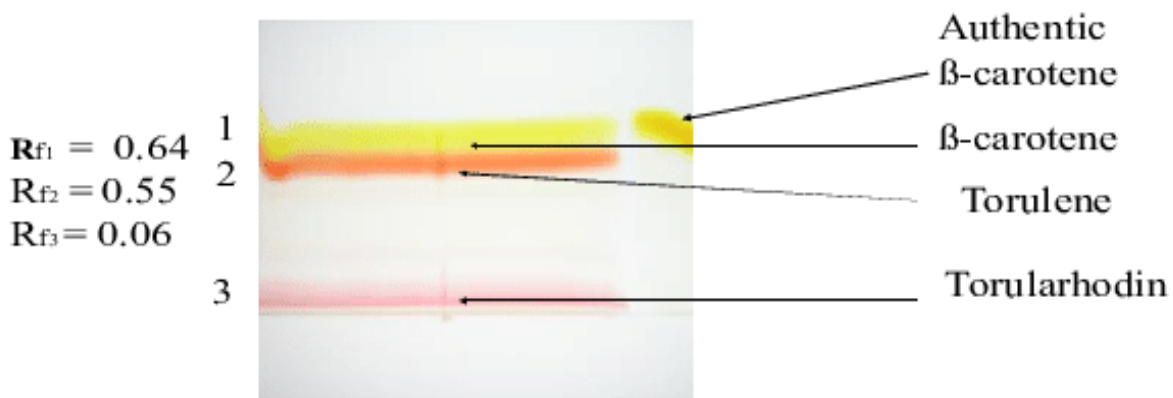


Рис. 2.1 ТШХ каротиноїдних пігментів з *Rhodotorula glutinis* на силікагелевих пластинах

2.2.3. Визначення спектральних характеристик каротиноїдів

Спектральний аналіз є одним із основних методів якісного визначення каротиноїдів у мазах. Даний метод базується на здатності каротиноїдів поглинати світло в ультрафіолетовій (УФ) та видимій (В) областях спектра. Каротиноїди мають характерні спектральні властивості завдяки їхній полієновій структурі, яка сприяє інтенсивному поглинанню світла в діапазоні 400-550 нм [6].

1. Основні спектральні методи аналізу каротиноїдів

1.1. Ультрафіолетово-видима (УФ-В) спектрофотометрія

Цей метод ґрунтується на вимірюванні інтенсивності поглинання світла розчинами каротиноїдів при певних довжинах хвиль у видимій частині спектра.

Основні аспекти методики включають попередню екстракцію каротиноїдів з матриці лікарської форми за допомогою відповідних органічних розчинників (часто н-гексан, петролейний ефір, ацетон, етанол). Вимірювання оптичної густини (абсорбції) отриманого екстракту проводять на спектрофотометрі в діапазоні довжин хвиль, де поглинають каротиноїди, зазвичай 350-550 нм.

Кожен індивідуальний каротиноїд має характерний спектр поглинання з одним або кількома максимумами (λ_{max}), наприклад: β -каротин – близько 450-480 нм, лікопін – 460-500 нм, лютеїн – 440-470 нм (точне положення залежить від розчинника).

Ця спектральна характеристика дозволяє ідентифікувати присутні каротиноїди (при порівнянні зі стандартами або літературними даними) та оцінити їх концентрацію на основі закону Бугера–Ламберта–Бера, використовуючи відомі коефіцієнти поглинання [8].

1.2. Флуоресцентна спектроскопія

Більшість поширених каротиноїдів з довгими спряженими системами (як β -каротин, лікопін, лютеїн) не є сильно флуоресцентними. Їх збуджені стани зазвичай дезактивуються через безвипромінювальні процеси (внутрішня конверсія, ізомеризація). Флуоресценція характерна для деяких їхніх попередників (фітоєн, фітофлуєн) або може спостерігатися за специфічних умов, але це не є загальним методом їхнього аналізу. Флуоресцентне детектування в ВЕРХ для них зазвичай не використовується.

1.3. Інфрачервона (ІЧ) спектроскопія

Метод ІЧ-спектроскопії дозволяє визначити функціональні групи каротиноїдів і оцінити їхню хімічну структуру. Каротиноїди мають характерні піки поглинання в області $1500\text{--}1700\text{ см}^{-1}$ ($\text{C}=\text{C}$ зв'язки полієнового ланцюга) [16].

Метод застосовується для ідентифікації та підтвердження структури каротиноїдів у мазях.

2. Переваги та недоліки спектральних методів

Перевагами спектрофотометрії є простота виконання аналізу, доступність та відносно невисока вартість обладнання, а також висока швидкість отримання результатів після екстракції та підготовки проби [8]. Метод може бути достатньо чутливим для визначення загального вмісту каротиноїдів.

Однак, ключовими недоліками є низька селективність (неможливість розділення окремих каротиноїдів у суміші та визначення їх індивідуального вмісту), значний вплив компонентів матриці та інших домішок, що поглинають на тій же довжині хвилі, на точність вимірювань, а також чутливість до умов проведення аналізу (стабільність каротиноїдів під дією світла, кисню, температури) [7, 8].

2.3. Кількісне визначення каротиноїдів

Кількісне визначення каротиноїдів у мазах є важливим аналітичним завданням, яке дозволяє оцінити вміст цих біологічно активних сполук у фармацевтичних препаратах. Основні методи визначення включають спектрофотометрію, високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ) та інші аналітичні методи [17].

Однією з головних труднощів кількісного аналізу каротиноїдів є їхня схильність до окислення під впливом світла, кисню та температури, а також можливість взаємодії з компонентами мазевої основи. Тому для забезпечення точності вимірювань необхідно застосовувати відповідні методики екстракції, стабілізації та аналізу зразків[15].

2.3.1. Використання спектрофотометрії

Спектрофотометрія є одним із найбільш поширених методів кількісного аналізу каротиноїдів у мазах завдяки простоті, високій чутливості та швидкості виконання. Даний метод базується на вимірюванні поглинання світла розчиненими каротиноїдами в ультрафіолетовій (УФ) та видимій (В) областях спектра [2].

1. Принцип методу

Каротиноїди мають характерні спектральні максимуми поглинання у діапазоні 400–500 нм. Закон Бугера–Ламберта–Бера використовується для розрахунку концентрації каротиноїдів у розчині за формулою:

$$A = C * \varepsilon * l,$$

де:

A – оптична густина розчину,

ε – молярний коефіцієнт поглинання (л/(моль·см)),

c – концентрація речовини (моль/л),

l – товщина кювети (см).

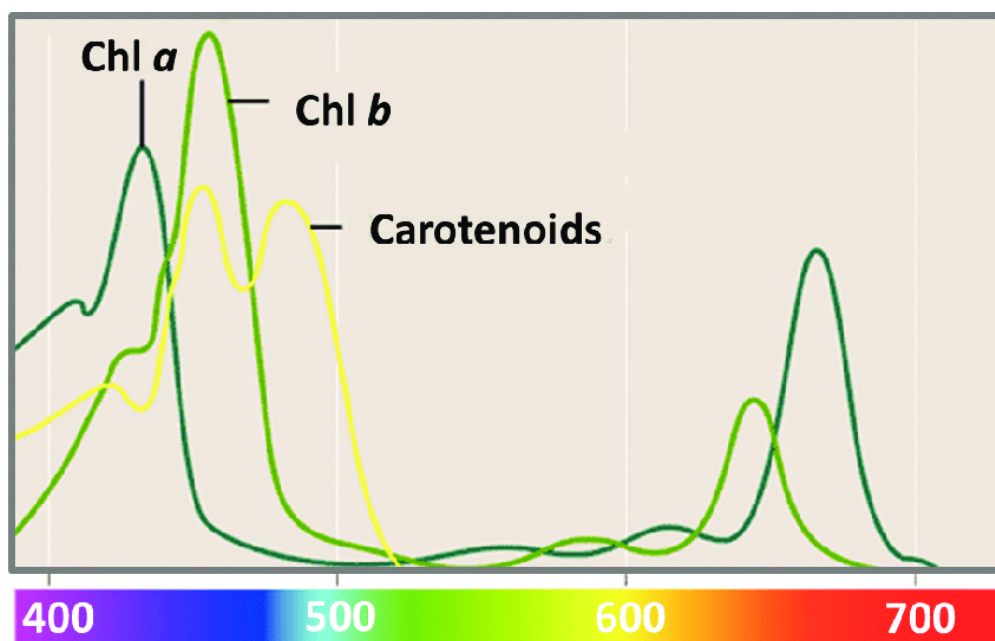


Рис. 2.2 Спектри поглинання хлорофілу a, b та каротиноїдів

2. Методика проведення аналізу

1. Екстракція каротиноїдів:

Каротиноїди виділяють із мазі за допомогою ліпофільних розчинників (гексан, ацетон, хлороформ). Використовується метод **ультразвукової екстракції** або центрифугування для підвищення ефективності виділення.

2. Приготування стандартних розчинів:

Готуються калібрувальні розчини з відомою концентрацією β -каротину або іншого каротиноїду. Будується калібрувальна крива залежності оптичної густини від концентрації.

