

Національний фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України

Національний фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Котов Семен Андрійович

УДК 615.07:615.32:615.014: 615.218.3

ДИСЕРТАЦІЯ

**Аналітичне забезпечення фармацевтичної розробки рослинного засобу
антиалергічної дії**

226 – Фармація, промислова фармація

22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело



Котов С.А.

Науковий керівник Гонтова Тетяна Миколаївна, доктор фармацевтичних наук,
професор

Харків – 2023

АНОТАЦІЯ

Котов С.А. Аналітичне забезпечення фармацевтичної розробки рослинного засобу антиалергічної дії. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація» (22 – Охорона здоров'я). – Національний фармацевтичний університет, МОЗ України, Харків, 2023.

Дисертаційна робота присвячена актуальному питанню – аналітичному забезпеченню фармацевтичної розробки комбінованого рослинного лікарського засобу для лікування алергічних захворювань, що супроводжуються імунною дисфункцією.

У ході попереднього аналізу вхідної сировини, що входить до складу комбінованого рослинного засобу, з'ясовано відповідність аналізованих зразків нагідок квіток та глоду листя та квіток вимогам відповідних монографій ДФУ за всіма показниками та необхідність розробки сучасних методик контролю якості череди трави.

Проведений детальний аналіз різної нормативної документації, що регламентує вимоги до якості череди трироздільної трави, а також аналіз різних вітчизняних зразків сировини дало змогу сформулювати тексти розділів Ідентифікація А, Ідентифікація В та Сторонні домішки для проектів національної монографії «Череди трава^N» для ДФУ 2.2 та ДФУ 2.5. З'ясовано, що окрім макроскопічних ознак стебел, листків, кошиків та квіток, особливості морфологічної будови сім'янок є важливими для ідентифікації та діагностики *Bidens tripartita*, а також інших, не фармакопейних, видів череди.

Розроблено та валідовано ТШХ-методику ідентифікації череди трави і контролю домішок інших видів череди в фармакопейному виді, де як стандарти запропоновано використання ФСЗ ДФУ лютеоліна, гіперозида та вперше ФСЗ ДФУ череди пониклої (ч. пониклої).

Розроблена методика, що заснована на спектрофотометричному визначенні глікозидів флавоноїдів череди трави після реакції з сумішшю борна – щавлева кислота

у середовищі кислот мурашина – оцтова; на основі аналізу більш 10 серій сировини із різних місць України та років збору встановлена регламентація – не менше 1% суми флавоноїдів у перерахунку на лютеолін-7-глюкозид.

Розроблена методика, що заснована на гравіметричному визначенні полісахаридів череди трави після висадження їх із водного витягу сировини етанолом на основі аналізу 7 серій сировини із різних місць України та років збору. Методики запропоновані для проектів національної монографії «Череди трава^N» для ДФУ 2.2 та ДФУ 2.5.

Вперше методами ТШХ і ВЕРХ виділено та ідентифіковано кверцитрин, речовину, яка є діагностичною для ч. пониклої, домішки якої можна контролювати за допомогою описаних методів у фармакопейному виді.

Методами ВЕРХ і ТШХ досліджено компонентний склад флавоноїдних сполук різних видів трави череди. Встановлено подібність компонентного складу для ч. трироздільної та ч. листяної та відмінність для ч. пониклої. Показано, що основним компонентом у досліджених зразках ч. трироздільної є лютеолін-7-глюкозид із вмістом від 30 до 63 %. Серед інших речовин виявлено лютеолін із вмістом від 1 % до 12 %, поліацетилени, халкони (бутеїн) із вмістом від 8 % до 11 %.

Показано кореляційний зв'язок між результатами кількісного визначення суми флавоноїдів, визначених СФ-методом та результатами ВЕРХ визначення основних компонентів – лютеоліну та лютеоліну 7-глюкозиду в зразках ч. трироздільної, а також кореляційний зв'язок між інтенсивністю зон на ТШХ-хроматограмах різних зразків та вмістом відповідних речовин (хлорогенової кислоти, лютеолін-7-глюкозиду, кверцитрину), отриманих методом ВЕРХ.

В результаті розробки фітохімічного і фітофармакологічного дизайну, а також дослідження кореляційної залежності «дія-сума БАР» для вибраних комбінацій ЛРС, а саме для комбінації череди трава–нагідок квітки–глоду листя та квітки (6:3:1) та 2-х комбінацій зі співвідношенням компонентів $\pm 10\%$ від комбінації (6:3:1), виявлена сильна, пряма і статистично значуща кореляційна залежність між вмістом

оксикоричних кислот, поліфенолів, тритерпенів, білків/амінокислот, полісахаридів і такими фармакологічними діями, як капілярозміцнювальна, протизапальна, імуностимулююча, жовчогінна, гепатопротекторна, що поліпшує обмін речовин, сечогінна, гіпотензивна, седативна, загальнозміцнювальна, десенсибілізуюча, протисвербіжна, репаративна і потогінна. Це дало змогу припустити перспективність комбінованого ЛРЗ поліфункціональної дії, що розробляється, в комплексній терапії алергічних захворювань, що супроводжуються зниженням резистентності організму та імуностатусу.

Розроблено технологічні підходи щодо екстракції ч. трироздільної трави, нагідок лікарських квіток і глоду листя та квіток, проведено відпрацювання критичних технологічних параметрів екстракції обраних рослин в лабораторних умовах.