3. Вимірювання спектра:

Вимірюють оптичну густину екстракту каротиноїдів у кюветах з довжиною шляху 1 см. Проводять визначення при характерних довжинах хвиль (450–480 нм для β -каротину).

4. Обчислення концентрації:

Використовується отримана калібрувальна крива або формула Бугера–Ламберта–Бера для визначення концентрації каротиноїдів у пробі.

3. Переваги та недоліки спектрофотометричного методу

До переваг спектрофотометричного методу кількісного визначення каротиноїдів відносять відносну простоту виконання, доступність обладнання та високу швидкість аналізу після екстракції. Метод також може бути достатньо чутливим для визначення загального вмісту каротиноїдів. Однак, основними недоліками є неможливість розділення та визначення окремих каротиноїдів у суміші (низька селективність), значний вплив компонентів матриці лікарської форми на точність вимірювань через можливе фонове поглинання чи каламутність, а також висока чутливість до умов проведення аналізу та стабільності самих каротиноїдів (вплив світла, кисню, температури) [15].

Таким чином, спектрофотометрія є ефективним методом для швидкої оцінки загального вмісту каротиноїдів у мазях та супозиторіях, наприклад, для цілей експрес-контролю, проте для підвищення специфічності та точності аналізу індивідуальних компонентів її часто необхідно доповнювати або замінювати хроматографічними методами, зокрема ВЕРХ.

2.3.2. Високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ)

Високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) є одним із найточніших та найчутливіших методів кількісного аналізу каротиноїдів у фармацевтичних препаратах, зокрема у ранозагоювальних мазях. Цей метод забезпечує високий ступінь розділення компонентів складної суміші, що є ключовим для аналізу каротиноїдів з огляду на їхні подібні спектральні характеристики, які ускладнюють диференційований аналіз без такого підходу. Однак, слід пам'ятати, що підтвердження того, чи всі близькі за структурою компоненти повністю розділилися на окремі піки, а також визначення специфічної біологічної активності та обґрунтування необхідності регламентування вмісту кожного окремого компонента є складними аналітичними та науково-дослідницькими завданнями, що часто потребують залучення додаткових методів (наприклад, мас-спектрометрії) та поглиблених досліджень.

1. Принцип методу

ВЕРХ базується на розподілі молекул аналіту між рухомою фазою (розчинник) та нерухомою фазою (адсорбент у колонці). Каротиноїди відрізняються між собою за полярністю, розчинністю та взаємодією з сорбентом, що дозволяє їх ефективно розділити та кількісно визначити [27].

2. Основні параметри ВЕРХ-аналізу каротиноїдів

Для ВЕРХ аналізу каротиноїдів переважно використовують зворотно-фазові (RP) колонки. Найпоширенішими нерухомими фазами є C18 (октадецилсилан), як універсальна, та C30 (триаконтилсилан), яка забезпечує краще розділення ізомерів каротиноїдів. Стандартний розмір частинок сорбенту складає 3-5 мкм для традиційної ВЕРХ, тоді як для УВЕРХ (UHPLC) використовують менші частинки (<3 мкм) для вищої ефективності та швидкості.

Довжина колонок зазвичай становить 100-250 мм, причому довші колонки дають кращу роздільну здатність, а коротші дозволяють прискорити аналіз. Стандартний внутрішній діаметр колонки – 4.6 мм, але для УВЕРХ та для економії розчинників часто використовують менші діаметри (наприклад, 2.1-3.0 мм).

Важливим фактором для стабільності та відтворюваності аналізу є контроль температури колонки, яку часто підтримують в діапазоні 25-40 °C. Для захисту аналітичної колонки рекомендується використовувати відповідну захисну передколонку.

Для ВЕРХ аналізу каротиноїдів часто використовують градієнтну елюцію сумішами розчинників (наприклад, ацетонітрил, метанол з МТБЕ, ТГФ або іншими модифікаторами, іноді з водою), хоча для простих випадків може бути достатньо ізократичного режиму.

Рекомендується додавати антиоксиданти (як ВНТ) до рухомої фази для стабілізації каротиноїдів під час аналізу. Детектування зазвичай проводять за поглинанням у видимій області спектра (400-500 нм, часто біля 450 нм). Перевага надається діодно-матричним детекторам (DAD/PDA), які дозволяють отримувати повні спектри поглинання для ідентифікації та оцінки чистоти

пиків. Для вищої специфічності, чутливості та ідентифікації невідомих сполук використовують ВЕРХ у поєднанні з мас-спектрометрією (LC-MS) [15].

3. Методика проведення аналізу

1. Етап підготовки проби

Для підготовки проби до ВЕРХ каротиноїди спочатку екстрагують з мазі за допомогою органічних розчинників (таких як гексан, ацетон, хлороформ), потім отриманий екстракт очищують від механічних домішок шляхом фільтрації через мікропористий фільтр (зазвичай 0.22 або 0.45 мкм) і, за необхідності, концентрують шляхом обережного випаровування розчинника (часто під струменем азоту для запобігання окисненню) перед введенням в хроматографічну систему.

Після введення проби екстракту (зазвичай 20-50 мкл) в систему ВЕРХ, розділення каротиноїдів здійснюють за допомогою градієнтної елюції для поступового вимивання компонентів різної полярності, реєструючи хроматограми за допомогою детектора при характерній довжині хвилі поглинання каротиноїдів, найчастіше 450 нм[5].

Для кількісного аналізу каротиноїдів методом ВЕРХ визначають їх концентрацію за площею відповідних піків на хроматограмі, порівнюючи її з калібрувальною кривою, яку будують за результатами аналізу серії розчинів стандартних зразків відомої концентрації, наприклад, стандартного β -каротину або лікопіну [15].

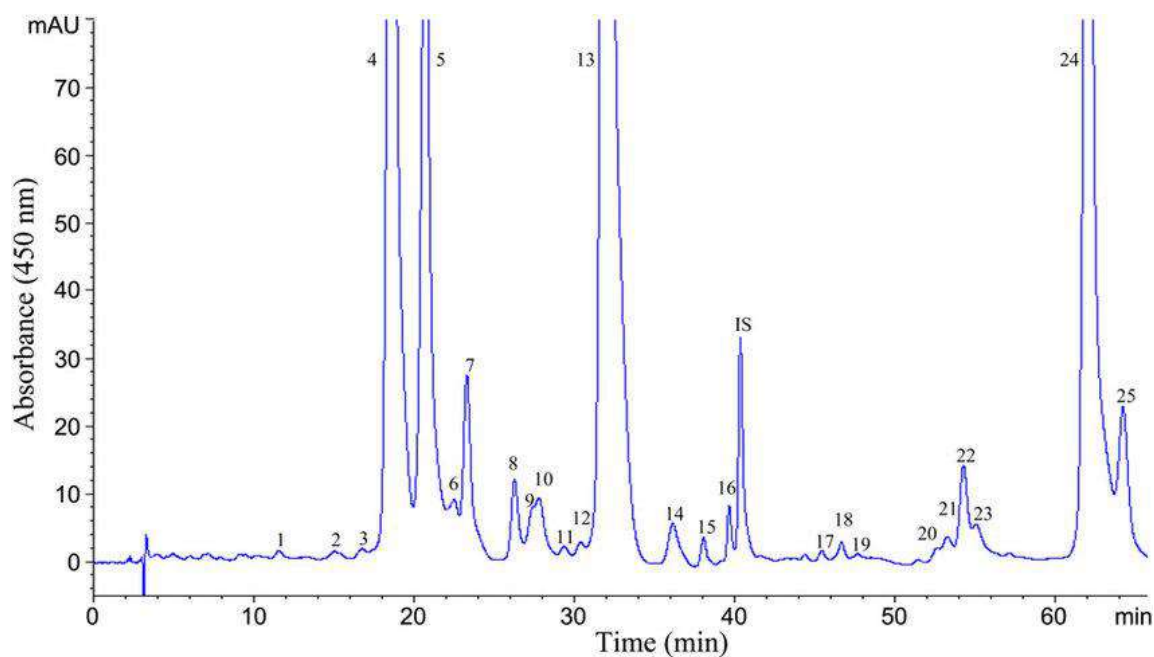


Рис. 2.3 ВЕРХ хроматограма каротиноїдів, екстрагованих з *Taraxacum formosanum*

4. Переваги та недоліки ВЕРХ-методу

Метод ВЕРХ характеризується високою точністю, чутливістю та відтворюваністю при аналізі каротиноїдів, дозволяє ефективно розділяти окремі каротиноїди навіть у складних матрицях (мазі, супозиторії) та придатний для аналізу відносно нестабільних сполук при належній пробопідготовці та умовах аналізу [27].

Основними недоліками ВЕРХ є висока вартість самого обладнання та чистих реагентів (особливо розчинників для ВЕРХ і висока вартість стандартних зразків), необхідність залучення кваліфікованого персоналу через складність методики та обслуговування приладу, а також порівняно тривалий час аналізу однієї проби, що зазвичай складає 20–40 хвилин або більше залежно від складності розділення [15].

2.3.3. Порівняльний аналіз методів кількісного визначення каротиноїдів

Визначення каротиноїдів у фармацевтичних препаратах, зокрема у ранозагоювальних мазях, здійснюється різними аналітичними методами. Найбільш поширеними є спектрофотометрія та високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ). Кожен із цих методів має свої переваги та обмеження, що визначають їх доцільність для конкретних аналітичних завдань.

Порівнюючи основні методи аналізу каротиноїдів, спектрофотометрія базується на вимірюванні поглинання світла розчином каротиноїдів при характерній довжині хвилі (зазвичай 450-480 нм). Її перевагами є простота виконання, відносно низька вартість обладнання та висока швидкість аналізу (приблизно 3-5 хвилин на пробу після пробопідготовки) [2].

При аналізі сумішей спектрофотометричним методом його селективність обмежується тим, що хоча вибір аналітичної довжини хвилі у видимій області (наприклад, в області максимального поглинання каротиноїдів, близько 450 нм) дозволяє уникнути впливу безбарвних сполук, що поглинають лише в УФ-діапазоні, вимірюється сумарне поглинання всіх забарвлених компонентів (різних каротиноїдів, а також інших жовто-оранжевих домішок чи компонентів матриці), що абсорбують на цій довжині хвилі. Це не дозволяє ідентифікувати та кількісно визначати індивідуальні сполуки. Водночас, якщо фармакологічна дія препарату пов'язується із сумарним вмістом усіх каротиноїдів, а не дією окремого компоненту, то спектрофотометрія може бути виправданим методом саме для оцінки цієї загальної кількості (зазвичай в умовному перерахунку на одну стандартну сполуку, наприклад, β -каротин). Такий підхід часто використовується для рутинного контролю або скринінгу завдяки своїй простоті та швидкості, хоча точність визначення суми залежить від чистоти проби та відсутності інших забарвлених заважаючих речовин, що поглинають в обраній спектральній області [8].

На противагу цьому, високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) ґрунтується на фізико-хімічному розділенні компонентів суміші у хроматографічній колонці між рухомою і нерухомою фазами. Це забезпечує високу селективність та специфічність методу, дозволяючи ідентифікувати та кількісно визначати окремі каротиноїди навіть у складних сумішах з високою точністю, чутливістю та відтворюваністю [15].

Основними недоліками ВЕРХ є значно вища вартість обладнання та чистих розчинників, стандартів, більш складна та тривала процедура підготовки проби та власне аналізу (зазвичай 20–40 хвилин на пробу), а також необхідність кваліфікованого персоналу.

Параметр	Спектрофотометрія	ВЕРХ
Чутливість	Середня	Висока
Селективність	Низька (перекривання спектрів)	Висока (розділення окремих піків)
Лінійність градуировної кривої	1–100 мг/л	0,01–100 мг/л
Точність	±5-10%	±1-3%
Необхідність очищення проби	Мінімальна	Висока
Швидкість аналізу	Висока (3-5 хв)	Середня (20-40 хв)
Вартість аналізу	Низька	Висока

Табл 2.1 Порівняння методів аналізу

Вибір методу для аналізу каротиноїдів у мазях та супозиторіях визначається конкретними аналітичними завданнями: спектрофотометрія є придатною для експрес-контролю та швидкої оцінки загального вмісту каротиноїдів у рутинних аналізах, особливо коли висока селективність не є критично важливою.

У свою чергу, ВЕРХ є оптимальним та часто необхідним методом для детального дослідження каротиноїдного складу лікарської форми, що дозволяє точно ідентифікувати та кількісно визначати окремі компоненти; цей метод є незамінним для наукових досліджень, розробки нових складів, вивчення стабільності та для цілей сертифікації препаратів [26].

Залежно від поставленої мети та етапу контролю, може використовуватися один із цих методів або їх комбінація.

2.4. Фактори, що впливають на точність визначення каротиноїдів

Якісне та кількісне визначення каротиноїдів у фармацевтичних препаратах, зокрема у мазях та супозиторіях, є складним аналітичним процесом, на точність якого впливає низка взаємопов'язаних факторів.

До основних з них належать: вплив матриці самої лікарської форми, що включає взаємодію каротиноїдів з іншими компонентами (основою,

допоміжними речовинами) та потенційні перешкоди під час екстракції чи детектування; низька стабільність самих каротиноїдів, які є високочутливими до дії світла, підвищеної температури та кисню повітря (окислення); а також різні методичні похибки, пов'язані з вибором розчинників, ефективністю процесу екстракції та валідацією самого аналітичного методу (спектрофотометрії чи ВЕРХ) [28].

Сукупний вплив цих факторів може спричиняти значні відхилення у визначенні реальної концентрації каротиноїдів, що наголошує на важливості розробки та ретельної валідації оптимальних методів пробопідготовки й аналізу для кожної конкретної лікарської форми.

2.4.1. Вплив матриці мазі

Матриця лікарської форми (мазі, супозиторія) – це сукупність усіх її компонентів крім каротиноїдів (складові олії, основа, допоміжні речовини, інші діючі речовини складної мазі), що може значно ускладнювати їх аналіз.

Основні негативні ефекти матриці лікарської форми включають: 1) Спектральні та хроматографічні перешкоди. У спектрофотометрії інші компоненти можуть поглинати світло в тій же області, що й каротиноїди, що є проблемою; іноді цей вплив можна частково зменшити шляхом вибору аналітичної довжини хвилі, де поглинання матриці мінімальне, однак це не вирішує проблему повністю при значному перекриванні спектрів або наявності каламутності. У ВЕРХ компоненти матриці можуть елююватися разом з аналітами (ко-елюція), заважаючи їх розділенню та кількісному визначенню. 2) Фізико-хімічні взаємодії, такі як зв'язування або фізичне утримання каротиноїдів у структурі матриці, що знижує ефективність їх екстракції та призводить до заниження результатів. 3) Вплив на стабільність каротиноїдів під час зберігання та аналізу – матриця може як захищати їх (наприклад, завдяки антиоксидантам), так і прискорювати їх деградацію [7].

Для мінімізації цих впливів ключове значення має ретельна пробопідготовка з очищенням екстракту (наприклад, за допомогою рідинно-рідинної чи твердофазної екстракції, осадження), використання методу внутрішнього стандарту (особливо в хроматографії для компенсації втрат), оптимізація умов хроматографічного розділення (колонка, рухома фаза, градієнт) та застосування селективних методів детектування (наприклад, DAD або MS у ВЕРХ) [27].

Успішне врахування та мінімізація матричних ефектів є необхідною умовою для отримання достовірних результатів аналізу каротиноїдів у складних лікарських формах.

2.4.2. Стабільність каротиноїдів

Стабільність каротиноїдів є критично важливим фактором як при розробці та зберіганні лікарських форм (мазей, супозиторіїв), так і під час їх аналізу, оскільки ці сполуки через наявність великої кількості спряжених подвійних зв'язків у своїй структурі є високочутливими до деградації під впливом різних зовнішніх чинників [6].

Основними факторами, що спричиняють руйнування та ізомеризацію каротиноїдів, є світло, температура, кисень та рН середовища.

Світло, особливо його ультрафіолетова та видима короткохвильова частина, може ініціювати фотохімічні реакції, що призводять до транс-цис-ізомеризації (зі зниженням біологічної активності та зміною фізико-хімічних властивостей) або до фотоокиснення та повного розпаду молекул з утворенням менших продуктів, таких як альдегіди та кетони; цей процес значно прискорюється у присутності кисню.

Підвищена температура також суттєво сприяє прискоренню реакцій окиснення та термічного розкладу каротиноїдів, причому значне руйнування багатьох каротиноїдів, наприклад, β -каротину та лікопіну, спостерігається вже при температурах вище 50–60°C. Хоча низькі температури (зберігання в холодильнику) значно уповільнюють процеси деградації, вони не завжди запобігають поступовому окисненню, особливо при доступі кисню [15].

Кисень повітря є одним з основних агентів руйнування, легко атакуючи подвійні зв'язки та ініціюючи процеси автоокиснення, які можуть відбуватися навіть за кімнатної температури; наявність у матриці (наприклад, в обліпиховій олії) природних антиоксидантів, таких як вітамін Е (токоферол) та флавоноїди, може частково захищати каротиноїди, сповільнюючи цей процес.

Вплив рН-середовища також є важливим: каротиноїди зазвичай демонструють кращу стабільність у слабкокислому або нейтральному середовищі, тоді як лужне середовище (особливо при рН вище 8–9) може викликати гідролітичні реакції, розрив подвійних зв'язків або інші перетворення, що змінюють структуру та знижують концентрацію активних форм [6].

Для мінімізації втрат каротиноїдів як у готових лікарських формах, так і під час аналітичних процедур, необхідно вживати комплексних запобіжних заходів: ретельно захищати препарати та аналітичні проби від дії світла (використовуючи світлонепроникну первинну упаковку, темний скляний посуд для проб, роботу при неактивному освітленні), суворо контролювати температурний режим (зберігання готових форм та розчинів стандартів у холодильнику при $+4...+8^{\circ}\text{C}$, уникнення будь-якого нагрівання під час екстракції, концентрування та аналізу), забезпечувати ефективний антиоксидантний захист (максимальне обмеження контакту з повітрям, використання інертної атмосфери азоту чи аргону при роботі з розчинами, можливе додавання синтетичних або природних стабілізаторів-антиоксидантів до екстрагенту чи рухомої фази) та підтримувати оптимальний рівень рН середовища при необхідності.