В результаті дослідження процесу екстрагування різних класів БАР, а саме поліфенолів, флавоноїдів, полісахаридів, екстрактивних речовин з досліджених видів ЛРС, які є складовими майбутнього комбінованого ЛРЗ, з'ясовано, що оптимальним співвідношенням для всіх видів ЛРС є співвідношення сировина/екстрагент 1:20, 40% етанол є оптимальним екстрагентом з погляду збалансованої екстракції флавоноїдів, полісахаридів й поліфенолів і 48 год є достатніми для їх кількісного вилучення. Встановлено пряму кореляцію між результатами вмісту поліфенолів та флавоноїдів і значенням ТЕАС водно-спиртових витягів для всіх видів ЛРС. Новизну досліджень підтверджено патентом України на корисну модель №149399 від 17.11.2021.

В лабораторних умовах відпрацьована технологія одержання комбінованого рослинного засобу, яка передбачає одержання засобу в різних формах, а саме у формі подрібненої сировини (для виробництва рослинного чаю у пакетах), рідкого екстракту, густого екстракту, сухого екстракту, а також в дозованій формі у вигляді капсул, тобто для різних груп пацієнтів. Новизну досліджень підтверджено патентом України на винахід №126141 від 17.08.2022. Для капсульної маси комбінованого рослинного засобу вивчені фармако-технологічні характеристики, зокрема фракційний склад методом лазерної дифракції.

Проведено фітохімічний аналіз комбінованого рослинного збору, що передбачається в якості рослинного чаю у фільтр-пакетах. В результаті встановлено, що 1 фільтр-пакет містить $3,0 \pm 0,3$ мг флавоноїдів, $5,4 \pm 0,5$ мг поліфенолів, $76,0 \pm 6,5$ мг полісахаридів.

В результаті детального фітохімічного аналізу сухого комбінованого екстракту та окремих його складових з використанням методів ВЕРХ, СФ, денситометрії, з'ясовано що він містить $3,13 \pm 0,09$ % флавоноїдів в перерахунку на лютеолін-7-глюкозид, $5,03 \pm 0,10$ % поліфенолів в перерахунку на пірогалол і $0,44 \pm 0,04$ % терпеноїдів у перерахунку на олеанолову кислоту.

Розроблено методики контролю якості для різних лікарських форм комбінованого рослинного засобу, які є уніфікованими для будь якої контрольної точки технологічного процесу, що є важливим етапом фармацевтичної розробки.

Розроблено проект МКЯ «Асенсефіт чай» на комбінований рослинний збір/рослинний чай у фільтр-пакетах, з методами ідентифікації за розділами, які є обов'язковими при вивченні якості рослинних лікарських засобів: ідентифікація А – макроскопія, ідентифікація В – мікроскопія, ідентифікація С – ТШХ та доведена можливість розпізнання всіх його рослинних компонентів при їх спільній присутності. Дану лікарську форму запропоновано стандартизувати за кількісним вмістом полісахаридів – не менше 70 мг/1 фільтр-пакеті та за вмістом поліфенолів – не менш 5 мг/1 фільтр-пакеті.

Розроблено проект МКЯ «Асенсефіт екстракт сухий» на комбінований рослинний сухий екстракт, для якого серед іншого розроблено ТШХ-методику ідентифікації та 2 спектрофотометричні методики кількісного визначення. Субстанцію запропоновано стандартизувати за кількісним вмістом суми флавоноїдів у перерахунку на лютеолін-7-глюкозид – не менше 3% та за вмістом суми поліфенолів – не менше 5 %.

Визначено параметри стандартизації капсул комбінованого рослинного засобу відповідно до вимог ДФУ до цієї дозованої форми. Розроблено комплекс фізико-

хімічних методик аналізу, що дозволяє провести систематичне забезпечення фармацевтичної розробки капсул «Асенсефіт». Вивчено валідаційні характеристики методики кількісного визначення поліфенолів у капсулах відповідно до вимог ДФУ, згідно якої регламентовано не менш 12 мг поліфенолів в одній капсулі.

З метою попереднього вивчення фармакологічної активності досліджено кореляцію між вмістом БАР у різних комбінаціях рослинних екстрактів, які є складовими комбінованого засобу та їх антиоксидантною активністю. У 2-х компонентних комбінаціях екстрактів череда/нагідки, нагідки/глід виявлено адитивний ефект при визначенні їх антиоксидантної активності, і тільки для комбінації екстракт череди/екстракт глоду 1:0,5 зроблена припущенність про наявність синергетичного ефекту. Усі проаналізовані 3-компонентні композиції, які охоплювали діапазон можливих варіацій компонентів у багатокомпонентному рослинному засобі, проявляли антиоксидантну активність в межах цих можливих варіацій ($\pm 10\%$). Виявлена сильна позитивна кореляція між вмістом поліфенолів у досліджуваних комбінаціях і знайденою антиоксидантною активністю, використовуючи коефіцієнт Пірсона.

Вперше при дослідженні протиалергічних властивостей розробленого комбінованого рослинного сухого екстракту на моделі анафілактичного шоку і на моделі активної кожної анафілаксії з'ясовано, що він в дозі 30 мг/кг виявляє протиалергічну активність на рівні рослинного протиалергічного препарату Тесаліну і значно перевищує Діазолін. В тесті непрямой дегрануляції опасистих клітин комбінований екстракт не відрізнявся за мембраностабілізуючими властивостями від дії Дезлоратадину і значно перевищував препарати порівняння Діазолін і Тесалін, що дало змогу зробити висновок про те, що механізм анатіалергічної дії комбінованого засобу пов'язаний не тільки з антигістамінними властивостями, а й зі здатністю стабілізувати клітинні мембрани.

Ключові слова: комбінований рослинний препарат, череда трава, нагідок квітки, глоду листя та квітки, технологія одержання, стандартизація, антиалергічна дія.

Список публікацій здобувача

1. Котова Э.Э., Котов А.Г., Колычев И.А., Котов С.А. Разработка ТСХ-методик идентификации и контроля примесей для национальной монографии Государственной Фармакопеи Украины «Череды трава». *Вестник фармации*. (Витебск). 2017. № 3 (77). С. 62–67. (Особистий внесок – брав участь в експериментальних роботах та підготовці статті).
2. Вовк О.Г., Котов А.Г., Котова Е.Е., Количев І.О., Котов С.А. До питання макроскопічної ідентифікації лікарської сировини череди трироздільної трави. *Фармаком*. 2017. № 1. С.17-23. (Особистий внесок – брав участь в експериментальних роботах та підготовці статті).
3. Kotov S., Kotova E., Bezruk I., Gontova T., Kotov A. A Research of the component content of hawthorn leaves/flowers alcoholic extracts and their antioxidant activity. *Danish Scientific Journal*. 2020. №38 (1). С. 55-60. (Особистий внесок – виконання експериментальних досліджень, формулювання цілей та задач дослідження, підготовка статті до друку).
4. Kotov S.A, Kotova E.E., Bezruk I. V., Gontova T.N., Kotov A.G. Study of the dynamics extraction of biologically active substances from the bur-marigold herb and antioxidant activity of the obtained extracts. *EUREKA: Health Sciences*. 2020. № 6. С. 95-101. doi.org/10.21303/2504-5679.2020.001408 (Особистий внесок – брав участь в плануванні експерименту, проведенні експериментальних робіт та написанні статті).
5. Kotova Elina E., Kotov Semen A., Kotov Andriy G. Study of chromatographic fingerprint of flavonoid compounds of the bur-marigold herb. *Scientific Study & Research - Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*. 2021. XXII (1). P. 65-79. CSCC6202101V01S01A0007 [0005250] (WoS). (Особистий внесок – виконання експериментальних досліджень, формулювання цілей та задач дослідження, підготовка статті до друку).
6. Котов С. А., Гонтова Т. М., Котов А. Г.. Аспекти проектування комбінованого засобу поліфункціональної дії на основі лікарської рослинної сировини.

Фармацевтичний журнал. 2021. Т. 76 (5). С. 57-67. doi.org/10.32352/0367-3057.5.21.06. (Особистий внесок – брав участь у плануванні експерименту, проведенні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті).

7. Котов С. А., Гонтова Т. М., Соколова О. О. Вивчення можливості ідентифікації індивідуальних рослин у багатокомпонентному лікарському рослинному засобі. *Фармацевтичний часопис*. 2021. № 3. С.22-28. doi.org/10.11603/2312-0967.2021.3.12477. (Особистий внесок – брав участь в експериментальних роботах, узагальненні результатів та підготовці статті).

8. Котов С. А., Гонтова Т. М., Соколова О. О. Удосконалення фармакопейної ідентифікації череди трави за макро- і мікроскопічними ознаками. *Вісник фармації*. 2022. № 1 (103). С.3-9. doi.org/10.24959/nphj.22.72 (Особистий внесок – брав участь в експериментальних роботах та написанні статті).

9. Kotov S., Gontova T., Kononenko N., Chernyavski E., Chikitkina V. Phytochemical analysis and anti-allergic activity of a combined herbal medicine based on bur-marigold, calendula and hawthorn. *Pharmacia*. 2022. 69 (1). P. 237-247. (Scopus) doi: 10.3897/pharmacia.69.e77624. (Особистий внесок – брав участь в плануванні експерименту, проведенні експериментальних робіт, аналізі результатів дослідження, підготовці статті до друку).

10. Котов С.А., Гонтова Т.М. Стандартизація дозованої форми комбінованого рослинного засобу-антиалергічної дії. *Annals of Mechnikov's Institute*. 2022. № 4. С. 42–51. doi.org/10.5281/zenodo 7436777 (Особистий внесок – брав участь у плануванні експерименту, проведенні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті до друку).

11. Котов С.А., Гонтова Т.М. Вивчення залежності між вмістом поліфенолів в різних комбінаціях рослинних екстрактів та їх антиоксидантною активністю багатокомпонентного рослинного засобу антиалергічної дії. *Фармацевтичний журнал*. 2022, Т. 77 (5). С.65-73. doi.org/10.32352/0367-3057.5.22.07 (Особистий внесок – брав

участь у плануванні експерименту, проведенні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті до друку).

12. Котов С.А., Котов А.Г., Гонтова Т.М., Кононенко Н.М., Чернявські Е.С., Рубан О.А. Спосіб одержання комбінованого рослинного засобу антиалергічної дії: пат. на корисну модель 149399 України: МПК А61К36/60, А61К127/00, А61К133/00. № у 2020 08228; заяв. 22.12.2020; опубл. 17.11.2021, Бюл. № 46 (Особистий внесок – брав участь в патентному пошуку, одержанні лікарського засобу та оформленні патенту).