Ретельне врахування цих факторів та послідовне впровадження відповідних заходів стабілізації є ключовим для отримання точних і достовірних результатів аналізу, а також для забезпечення заявленої якості та ефективності лікарських засобів, що містять каротиноїди, протягом усього терміну їх придатності.

2.4.3. Методичні похибки

Методичні похибки при визначенні каротиноїдів у мазах та супозиторіях можуть суттєво впливати на достовірність та точність отриманих результатів. Ці похибки можуть виникати на будь-якому етапі аналітичного процесу, включаючи пробопідготовку, власне вимірювання та обробку даних, і традиційно поділяються на систематичні, випадкові та грубі.

Систематичні похибки – це постійні або закономірно змінні відхилення результатів від істинного значення, що виникають через недоліки самої методики, приладів або реактивів [27].

Прикладами можуть бути неповна екстракція каротиноїдів через неоптимальний вибір розчинника або умов екстракції; втрати аналіту під час пробопідготовки внаслідок його деградації (окиснення, ізомеризації під дією світла чи температури); неточність калібрування вимірювальних приладів (наприклад, неправильне встановлення довжини хвилі або фотометричної шкали спектрофотометра, неточність роботи насоса або детектора ВЕРХ); використання нечистих розчинників або стандартних зразків неналежної якості.

Систематичні похибки можна виявити та, в ідеалі, усунути або скоригувати шляхом ретельної перевірки та оптимізації методики.

Випадкові похибки – це непередбачувані коливання результатів вимірювань навколо середнього значення, що виникають через сукупність багатьох дрібних неконтрольованих факторів [26].

До них відносяться незначні варіації при зважуванні наважок чи вимірюванні об'ємів, невеликі флуктуації умов хроматографічного розділення (температура, швидкість потоку), зміни температури та вологості навколишнього середовища під час вимірювань, електричний шум детектора тощо.

Випадкові похибки визначають відтворюваність (прецизійність) методики і не можуть бути повністю усунені, але їх вплив можна зменшити шляхом проведення достатньої кількості паралельних вимірювань та статистичної обробки результатів.

Грубі похибки (промахи) – це значні відхилення окремих результатів від решти, що зазвичай виникають через помилки персоналу (неправильне зважування, значна помилка при розведенні, переплутані аналітичні зразки, помилки в записах чи розрахунках) або очевидні несправності обладнання чи використання непридатних реактивів. Такі результати зазвичай відкидаються при статистичній обробці.

Для мінімізації загальної похибки аналізу необхідний комплексний підхід. Оптимізація пробопідготовки має забезпечити повне вилучення каротиноїдів та запобігти їх деградації (використання відповідних розчинників, контроль температури, захист від світла, можливо, інертна атмосфера).

Контроль аналітичних методів включає регулярне та ретельне калібрування приладів за допомогою сертифікованих стандартних зразків, використання валідованих методик, проведення достатньої кількості паралельних визначень та належну статистичну обробку даних.

Верифікація та стандартизація методів, включаючи порівняння результатів між різними методами або лабораторіями, а також суворе дотримання вимог фармакопей та стандартних операційних процедур (СОП) в рамках належної лабораторної практики (GLP), є ключовими для забезпечення якості аналізу.

Зменшення методичних похибок критично важливе для отримання достовірних, точних та відтворюваних результатів визначення каротиноїдів, що є необхідним для контролю якості лікарських засобів та обґрунтованої інтерпретації дослідницьких даних [25].

ГЛАВА 3 РОЗРОБКА МЕТОДИК ІДЕНТИФІКАЦІЇ І КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ СУМИ КАРОТИНОЇДІВ В РАНОЗАГОЮВАЛЬНІЙ МАЗІ

3.1. Об'єкт дослідження та визначення розчинника

Об'єктом дослідження в даній роботі виступала серія мазі з обліпиховою олією екстемпорального виготовлення, отримана в аптеці "Гармонія 2000" (м. Чернівці). Точний кількісний та якісний склад маzewої основи не був вказаний виробником. У складі мазі використовувалась готова обліпихова олія, також отримана в аптечній мережі, без детальної інформації щодо її походження, методу одержання та показників якості. Додатково аналізували вихідну обліпихову олію.

3.2. Розробка методики пробопідготовки

Одним із важливих етапів розробки аналітичної методики є вибір методики пробопідготовки, яка має забезпечити найбільш повне і точне визначення аналізованої речовини. Згідно літератури для розчинення β -каротину необхідно використовувати ліпофільні розчинники, типовим представником яких є гексан.

Ми спробували додавати до наважки мазі у бюксі гексан і вимішувати скляною паличкою, однак з'ясувалося, що певні компоненти маzewої основи не розчиняються у гексані і утворюють щільну пластичну масу, вивільнення каротиноїдів з якої може бути неповним.

Другим етапом була спроба емульгувати наважку мазі у бюксі невеликою кількістю хлороформу, а потім розвести утворену емульсію гексаном. З'ясувалося, що хоча додавання хлороформу не впливало на характер спектру каротиноїдів, емульсія могла бути достатньо стійкою і розсіювати потік світла.

Ми повернулися до використання як розчинника гексану, але спочатку наважку мазі з доданим гексаном обробили ультразвуком, а потім перемішали скляною паличкою прямо на ультрозвуковій бані. Такий підхід дозволив отримати розчин каротиноїдів у гексані з певною суспензією нерозчинних компонентів мазі. Суспензію кількісно переносили у мірну колбу, промивали

посуд гексаном, доводили до позначки , перемішували і, оберігаючи від дії світла, залишали на пів години для повної седиментації суспензії.

Від ідеї профільтрувати розчин ми відмовилися, оскільки гексан є дуже летким розчинником і концентрація розчину при фільтруванні може значно змінюватися. Окрім того під час фільтрування збільшується контакт розчинених речовин з киснем повітря, що призводить до їх окиснення.

Підготовка проб мазі: В попередньо зважений бюкс відважують близько 0,550 г мазі (точна наважка). В бюкс додають 5 мл гексану, вміщують його в ультразвукову баню, обробляють ультразвуком та перемішують скляною паличкою до розчинення основи і через скляну лійку кількісно переносять у мірну колбу ємністю 50 мл. Бюкс, паличку та лійку ще три рази промивають гексаном, порціями по 5 мл, зливаючи у ту саму колбу. Розчин, оберігаючи від дії світла доводять до позначки гексаном ретельно закупорюють, перемішують і залишають на 30 хв у темному місці для повної седиментації нерозчинних у гексані компонентів мазі. Прозорий надосадовий шар обережно відбирали за допомогою піпетки для подальшого аналізу. Роботу проводили, захищаючи розчини від дії світла шляхом обгортання колб алюмінієвою фольгою.

Підготовка проб олії: Проводили аналогічно до проб мазі, розчиняючи наважку 0,100 г олії в гексані та готуючи необхідні розведення.

Приготування розчину порівняння ($K_2Cr_2O_7$): 0,3600 г (точна наважка) калію дихромату поміщали в мірну колбу ємністю 1000 мл, розчиняли у воді дистильованій і доводили об'єм розчину тим же розчинником до мітки. Отриманий розчин за забарвленням відповідав розчину, що містить 0,00208 мг β -каротину в 1 мл [40]. Вимірювали оптичну густину цього розчину (A_0) за тих же умов, що й досліджувані проби, використовуючи як контрольний розчин воду.

Основним методами кількісного та якісного аналізу каротиноїдів у досліджуваних зразках (мазі та олії) було обрано спектрофотометрію у видимій області спектра та тонкошарову хроматографію.

3.3. Спектрофотометричне дослідження мазі

У ході спектрофотометричного аналізу використовували наступні матеріали та реактиви:

- н-Гексан кваліфікації "хімічно чистий" (х.ч.).
- Калій дихромат ($K_2Cr_2O_7$), кваліфікації "хімічно чистий" (х.ч.), використовувався для приготування розчину порівняння згідно з методикою [40].
- Вода дистильована.

Специфічні стандартні зразки каротиноїдів для побудови калібрувальних графіків не використовувалися. Антиоксиданти для стабілізації проб не застосовувались.

Спектрофотометричні вимірювання проводили на спектрофотометрі SpectroLab UV-1200. Використовували стандартні кварцові кювети з довжиною оптичного шляху 10 мм.

Допоміжне обладнання включало: аналітичні ваги AXIS ANG200C, мірний посуд класу А (колби на 50 мл, піпетки), ультразвукову баню, лабораторний посуд (стакани, лійки тощо), алюмінієву фольгу.