13. Котов С. А., Котов А.Г., Гонтова Т.М., Кононенко Н.М., Чернявські Е.С., Рубан О.А. Фармацевтична композиція на основі лікарської рослинної сировини із антиалергічною дією. Пат. на винахід № 126141 України. № ua 2020 08229; Заяв. 22.12.2020; Опубл. 17.08.2022, Бюл. № 33. (Особистий внесок – брав участь в патентному пошуку, одержанні лікарського засобу та оформленні патенту).

14. Kotov S. Precondition to the development of the herbal medicinal product with desensitizing activity. *Український часопис*. 2019. Т. 2, № 6 (134) : Science and Modern Pharmaceutical Manufacturing : materials of VII Scientific and Practical Conference of Farmak's School of Young Scientists with International involvement. Kyiv, November 21 st, 2019. P. 12–13.

15. Котов С.А., Котова Е.Е., Безрук І. В., Гонтова Т.М., Котов А.Г. Визначення вмісту біологічно активних речовин та антиоксидантної активності спиртових витягів нагідків лікарських. *Сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження*: матеріали наук.-практ. дистанційної між нар. конфер., 19-20 травня 2020 р., м. Івано-Франківськ. Івано-Франківськ: ІФНМУ, 2020. С. 164-166 с.

16. Kotov S., Gontova T. Evaluation of the polysaccharide fraction content of the bur-marigold herb by gravimetric and spectrophotometric methods. *Contemporary pharmacy: issues, challenges and expectations*: International e-conference. 23 October 2020, Kaunas. Kaunas: Lithuanian University of Health Sciences, 2020. – P. 38.

17. Котов С.А., Гонтова Т.М., Котов А.Г. Технологічні аспекти екстракції череди трави, нагідок квіток і глоду листя та квіток. *Planta+. Наука, практика та освіта*: матеріали Міжнар. наук.-практ. конф., м. Київ, 19 лют. 2021 р. Київ : Паливода А. В., 2021. С. 226–230.

18. Котов С.А., Гонтова Т.М. Вивчення антиоксидантної активності череди трави неокупраїновим методом. *Topical issues of new medicines development*: матеріали XXVIII міжнар. наук.-практ. Конф. Молодих вчених та студ., присвяч. 150-річчю з дня народження М.О. Валяшка, м. Харків, 18-19 березня 2021 р. Харків: НФаУ, 2021, С. 77-79.

19. Kotov Semen. Study of the water extracts composition from the combined herbal tea with antiallergic activity. *Современная медицина и фармацевтика: новые подходы и актуальные исследования*: материалы 75-ой междунар. научно-практ. конфер студентов-медиков и молодых учёных. г. Самарканд, 18 мая 2021 г. *Журнал гепато-гастроэнтерологических исследований*. 2021. № 2 (1). С. 135–136.

20. Котов Семен, Гонтова Тетяна, Котова Еліна. Вивчення хроматографічного профілю комбінованого лікарського рослинного екстракту. *Державна Фармакопея України — європейська якість вітчизняних лікарських засобів*: матеріали наук.-практ. дистанц. конфер., м. Харків, 25-26 листопада 2021 року. *Фармаком*. 2021. С. 65-69.

21. Котов С.А., Гонтова Т.М. Фракційний склад капсульної маси комбінованого рослинного засобу антиалергічної дії методом лазерної дифракції. *Міждисциплінарні дослідження: гуманітарні та природничі науки* матеріали наук.-практич. конференції «» м. Одеса, 22-23 липня 2022 р.. – Одеса: Видавництво «Молодий вчений», 2022. – С. 106-110.

22. Котов С., Гонтова Т. Підходи до стандартизації череди трави за вмістом полісахаридів. *Planta+. Наука, практика та освіта*: матеріали Міжнар. наук.-практ. конф., м. Київ, 20 лют. 2023 р. Київ : Паливода А. В., 2023. Т.2. С. 59-62.

ANNOTATION

Kotov S. A. Analytical support for the pharmaceutical development of a herbal antiallergic medicine. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

The thesis for a Doctor of Philosophy degree by specialty 226 «Pharmacy, industrial pharmacy» (22 – Health care). – National University of Pharmacy, Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2023.

The thesis is devoted to a topical issue – the analytical support of the pharmaceutical development of a combined herbal medicine for the treatment of allergic diseases accompanied by immune dysfunction.

During the preliminary analysis of the raw materials included in the combined herbal product, the compliance of the analyzed samples of calendula flowers and hawthorn leaves and flowers with the requirements of the relevant monographs of the SPhU for all indicators and the need to develop modern methods for quality control of the bur-marigold herb was clarified. A detailed analysis of various normative documents, as well as an analysis of various domestic samples of the bur-marigold herb, made it possible to formulate the texts of sections Identification A, Identification B and Foreign matter for the drafts of the national monograph "Bur-marigold herb " for the SPhU 2.2 and SPhU 2.5. It was found that, in addition to the macroscopic features of stems, leaves and flowers, the morphological structure of the seeds is important for the identification and diagnosis of *B. tripartita*, as well as other, non-pharmacopoeial species of the genus..

TLC-methods for identification of the bur-marigold herb and control of impurities of other types of species in the pharmacopoeial form were developed and validated, where the use of RS SPhU luteolin, hyperoside and, for the first time, RS SPhU of *B. cernua* was proposed as standards. A technique has been developed based on the spectrophotometric determination of flavonoid glycosides after reaction with a mixture of boric – oxalic acid in the medium of formic - acetic acids; a regulation was established - minimum 1% of the total

flavonoids in terms of luteolin-7-glucoside based on the analysis of more than 10 batches of the bur-marigold herb from different places of Ukraine and years of collection. A technique has been developed based on the gravimetric determination of polysaccharides after their precipitation from aqueous extract of raw materials with ethanol based on the analysis of 7 series of the bur-marigold herb from different places in Ukraine and years of collection. The methods are proposed for the drafts of the national monograph "Bur-marigold herb" for the SPhU 2.2 and SPhU 2.5.

For the first time, quercitrin was isolated and identified by TLC and HPLC methods, a substance that is diagnostic for *B. cernua*, the impurities of which can be controlled using the described methods in the pharmacopoeial form. The component composition of flavonoid compounds of various types of the bur-marigold herb was investigated by HPLC and TLC methods. The similarity of the component composition was found for the *B. tripartita* and the *B. frondosa*, and the difference for the *B. cernua*. It is shown that the main component in the studied samples of the bur-marigold herb is luteolin-7-glucoside with a content from 30 to 63%. Among other substances, luteolin with a content of 1% to 12%, polyacetylenes, chalcones (butein) with a content of 8% to 11% was found.

The correlation was shown between the results for quantitative determination by the UV method of the sum flavonoids and the HPLC results of the determination of main components - luteolin and luteolin 7-glucoside in samples of a *B. tripartita*, as well as the correlation between the intensity of the zones in the TLC chromatograms for various samples and the content of the corresponding substances (chlorogenic acid, luteolin-7-glucoside, quercitrin) obtained by HPLC method.

A strong, direct and statistically significant correlation was found between the content of oxycinnamic acids, polyphenols, triterpenes, proteins/amino acids, polysaccharides and such pharmacological effects as capillary-strengthening, anti-inflammatory, immunostimulating, choleric, hepatoprotective, improving metabolism, diuretic, hypotensive, sedative, tonic, desensitizing, antipruritic, reparative and diaphoretic as a result of the development of the phytochemical and phytopharmacological design, as well as the

study of the "action-sum of biologically active substances" correlation for selected combinations of herbal drugs, namely for the combination of the bur-marigold herb–calendula flowers–hawthorn leaves and flowers (6:3:1) and 2 combinations with the ratio of components $\pm 10\%$ of the combination (6:3:1). This made it possible to assume the perspective of the combined herbal medicine of the multifunctional action in the complex therapy of allergic diseases accompanied by a decrease in the body's resistance and immune status.

Technological approaches have been developed for the extraction of the bur-marigold herb, calendula flowers, and hawthorn leaves and flowers, and the critical technological parameters of extraction of selected plants have been worked out in laboratory conditions. It was found that the optimal ratio for all types of plants is the herbal drug/extractant ratio 1:20, 40% ethanol is an optimal extractant in terms of balanced extraction of flavonoids, polysaccharides and polyphenols and 48 hours are sufficient for their quantitative extraction. A direct correlation was established between the results of the content of polyphenols and flavonoids and the TEAC value of water-alcohol extracts for all types of herbal drugs. The novelty of the research was confirmed by the patent of Ukraine for a utility model No. 149399 dated November 17, 2021.

The technology of obtaining a combined herbal medicine has been developed in laboratory conditions, which involves obtaining the medicine in various forms, namely in the form of powdered raw materials (for the production of herbal tea in bags), liquid extract, soft extract, dry extract, as well as in a dosage form - capsules. The novelty of the research was confirmed by the patent of Ukraine for the invention No. 126141 dated August 17, 2022.

A phytochemical analysis of the combined herbal collection was carried out, which is intended as herbal tea in filter bags. As a result, it was determined that 1 filter bag contains $3,0 \pm 0,3$ mg of flavonoids, $5,4 \pm 0,5$ mg of polyphenols, and $76,0 \pm 6,5$ mg of polysaccharides. It was found that dry combined extract contains $3,13 \pm 0,09\%$ of flavonoids in terms of luteolin-7-glucoside, $5,03 \pm 0,10\%$ polyphenols in terms of pyrogallol and $0,44 \pm 0,04\%$ terpenoids in

terms of oleanolic acid as a result of a detailed phytochemical analysis of the dry combined extract and its individual components using HPLC, UV, densitometry methods.

Unified methods of quality control have been developed, taking into account the specific dosage form of the combined herbal medicine. A project of the quality control method for a combined herbal collection/herbal tea in filter bags «Asensephyt, herbal tea» has been developed, with methods of identification according to sections, which are mandatory for herbal medicinal products: identification A – macroscopy, identification B – microscopy, identification C – TLC and the possibility of recognizing all plant components has been proven in their joint presence. This dosage form is proposed to be standardized by the quantitative content of polysaccharides – minimum 70 mg/1 filter bag and by the content of polyphenols m 5 mg/1 filter bag.