Адсорбційні спектри досліджуваних розчинів аналізованого зразка мазі, робочого стандартного зразка обліпихової олії та стандартного розчину калію дихромату знімали на спектрофотометрі SpectroLab UV-1200 в кюветах з товщиною шару 10 мм, використовуючи як контрольний розчин гексан, або воду для розчину калію дихромату. Отримані результати представлені на рис. 3.1

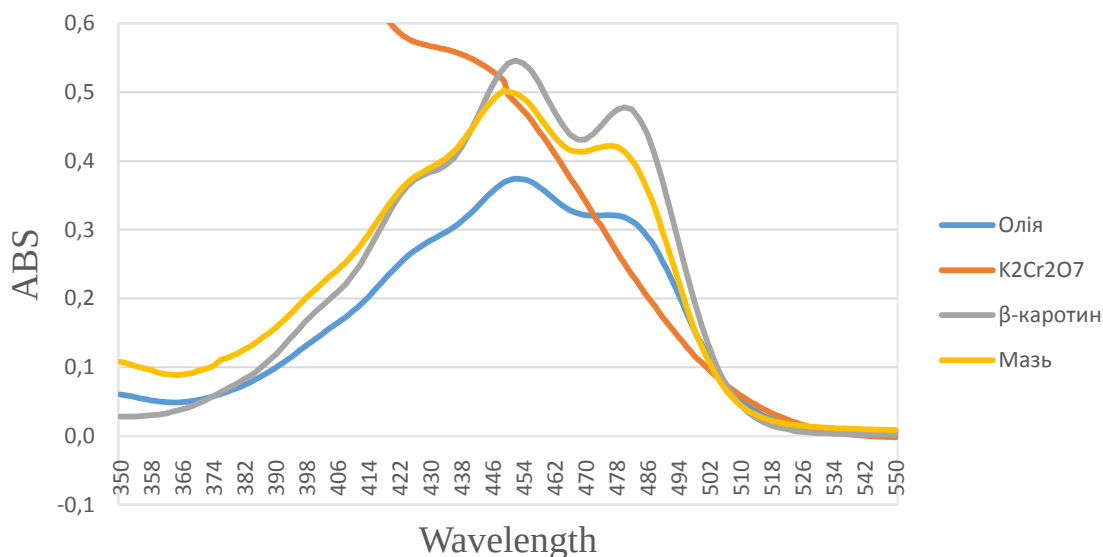


Рис. 3.1 Абсорбційні спектри гексанових розчинів мазі й обліпихової олії, стандартного розчину β -каротину та водного розчину калію дихромату.

Як видно з даних рис. 3.1 адсорбційний спектр розчину робочого стандартного зразка обліпихової олії і досліджуваного розчину мазі у видимому світлі в області 350 - 550 нм мають одну широку складну смугу вбирання в межах 370 - 520 нм, сформовану накладанням вбирання декількох смуг і відрізняються між собою лишень інтенсивністю поглинання, викликаною різницею у масах наважки при приготуванні розчинів. При уважному розгляді в області 395 - 410 нм можна спостерігати невиразний перегин смуги вбирання, що свідчить про накладання двох смуг. Ще одна смуга формує виразне плече розташоване в межах 423 - 435 нм. Максимум поглинання найбільш інтенсивної смуги вбирання розташований при 449 - 451 нм. Він не різкий, достатньо похилий і, таким чином, може бути використаний для проведення кількісного визначення.

В області 470 - 490 нм розташована ще одна трохи менш інтенсивна смуга вбирання з максимумом при 476 нм. В спектрі поглинання розчину олії перегин, симетричний першому перегину смуги вбирання можна спостерігати приблизно при 495 нм, а от у спектрі поглинання розчину мазі він вже не спостерігається.

Таким чином відсутність суттєвих розбіжностей між поглинанням розчинів досліджуваного зразка мазі і робочого стандартного зразка обліпихової олії свідчить про відсутність впливу мазевої основи та інших складників ранозагоювальної мазі на адсорбційний спектр каротиноїдів обліпихової олії.

Спектр поглинання стандартного розчину β -каротину у гексані, знятий на спектрофотометрі Evolution 60 S у попередніх дослідженнях за своїм характером поглинання і малюнком повністю збігається зі спектром досліджуваного розчину мазі та робочого стандартного зразка обліпихової олії. Це свідчить про те, що саме β -каротин є переважаючою сполукою серед суми каротиноїдів обліпихової олії.

Спектр водного розчину калію дихромату на аналізованій ділянці є плавною спадаючою лінією з широким плечем в області 415 - 450 нм, яке збігається з максимумом поглинання каротиноїдів і, таким чином, може слугувати зовнішнім стандартом при кількісному визначенні каротиноїдів у перерахунку на β -каротин.

Аналіз отриманих спектральних даних свідчить про можливість проведення кількісного визначення суми каротиноїдів у перерахунку на β -каротин методом спектрофотометрії у видимому світлі, з наступним розрахунком вмісту за методом зовнішнього стандарту — водного розчину калію дихромату.

3.4. Ідентифікація β -каротину у ранозагоювальній мазі

3.4.1. Органолептичний аналіз

Первинну ідентифікацію досліджуваної серії мазі з обліпиховою олією проводили шляхом органолептичного аналізу, оцінюючи її зовнішній вигляд, консистенцію, колір та запах.

Досліджувана серія мазей являла собою однорідну масу м'якої та густої консистенції. При візуальному огляді тонкого шару мазі, нанесеного на білий папір, не спостерігалось видимих сторонніх включень, неоднорідностей чи ознак розшарування.

Серія мазей мала характерний насичений оранжевий колір. Забарвлення було рівномірним по всій масі. Відзначається відсутність вираженого запаху. Сторонні запахи були відсутні.

Органолептичні характеристики досліджуваної серії мазі порівнювали з типовими описами мазей, що містять обліпихову олію, та загальними вимогами до якості м'яких лікарських форм. Відхилень від очікуваних показників виявлено не було.

3.4.2 Спектрофотометрична ідентифікація

Ідентифікацію каротиноїдів у складі мазі здійснювали за допомогою спектрофотометричного аналізу у видимому світлі в діапазоні довжин хвиль 350–550 нм. Спектр поглинання досліджуваного зразка мазі відповідає спектру поглинання робочого стандартного зразка обліпихової олії, зокрема:

- спостерігатися широка смуга поглинання у межах 370–520 нм;
- наявний характерний максимум поглинання в діапазоні 449–451 нм;
- наявна друга менш інтенсивна смуга поглинання, що знаходиться в межах 470–490 нм з максимумом при 476 нм;
- у спектрі присутнє характерне плече в області 423–435 нм;
- відношення оптичної густини при 450 нм до оптичної густини при 476 нм має становити від 1,06 до 1,30.

Таким чином спектральні характеристики гексанового розчину мазі, приготовленого для кількісного визначення, дозволяє надійно підтвердити ідентичність мазі через наявність у її складі каротиноїдів, серед яких переважає β -каротин.

3.4.3 Тонкошарова хроматографія

Одним з найрозповсюдженіших методів, що дозволяє ідентифікувати діючі речовини у складі рослинних екстрактів є хроматографія в тонкому шарі сорбента.

На лінію старту хроматографічної пластини марки Merck Silica Gel 60 F₂₅₄ нанесли 10 мм лініями 30мкл гексанові гексанових розчинів досліджуваної мазі

та вихідної обліпихової олії, приготовлені як описано в п. 3.2. Зразок чистої олії (приготовлений з наважки 0.1 г аналогічно до проби мазі) використовували як зразок порівняння ("стандарт").

Після висушування на повітрі помістили у хроматографічну камеру, попередньо насичену рухомою фазою гексан - метил-трет-бутиловий етер (8:2). Після проходження фронту розчинників 17,5 см пластину вийняли з камери та висушили під потоком теплого повітря до видалення запаху розчинників. Далі хроматографічну пластину оббризкували розчином 10% розчином фосфорно-молібденової кислоти у 96% етанолі. Після витримування на повітрі до випаровування спирту пластинку нагрівали в сушильній шафі при 105 °C протягом 5 хвилин і переглядали у видимому світлі.

На хроматограмі розчину олії спостерігається одна зона темно-синього кольору з $R_f = 0,56$. На хроматограмі розчину досліджуваної мазі спостерігаються дві зони: нижня зона по розташуванню, забарвленню та R_f відповідає плямі на хроматограмі розчину робочого стандарту обліпихової олії, зверху над основною плямою каротиноїдів спостерігається велика невиразна забарвлена пляма, яка свідчить про наявність у складі мазі інших ліпофільних відновних речовин.

Проведенні дослідження доводять можливість використання ТШХ для ідентифікації β -каротину у складі ранозагоювальної мазі виробництва аптеки «Гармонія 2000».

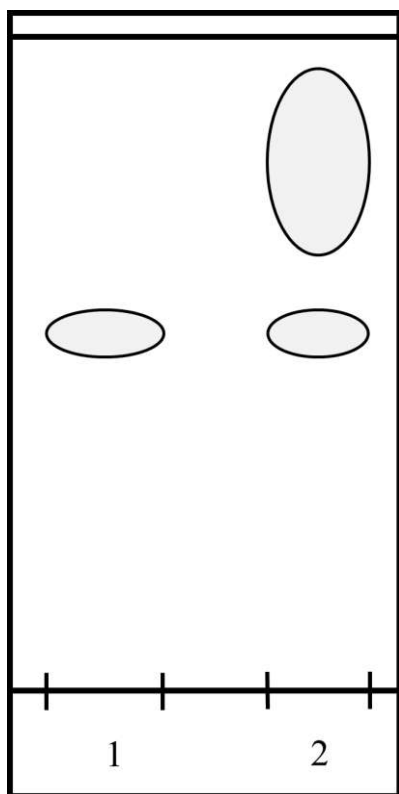


Рис. 3.2 Схема ТШХ хроматограми, отриманої при ідентифікації ранозагоювальної мазі з обліпиховою олією. 1- Розчин олії; 2 - Розчин мазі;

3.5. Розрахунок невизначеності пробопідготовки

При розробці методики кількісного визначення каротиноїдів у складі ранозагоювальної мазі з обліпиховою олією важливим етапом є оцінка невизначеності результатів вимірювань. Невизначеність пробопідготовки є суттєвою складовою загальної невизначеності аналітичного методу. Вона враховує всі можливі джерела похибок, що виникають на етапах підготовки як стандартних, так і досліджуваних зразків до безпосереднього аналізу.

На етапі пробопідготовки каротиноїдів з мазевої основи та приготування стандартних розчинів основними джерелами невизначеності можуть бути:

- **Неточність зважування:** Похибки, пов'язані з точністю аналітичних ваг, умовами зважування (вібрації, потоки повітря) та кваліфікацією оператора.
- **Неточність вимірювання об'ємів:** Похибки, пов'язані з калібруванням та точністю мірного посуду (піпетки, колби), впливом температури на об'єм рідин, а також суб'єктивністю визначення меніску.

Розрахунок невизначеності пробопідготовки стандартного зразка:

Невизначеність пробопідготовки стандартного зразка складається з невизначеності зважування наважки масою 360 мг і невизначеності доведення до позначки у колбі ємкістю 1л.

$$\Delta_m = \frac{0,2}{360} * 100\% = 0,055\%$$

$$\Delta_{spSt} = \sqrt{0.055^2 + 0.050^2} = 0.074\%$$

Розрахунок невизначеності пробопідготовки дослідного зразка складається з невизначеності зважування наважки мазі близько 550 мг і невизначеності доведення до позначки у колбі ємкістю 50 мл.

$$\Delta_m = \frac{0,2}{550} * 100\% = 0,036\%$$

$$\Delta_{spДосл} = \sqrt{0.036^2 + 0.17^2} = 0.174\%$$

Розрахунок сумарної невизначеності пробопідготовки:

$$\Delta_{sp} = \sqrt{0.074^2 + 0.174^2} = 0.189\%$$

Розрахунок повної невизначеності результатів аналізу складається з сумарної невизначеності пробопідготовки і невизначеності кінцевої аналітичної операції - вимірювання спектрофотометрії, яка відповідно ДФУ становить 0,70%:

$$\Delta_{As,r} = \sqrt{0.189^2 + 0.70^2} = 0.725\%$$

Таким чином прогнозна невизначеність кількісного визначення за розробленою нами методикою пробопідготовки може становити $\pm 0,725\%$.

3.6. Кількісне визначення суми каротиноїдів у ранозагоювальній мазі з обліпиховою олією

В результаті проведених досліджень пропонується така методика кількісного визначення суми каротиноїдів у мг на 1 г перерахунку на β -каротин

у ранозагоювальній мазі з обліпиховою олією виробництва аптеки «Гармонія 2000»:

Приготування досліджувального розчину: В попередньо зважений бюкс відважують близько 0,550 г мазі (точна наважка). В бюкс додають 5 мл гексану, вміщують його в ультразвукову баню, обробляють ультразвуком та перемішують скляною паличкою до розчинення основи і через скляну лійку кількісно переносять у мірну колбу ємністю 50 мл. Бюкс, паличку та лійку ще три рази промивають гексаном, порціями по 5 мл, зливаючи у ту саму колбу. Розчин, оберігаючи від дії світла доводять до позначки гексаном ретельно закупорюють, перемішують і залишають на 30 хв у темному місці для повної седиментації нерозчинних у гексані компонентів мазі. Прозорий надосадовий шар обережно відбирають за допомогою піпетки для подальшого аналізу. Роботу проводять, захищаючи розчини від дії світла шляхом обгортання колб алюмінієвою фольгою.

Визначення вмісту суми каротиноїдів проводили методом зовнішнього стандарту. Як зовнішній стандарт використовували водний розчин калію дихромату. Фармакопейні стандартні зразки, в тому числі зразок β -каротину коштують дорого. β -Каротин і особливо його розчини є дуже нестійкими і швидко деградують під дією світла та кисню повітря. Застосування в аналізі екстемпоральної рецептури ФСЗ β -каротину значно підвищить собівартість аналізу і продукції в цілому, зменшуючи її доступність для покупців. Водночас в літературі описано спосіб, коли як стандарт під час аналізу застосовують не сам β -каротин, а іншу порівняно дешеву і хімічно стабільну речовину оранжевого кольору — калію дихромат, для якого було експериментально встановлено відповідність між концентраціями розчинів β -каротину і калію дихромату однакової оптичної густини за аналітичної довжини хвилі 450 нм. Такий розчин і застосовується як зовнішній стандарт при спектрофотометричному визначенні β -каротину.

Приготування розчину порівняння ($K_2Cr_2O_7$): 0,3600 г (точна наважка) калію дихромату поміщали в мірну колбу ємністю 1000 мл, розчиняли у воді

дистильованій і доводили об'єм розчину тим же розчинником до мітки. Отриманий розчин за забарвленням відповідав розчину, що містить 0,00208 мг β -каротину в 1 мл [40]. Вимірювали оптичну густину цього розчину (A_0) за тих же умов, що й досліджувані проби, використовуючи як контрольний розчин воду.

Оптичну густину отриманих розчинів визначають на спектрофотометрі при довжині хвилі 450 нм в кюветах з товщиною шару 10 мм. Як контрольний розчин використовують гексан.

Вміст суми каротиноїдів (мг) на 1 г мазі в перерахунку на β -каротин розраховують за формулою:

$$X_{\frac{\text{мг}}{\text{г}}} = \frac{A * V * 0,00208}{A_{\text{ст}} * m_{\text{н}}}$$

де:

A – середнє арифметичне оптичної густини при 450 нм;

$A_{\text{ст}}$ - оптична густина розчину калію дихромату при 450 нм;

0,00208 – кількість β -каротину в розчині що за забарвленням відповідає розчину калію дихромату;

V – об'єм розчину, що досліджується;

$m_{\text{н}}$ - маса наважки.

№	Маса наважки, г	Оптична густина, А	Вміст суми каротиноїдів у перерахунку на β-каротин, мг/г
1	0,5494	0,500	0,191
2	0.5520	0,497	0,189
3	0,5500	0,496	0,189
4	0,5498	0,499	0,190
5	0,5509	0,505	0,192
6	0,5488	0,490	0,187

Отримані дані піддано статистичній обробці і наведено в табл. 3.2.

Метрологічні характеристики середнього результату аналізу

Знайдено суми каротиноїдів мг/г	$X_{cp.}$, мг	S^2	S	P, %	t(p,f)	$\Delta X_{cp.}$	$\bar{\varepsilon}$, %
0,191	0,1897	$3,067 \times 10^{-6}$	0,001757	95	2,57	0,00075	0,396
0,189							
0,189							
0,190							
0,192							
0,187							

Примітки:

S^2 - дисперсія;

S , - стандартне відхилення (окремого визначення);

P – надійність;

$t(P,f)$ – критерій Ст'юдента;

$\Delta X_{\text{доп}}$ – довірчий інтервал середнього визначення;

$\bar{\varepsilon}$, %- відносна невизначеність середнього визначення, %.

Таким чином в результаті проведеного дослідження встановлено, що середній вміст суми каротиноїдів у перерахунку на β -каротин у серії ранозагоювальної мазі з обліпиховою олією виробництва «Гармонія 2000» становить $0,1897 \pm 0,00075$ мг/1г. Відносна невизначеність середнього визначення склала 0,396 %, що не перевищує прогнозованих значень.

3.7 Вивчення валідаційної характеристики «Лінійність» для розробленої спектрофотометричної методики

Застосування процедури валідації аналітичних методик, як одного з елементів системи забезпечення якості, якраз і дозволяє встановити, якою мірою використана методика відповідає своєму призначенню, тобто гарантує достовірні та точні результати аналізу.

Лінійність – здатність аналітичної методики давати результати, прямо пропорційні концентрації речовини в аналізованих разках у певних межах концентрацій. Цю характеристику визначають шляхом застосування даної методики для аналізу серії зразків, які мають концентрації аналізованої речовини, що перекривають необхідний діапазон. Для визначення лінійності необхідно побудувати графік залежності отриманих результатів від концентрації речовини, що аналізується, у зразку.