A project of the quality control method for a combined herbal dry extract «Asensephyt, extract dry» has been developed, for which, among other things, the TLC method of identification and 2 spectrophotometric methods of quantitative determination were developed. The substance is proposed to be standardized by the quantitative content of the sum of flavonoids in terms of luteolin-7-glucoside – not less than 3% and the content of the sum of polyphenols - not less than 5%.

The parameters of standardization of capsules of the combined herbal extract have been developed in accordance with the requirements of the SPhU for this dosage form. A set of physico-chemical methods of analysis has been developed, which allows systematic support for the pharmaceutical development of capsules. The validation characteristics of the method for the assay of polyphenols in capsules were studied in accordance with the requirements of the SPhU, according to which are regulated at least 12 mg of polyphenols in one capsule.

For the purpose of preliminary study of pharmacological activity, the correlation between content of BAS content in various combinations of plant extracts, which are components of the combined herbal medicine, and their antioxidant activity was investigated. An additive effect was found in the 2-component combinations of bur-marigold/calendula and calendula/hawthorn extracts when determining their antioxidant activity, and an

assumption was made about the presence of a synergistic effect only for the combination of bur-marigold extract/hawthorn extract 1:0.5. All analyzed 3-component compositions, which covered the range of possible variations of components in a combined herbal medicine, showed antioxidant activity within the limits of possible variations ($\pm 10\%$).

For the first time, it was found that combined herbal dry extract at dose 30 mg/kg showed antiallergic activity at the level of the herbal anti-allergic drug Tesalin and significantly exceeds Diazolin when studying the anti-allergic properties on the model of anaphylactic shock and on the model of active anaphylaxis. The combined extract did not differ in membrane-stabilizing properties from the action of Desloratadine and significantly exceeded the Diazolin and Tesalin in the test of indirect degranulation of mast cells; it can be concluded that the mechanism of anti-allergic action of the combined herbal extract is associated not only with antihistaminic properties, but also with the ability to stabilize cell membranes.

Key words: combined herbal preparation, bur-marigold herb, calendula flowers, hawthorn leaves and flowers, production technology, standardization, anti-allergic effect

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	19
ВСТУП	20
РОЗДІЛ 1.ЛІКАРСЬКА РОСЛИННА СИРОВИНА, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ У ЯКОСТІ ЗАСОБІВ АНТИАЛЕРГІЧНОЇ ДІЇ. ПІДХОДИ ДО ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ РОЗРОБКИ І СТАНДАРТИЗАЦІЇ (Огляд літератури)	27
1.1 Лікарська рослинна сировина як альтернатива традиційним засобам антиалергічної дії	27
1.2 Ботанічна характеристика, хімічний склад та фармакологічні властивості череди трироздільної трави, глоду листя та квіток, нагідок квіток	32
1.3 Підходи до стандартизації череди трироздільної трави, нагідок квіток, глоду листя та квіток	44
1.4 Фітохімічний та фітофармакологічний аналіз сумарних рослинних препаратів	47
1.5 Фармацевтична розробка – основа створення якісних ефективних та безпечних лікарських препаратів	48
РОЗДІЛ 2 ОБ’ЄКТИ, МЕТОДИ ТА МЕТОДИКИ ДОСЛІДЖЕННЯ	52
2.1 Об’єкти дослідження	52
2.2 Матеріали, методи та обладнання досліджень	53
2.2.1 Фізичні, хімічні та фізико-хімічні методи аналізу	53
2.2.2 Фармакогностичні методи аналізу	59
2.2.3 Фармакологічні методи аналізу	59
2.2.4 Технологічні випробування	63
2.2.5 Статистична обробка результатів	64
РОЗДІЛ 3 ВХІДНИЙ КОНТРОЛЬ ЛРС, ЩО ВХОДИТЬ ДО СКЛАДУ	65

РОСЛИННОГО ЗАСОБУ	
3.1 Дослідження якості нагідок квіток на відповідність вимогам національної монографії ДФУ «Нагідок квітки»	65
3.2 Дослідження якості глоду листя та квіток на відповідність вимогам національної монографії ДФУ «Глоду листя та квітки»	67
3.3 Розробка показників якості череди трави для національної монографії ДФУ	68
3.3.1 Вивчення макроскопічних та мікроскопічних ознак череди трироздільної у порівнянні із іншими видами роду	68
3.3.2 Розробка ТШХ методик ідентифікації БАР череди трави та контролю домішок інших видів череди	74
3.3.3 Вивчення хроматографічного профілю флавоноїдних сполук різних видів роду череда	81
3.3.4 Розробка методик кількісного визначення БАР череди трави	89
3.4 Дослідження якості череди трави на відповідність національної монографії ДФУ «Череди трава ^N »	92
Висновки до Розділу 3	94
РОЗДІЛ 4. ПІДХОДИ ДО ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ РОЗРОБКИ РОСЛИННОГО ЗАСОБУ АНТИАЛЕРГІЧНОЇ ДІЇ, ЇЇ АНАЛІТИЧНЕ ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ЯКОСТІ	97
4.1. Дизайн комбінованого рослинного засобу	97
4.2. Відпрацювання технології, визначення критичних параметрів отримання рослинного засобу в лабораторних умовах	103