Для проведення визначення лінійності розробленої спектрофотометричної методики кількісного визначення суми каротиноїдів у перерахунку на β -каротин у складі ранозагоювальної мазі з обліпиховою олією були приготовані 9 модельних розчинів які перекривають можливі значення

концентрацій діючої речовини. ДФУ регламентує діапазон застосування методик кількісного визначення 80-120 %, концентрація яких змінюється рівномірно в межах діапазону застосування (5%).

Таблиця 3.3

Розрахунок параметрів лінійності методики кількісного визначення

№	C, %	C (мг/1г)	C _{i/st}	Середнє значення оптичної густини	A _{i/st}
1	80	0,1921	100,1	0,404	80,00
2	85	0,1924	100,2	0,430	85,15
3	90	0,1923	100,2	0,455	90,10
4	95	0,1922	100,1	0,480	95,05
5	100	0,1919	100,0	0,505	100,00
6	105	0,1920	100,0	0,530	104,95
7	110	0,1916	99,8	0,554	109,70
8	115	0,1912	99,6	0,578	114,46
9	120	0,1909	99,4	0,602	119,21
Стандарт	100	0,1919	100,0	0,505	

Далі представлений графік лінійної залежності виміряних показників від концентрації діючої речовини в зразку.

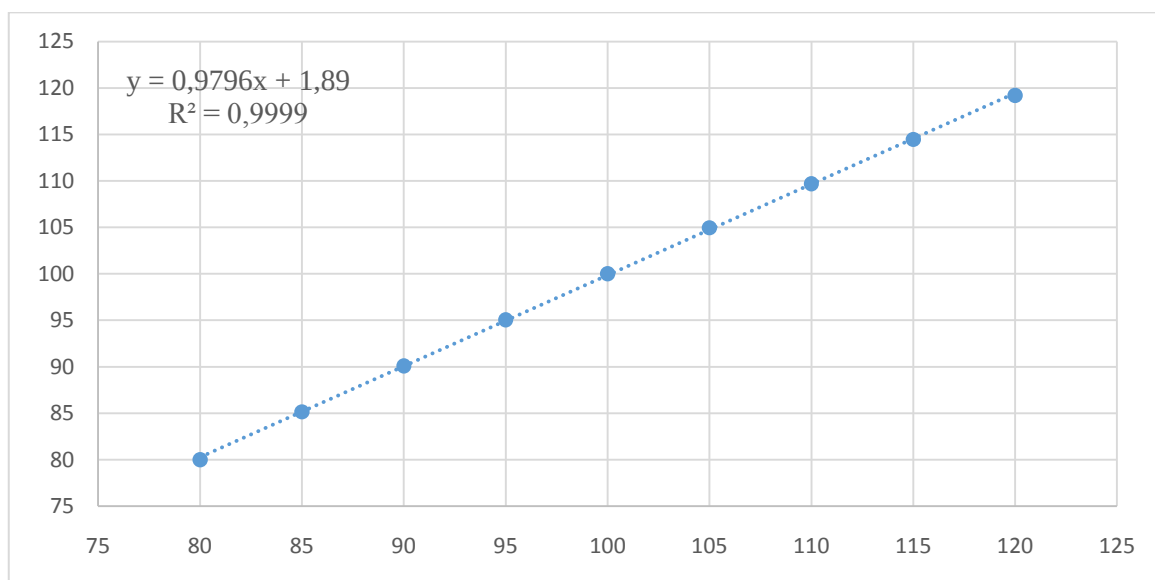


Рис. 3.3 Графік лінійної залежності

Для перевірки лінійності методики застосовують деякі параметри, а саме вільний член лінійної залежності a , коефіцієнт кореляції (r) та вимоги до залишкового стандартного відхилення (S_0).

Вільний член лінійної залежності a , це відрізок, на осі ординат який характеризує систематичну похибку при використанні методу стандарту, розраховують:

$$|\dot{a}| \leq \Delta_{\dot{a}}; \Delta_{\dot{a}} = t(95\%, n - 2) \times S_{\dot{a}}$$

Коефіцієнт кореляції розраховується за наступною формулою:

$$r = \frac{m \sum_1^m x_i y_i - \sum_1^m x_i \cdot \sum_1^m y_i}{\sqrt{[m \cdot \sum_1^m x_i^2 - (\sum_1^m x_i)^2] \cdot [m \cdot \sum_1^m y_i^2 - (\sum_1^m y_i)^2]}}$$

Вимоги до залишкового стандартного відхилення. Розрахунок даного параметру відбувається множенням критерію Стюдента на залишкове стандартне відхилення по осі абсцис ($s_{x,0}$) і не повинен бути більшим за максимальну допустиму невизначеність аналізу невизначеність аналізу Δ_{AS} :

$$s_{x,0} = \frac{s_0}{b};$$

$$\frac{s_0}{b} \leq \frac{\Delta_{AS}(\%)}{t(95\%, n - 2)};$$

Таблиця 3.4

Перевірка даних методик кількісного визначення

Назва величини	Значення	Вимоги до критерія	Висновок
b	0,9795	-	-
S _b	0,0044	-	-
a	1,89	≤5,1	Відповідає
S _a	0,448	-	-
SD ₀	0,172	≤1,69%	Відповідає
R _c	0,9999	≥0,99236	Відповідає

Отже, відповідно до отриманих даних, методика проходить всі зазначені критерії і є лінійною, тобто забезпечує визначення суми каротиноїдів у аналізованих мазі в перерахунку на β-каротин з прийнятою точністю при коливаннях наважки або вмісту ±20% від номінального.

Висновки

1. Зроблено огляд літератури з ботанічних характеристик, хімічного складу, біологічної активності та лікарських препаратів на основі обліпихи крушиноподібної. Показано перспективність використання обліпихової олії для створення ранозагоювальних засобів.
2. Вивчено спектральні характеристики серії зразків ранозагоювальної мазі з обліпиховою олією. Показано, що у їх абсорбційному спектрі в області від 350 до 550 нм наявні характерні максимуми поглинання в діапазоні 449–451 нм та 470–490 нм з максимумом при 476 нм. Також у спектрі присутнє характерне плече в області 423–435 нм.
3. Широка інтенсивна смуга поглинання з максимумом близько 450 нм може бути використана для кількісного визначення суми каротиноїдів у перерахунку на β -каротин у складі ранозагоювальної мазі з обліпиховою олією
4. Для ідентифікації β -каротину у складі ранозагоювальної мазі з обліпиховою олією запропоновано використати органолептичний аналіз, спектрофотометричний та метод ТШХ. Аналізована мазь має являти собою однорідну масу, м'якої консистенції, насиченого оранжевого кольору без виразного запаху. Абсорбційний спектр розчину мазі приготовленого для кількісного визначення повинен мати плече в області 424-433 нм, максимум при 449-451 нм і менш інтенсивний максимум при 476 нм. Відношення оптичної густини при 450 нм до оптичної густини в максимумі при 476 нм має становити від 1,06 до 1,30. На хроматограмі досліджуваного розчину мазі має спостерігатися смуга з $R_f = 0,56$, яка за своїм розташування та забарвленням відповідає смузі на хроматограмі робочого стандартного зразку обліпихової олії.

5. Доведено, що допоміжні речовини не заважають кількісному визначенню суми каротиноїдів у складі ранозагоювальної мазі з обліпиховою олією методом абсорбційної спектрофотометрії, оскільки не поглинають електромагнітного випромінювання в області аналітичного максимуму.
6. Розроблено методику кількісного визначення суми каротиноїдів у перерахунку на β -каротин методом прямої однохвильової абсорбційної спектрофотометрії з наступним розрахунком за методом зовнішнього стандарту.
7. Розрахунок повної прогнозованої невизначеності результатів аналізу за розробленою методикою показує, що невизначеність кількісного визначення може становити $\pm 0,725\%$.
8. За розробленою методикою визначено вміст суми каротиноїдів у перерахунку на β -каротин в серії ранозагоювальної мазі з обліпиховою олією. Встановлено, що цей вміст складає $0,1897 \pm 0,00075$ мг/1г.
9. Перевірено лінійність розробленої методики. Доведено, що методика є лінійною, всі параметри лінійності методики відповідають вимогам фармакопеї. Таким чином методика забезпечить визначення суми каротиноїдів у аналізованій мазі у перерахунку на β -каротин з прийнятною точністю при коливаннях наважки або вмісту $\pm 20\%$ від номінального.
10. Розроблені методики ідентифікації і кількісного визначення суми каротиноїдів у складі ранозагоювальної мазі виробництва «Гармонія 2000» з обліпиховою олією будуть використані для складання МКЯ на цей лікарський засіб.