4.2.1 Вивчення технологічних параметрів екстракції	103
4.2.2 Вивчення динаміки вилучення БАР вибраних видів ЛРС в залежності від концентрації екстрагенту та антиоксидантної активності отриманих екстрактів	106
4.2.3 Технологія одержання комбінованого рослинного засобу в різних лікарських формах	114
4.3 Фітохімічні дослідження комбінованого рослинного засобу	118
Висновки до розділу 4	125
РОЗДІЛ 5. СТАНДАРТИЗАЦІЯ ТА ВИВЧЕННЯ АНТИАЛЕРГІЧНОЇ ДІЇ КОМБІНОВАНОГО РОСЛИННОГО ЗАСОБУ	129
5.1 Розробка методик контролю якості комбінованого рослинного засобу	129
5.1.1 Критерії стандартизації комбінованого рослинного збору	130
5.1.2. Критерії стандартизації комбінованого рослинного сухого екстракту - субстанції	136
5.1.3. Критерії стандартизації дозованої форми комбінованого рослинного екстракту	143
5.2. Дослідження антиоксидантної активності рослинного засобу в умовах <i>in vitro</i>	151
5.3. Вивчення антиалергійної активності рослинного засобу	157
Висновки до Розділу 5	162
ВИСНОВКИ	165
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	168
ДОДАТКИ	186

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

БАР – біологічно активні речовини

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

ВЕТШХ – високоефективна тонкошарова хроматографія

ДФ РБ – Державна фармакопея Республіки Білорусь

ДФ СРСР – Державна фармакопея Союзу Радянських Соціалістичних Республік

ДФУ – Державна фармакопея України

ЕКО ФА – експертна кількісна оцінка фармакологічної активності

ЄФ – Європейська фармакопея

ЛРЗ – лікарський рослинний засіб

ЛРП – лікарський рослинний препарат

ЛРС – лікарська рослинна сировина

МКЯ – методи контролю якості

МОЗ – Міністерство охорони здоров'я

НФаУ – Національний фармацевтичний університет

СЗ – стандартний зразок

СФ – спектрофотометрія

ТЕАС – Тролокс-еквівалент антиоксидантної активності

ТКМ – традиційна китайська медицина

ТШХ – тонкошарова хроматографія

УФ – ультрафіолетова область

ФСЗ ДФУ – фармакопейний стандартний зразок Державної фармакопеї України

ABTS – (2,2'-азинобіс-(3-етилбензотіазолін-6-сульфонова кислота)

DER – співвідношення кількості рослинної сировини, використаної у виробництві екстракту до кількості отриманого екстракту

DSR – співвідношення кількості рослинної сировини, використаної у виробництві екстракту до кількості використаного екстрагенту

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Алергічні захворювання займають значне місце в клінічній практиці. В даний час в усьому світі відзначається щорічне зростання алергопатологій, викликаних в основному несприятливою екологічною обстановкою, зміною імунної реактивності організму, нераціональним харчуванням. За даними статистики 20% населення страждає сьогодні від різних алергічних захворювань. Результати досліджень епідеміології алергічних хвороб вказують на їх широке поширення та неухильне зростання.

Одним з напрямків профілактики і лікування алергічних захворювань є застосування фітотерапії. Препарати рослинного походження, завдяки наявності суми біологічно активних речовин, м'яко діють на організм, впливають на різні сторони складного етіопатогенезу алергії, відновлюють порушені функції імунної відповіді.

Перспективним є розробка комбінованого рослинного лікарського засобу поліфункціональної дії для лікування алергічних захворювань, що супроводжуються імунною дисфункцією.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами
Дисертаційна робота виконана у відповідності з планом проблемної комісії «Фармація» МОЗ та НАМН України і є фрагментом комплексних науково – дослідних робіт Національного фармацевтичного університету «Фармакогностичне дослідження лікарської рослинної сировини та розробка фітотерапевтичних засобів на її основі» (номер державної реєстрації 0114U000946), «Розробка та валідація методів контролю якості лікарських засобів аптечного та промислового виробництва» (номер державної реєстрації 0114U000949), а також відповідно до плану робіт зі створення Державної Фармакопеї України згідно Указу Президента України № 615/98 від 11.06.1998 та на виконання науково-дослідних робіт із розробки та підготовки монографій до Державної Фармакопеї України 2-го видання (Державний реєстраційний номер 0107U012267).

Мета і завдання.

Метою даної роботи було аналітичне забезпечення якості лікарської рослинної сировини, проміжних продуктів її переробки і рослинного засобу антиалергічної дії у процесі фармацевтичної розробки.

Для досягнення мети були поставлені такі завдання дослідження:

1. Провести аналіз та узагальнити сучасні літературні дані про фармакологічні властивості, хімічний склад та підходи до стандартизації ЛРС, що входить до складу рослинного засобу антиалергічної дії;
2. Провести експериментальні дослідження комплексу показників якості обраної сировини для розробки лікарського засобу антиалергічної дії;
3. Розробити сучасні методики контролю якості череди трави для проектів монографії ДФУ;
4. Провести дослідження із фармакотерапевтичного обґрунтування передбачуваного лікарського засобу;
5. Провести експериментальні дослідження отримання лікарського засобу, визначення критичних технологічних параметрів;
6. Провести експериментальні попередні фітохімічні дослідження, виявити основні групи біологічно активних речовин передбачуваного лікарського засобу;
7. Провести експериментальні дослідження із розробки методик якісного і кількісного визначення БАР у проміжних продуктах виробництва і лікарському засобі;
8. Вивчити антиалергічні властивості отриманого лікарського засобу на моделях гіперчутливості негайного типу.