Список літератури:

1. URL: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3101/oblipixa-krushinovidna>
2. Karnjanawipagul P., Nittayanuntawech W., Rojsanga P., Suntornsuk L. Analysis of β -Carotene in Carrot by Spectrophotometry // Mahidol University Journal of Pharmaceutical Science. – 2010. – Vol. 37(1-2). – P. 8–16.
3. Upadhyay N. K., Yogendra Kumar M. S., Gupta A. Antioxidant, cytoprotective and antibacterial effects of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves // Food and Chemical Toxicology. – 2010. – Vol. 48. – P. 3443–3448.
4. Süleyman H., Demirezer L. Ö., Büyükokuroglu M. E., Akcay M. F., Gepdiremen A., Banoglu Z. N., Göçer F. Antiulcerogenic Effect of *Hippophae rhamnoides* L. // Phytotherapy Research. – 2001. – Vol. 15. – P. 625–627.
5. Patsilnakos A., Ragno R., Carradori S., Petralito S., Cesa S. Carotenoid content of Goji berries: CIELAB, HPLC-DAD analyses and quantitative correlation // Food Chemistry. – 2018. – Vol. 268. – P. 49–56.
6. Tan B. L., Norhaizan M. E. Carotenoids: How Effective Are They to Prevent Age-Related Diseases? // Molecules. – 2019. – Vol. 24(9). – P. 1801.
7. Luterotti S., Marković K., Franko M., Bicanic D., Madžgalj A., Kljak K. Comparison of spectrophotometric and HPLC methods for determination of carotenoids in foods // Food Chemistry. – 2013. – Vol. 140. – P. 390–397.
8. Scott K. J. Detection and Measurement of Carotenoids by UV/VIS Spectrophotometry // Current Protocols in Food Analytical Chemistry. – 2001. – Unit F2.2.
9. Kakubari S., Sakaida K., Asano M., Aramaki Y., Ito H., Yasui A. Determination of Lycopene Concentration in Fresh Tomatoes by Spectrophotometry: A Collaborative Study // Journal of AOAC INTERNATIONAL. – 2020. – DOI: 10.1093/jaoacint/qsaa050.
10. Edraki M., Akbarzadeh A., Hosseinzadeh M., Tanideh N., Salehi A., Koohi-Hosseiniabadi O. Healing Effect of Sea Buckthorn, Olive Oil, and Their

Mixture on Full-Thickness Burn Wounds // *Advances in Skin & Wound Care*. – 2014. – Vol. 27. – P. 317–323.

11. Ito H., Asmussen S., Traber D. L., et al. Healing efficacy of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil in an ovine burn wound model // *Burns*. – 2014. – Vol. 40. – P. 511–519.

12. Zeb A. Important Therapeutic Uses of Sea Buckthorn (*Hippophae*): A Review // *Journal of Biological Sciences*. – 2004. – Vol. 4(5). – P. 687–693.

13. Gupta A., Kumar R., Pal K., Singh V., Banerjee P. K., Sawhney R. C. Influence of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) flavone on dermal wound healing in rats // *Molecular and Cellular Biochemistry*. – 2006. – Vol. 290. – P. 193–198.

14. Upadhyay N. K., Kumar R., Siddiqui M. S., Gupta A. Mechanism of Wound-Healing Activity of *Hippophae rhamnoides* L. Leaf Extract in Experimental Burns // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. – 2011. – Vol. 2011. – Article ID 659705.

15. Suryakumar G., Gupta A. Medicinal and therapeutic potential of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2011. – Vol. 138. – P. 268–278.

16. Butnariu M. Methods of Analysis (Extraction, Separation, Identification and Quantification) of Carotenoids from Natural Products // *Journal of Ecosystem & Ecography*. – 2016. – Vol. 6(2). – P. 193.

17. Finkel'shtein E. I. Modern Methods of Analysis of Carotenoids (Review) // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2016. – Vol. 50(2). – P. 96–107.

18. Liaaen-Jensen S., Jensen A. Quantitative Determination of Carotenoids in Photosynthetic Tissues // *Methods in Enzymology* / Ed. A. San Pietro. – Vol. 23. – Academic Press, 1971. – P. 586–602.

19. Koskovac M., Cupara S., Kipic M., Barjaktarevic A., Milovanovic O., Kojicic K., Markovic M. Sea Buckthorn Oil—A Valuable Source for Cosmeceuticals // *Cosmetics*. – 2017. – Vol. 4(4). – P. 40.

20. Beveridge T., Li T. S. C., Oomah B. D., Smith A. Sea Buckthorn Products: Manufacture and Composition // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 1999. – Vol. 47(9). – P. 3480–3488.

21. Бурбан О. І., Зубченко Т. М., Вишневська Л. І. Деякі аспекти щодо розробки складу препарату з протизапальними та ранозагоювальними властивостями // Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології: Матеріали VIII Міжнар. наук.-практ. конф., Харків, 7-8 лист. 2019 р. – Харків, 2019. – С. 99–101.

22. Науменко Л. С., Попова Н. В., Гладух Е. В., Бобрицкая Л. А. Исследование минерального состава сырья облепихи крушиновидной (*Hippophaë rhamnoides* L.) // Norwegian Journal of development of the International Science. – 2020. – № 38, Vol. 1. – С. 46–49.

23. Ващук С. С. Дослідження регенерувальних властивостей олії обліпихи у формі мазі : кваліфікаційна робота на здобуття освітнього ступеня «Магістр» : спец. 226 «Фармація. Промислова фармація» / С. С. Ващук. – Луцьк : ВНУ ім. Лесі Українки, 2024.

24. Науменко Л. С. Фармакогностичне вивчення обліпихи крушиноподібної (*Hippophaë rhamnoides* L.) : дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії : спец. 226 «Фармація, промислова фармація» / Л. С. Науменко. – Харків : НФаУ, 2024.

25. Пат. 108698 UA, МПК A61K 36/185 (2006.01), A61K 9/06 (2006.01), A61P 17/02 (2006.01). Засіб у формі мазі для лікування ран, опіків та запальних процесів шкіри / Бурбан О. І., Вишневська Л. І. ; заявник і патентовласник Бурбан О. І., Вишневська Л. І. – № u201602387 ; заявл. 07.03.2016 ; опубл. 25.07.2016, Бюл. № 14.

26. Пат. 119193 UA, МПК A61K 36/185 (2006.01), A61K 9/06 (2006.01), A61K 31/355 (2006.01), A61K 31/7048 (2006.01), A61P 17/02 (2006.01). Спосіб одержання лікарського засобу для лікування ран, опіків та запальних процесів шкіри / Вишневська Л. І., Бурбан О. І. ; заявник і патентовласник Вишневська

Л. І., Бурбан О. І. – № u201703151 ; заявл. 29.03.2017 ; опубл. 11.09.2017, Бюл. № 17.

27. Попович В. П., Коваль С. М., Хохленкова Н. В. Дослідження гострої токсичності та ранозагоювальної дії мазі «Біосепт» // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2012. – № 3 (10). – С. 98–100.

28. Яковенко В. К., Вишневецька Л. І., Бурбан О. І., Процкая В. В., Бабічева А. М. Дослідження стабільності при зберіганні мазі з густим екстрактом кори дуба // Соціальна фармація в охороні здоров'я. – 2019. – Т. 5, № 3. – С. 51–59. DOI: 10.24959/sphhcj.19.152.

29. Sea buckthorn oil (*Hippophae rhamnoides* oleum) : Monograph 2615 // European Pharmacopoeia. – 8th Ed., Suppl. 8.5. – Strasbourg : EDQM, Council of Europe, 2015.

30. Мазі (Unguenta) // Державна Фармакопея України : в 3 т. – 2-е вид. – Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – Т. 1. – С. 346–348.

31. 2.9.12. Визначення гранулометричного складу методом аналітичного просіювання // Державна Фармакопея України : в 3 т. – 2-е вид. – Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – Т. 1. – С. 190–191.

32. 5.1.4. Мікробіологічна чистота лікарських засобів // Державна Фармакопея України : в 3 т. – 2-е вид. – Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – Т. 1. – С. 819–828.

33. Належна виробнича практика : Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2020. – Введ. 04.09.2020. – Київ : Міністерство охорони здоров'я України, 2020. – 340 с. – (Лікарські засоби).

34. Випробування стабільності : Настанова СТ-Н МОЗУ 42-3.1:2004. – Введ. 11.06.2004. – Київ : Міністерство охорони здоров'я України, 2004. – 47 с. – (Лікарські засоби).

35. Šťastová J., Jež J., Bártlová M., Sovová H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂-III. Extraction from sea buckthorn // *Chemical Engineering Science*. – 1996. – Vol. 51, No. 18. – P. 4347–4352.
36. Zielińska A., Nowak I. Abundance of active ingredients in sea-buckthorn oil // *Lipids in Health and Disease*. – 2017. – Vol. 16. – P. 95. DOI: 10.1186/s12944-017-0469-7.
37. Cenkowski S., Yakimishen R., Przybylski R., Muir W.E. Quality of extracted sea buckthorn seed and pulp oil // *Canadian Biosystems Engineering/Le génie des biosystèmes au Canada*. – 2006. – Vol. 48. – P. 3.9–3.16.
38. Beveridge T., Li T.S.C., Oomah B.D., Smith A. Sea buckthorn products: Manufacture and composition // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 1999. – Vol. 47, No. 9. – P. 3480–3488.
39. Koehn C. J., Sherman W. C. The Determination of Vitamin A and Carotene with the Photoelectric Colorimeter.
40. Державна Фармакопея Республіки Казахстан : [у 2 т.]. – 1-е вид. – Алмати : Видавничий дім «Жибек жоли», 2008. – Т. 1. – 592 с