Об'єкт дослідження. Аналітичне забезпечення фармацевтичної розробки рослинного засобу антиалергічної дії.

Предмет дослідження. Дослідження якості вхідної сировини (глоду листя та квітки, нагідок квітки) і розробка методик контролю якості череди трави; відпрацювання технології виготовлення передбачуваного комбінованого ЛЗ, визначення критичних параметрів його виробництва; розробка методик контролю

якості проміжних продуктів і готового ЛЗ; вивчення фармакологічної активності отриманого ЛЗ.

Методи дослідження

Фармакопейні (ТШХ, ВЕТШХ, ВЕРХ, денситометрія, абсорбційна спектрометрія в ультрафіолетовому та видимому діапазоні); фармакогностичні (відбір проб та пробопідготовка, макро- та мікроскопічний аналіз, визначення золи, екстрактивних речовин та ін.); технологічні (технологічні параметри сировини та параметри технологічного процесу); біологічні (дослідження антиалергічної активності за умов відтворення реакцій гіперчутливості повільного типу, на моделі анафілактичного шоку, тест на дегрануляцію опасистих клітин у щурів); статистичні (статистичну обробку результатів експериментальних досліджень проводили відповідно до вимог ДФУ); якісний склад сировини вивчали із застосуванням хроматографічних методів (тонкошарової, високоефективної рідинної), вміст БАР визначали гравіметричним, спектрофотометричним, хроматографічним (ВЕРХ), денситометричним методами. Фармакологічну активність вивчали на моделях *in vitro* та *in vivo*.

Наукова новизна отриманих результатів

Вперше розроблені сучасні національні методики контролю якості череди трави, що дало змогу розробити проекти монографій «Череди трава^N» для ДФУ 2.2 і ДФУ 2.5. При розробці методик контролю інших видів череди в фармакопейному виді вперше методами ТШХ і ВЕРХ виділено та ідентифіковано кверцитрин, речовину, яка є діагностичною для ч. пониклої, домішки якої можна контролювати за допомогою описаних методів у фармакопейному виді.

Вперше розроблено технологічний процес виробництва комбінованого лікарського рослинного засобу антиалергічної дії на основі череди трави, нагідок квіток і глоду листя і квіток. Новизна досліджень підтверджена патентом України на корисну модель № 149399 від 17.11.2021.

В результаті дослідження різних технологічних етапів розроблена і відпрацьована в лабораторних умовах технологія одержання комбінованого

рослинного засобу, яка передбачає одержання засобу в різних формах, а саме у формі подрібненої сировини (для виробництва рослинного чаю у пакетах), рідкого екстракту, густого екстракту, сухого екстракту, а також в дозованій формі у вигляді капсул.

Для аналітичного забезпечення якості ЛРЗ, різними фізико-хімічними методами встановлено наявність і кількість в комбінованому рослинному засобі екстрактивних речовин, полісахаридів, флавоноїдів, гідроксикоричних кислот, поліфенольних сполук, терпеноїдів.

Розроблено методики контролю якості для різних лікарських форм комбінованого рослинного засобу, які є уніфікованими для будь якої контрольної точки технологічного процесу, що є важливим етапом фармацевтичної розробки.

Вперше при дослідженні фармакологічної дії розробленого комбінованого сухого рослинного екстракту на моделі анафілактичного шоку з'ясовано, що він виявляє протиалергічну активність на рівні препарату порівняння Діазолін, на моделі активної кожної анафілаксії встановлена здатність комбінованого екстракту зменшувати проникність капілярів шкіри на рівні рослинного протиалергічного препарату Тесалін, а в тесті непрямой дегрануляції тучних клітин комбінований екстракт не відрізнявся за мембрано стабілізуючими властивостями від дії Дезлоратадину і значно перевищував препарати порівняння Діазолін і Тесалін.

Практичне значення отриманих результатів

На основі проведених експериментальних досліджень визначено основні показники якості вітчизняних зразків череди трави, які були включені до проекту монографії ДФУ 2.2 «Череди трава» (акти впровадження від ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів» №11/320-5, №11/321-5, №11/323-5 від 18.03.2020 р.) та в процесі перегляду національної монографії удосконалені методики ідентифікації за макро- і мікроскопічними ознаками та розроблено методику визначення вмісту полісахаридів в сировині, які були запропоновані до проекту монографії ДФУ 2.5 «Череди трава^N» (акти впровадження №11/131-5, №11/132-5, №11/133-5 від 17.04.2023 р.).

Розроблено технологію отримання комбінованого лікарського засобу антиалергічної дії у виді екстракту сухого для виготовлення таблетованих і капсульних форм, подрібненого збору ЛРС для виготовлення таблетованих і капсульних форм, збору лікарських рослин у пачках (пакетах, фільтр пакетах), дозованої форми у вигляді капсул (підтверджено патентом України на винахід № 126141 від 17.08.2022).

Розроблено уніфіковані методики контролю якості для постадійного контролю виробництва на отримані лікарські рослинні засоби. Розроблено проекти МКЯ «Асенсефіт чай» на комбінований рослинний збір/рослинний чай у фільтр-пакетах, «Асенсефіт екстракт сухий» на комбінований рослинний сухий екстракт та «Асенсефіт капсули»; методики апробовані в лабораторії фармакопейного аналізу ДП «Фармакопейний центр», яка атестована Державною службою України з лікарських засобів та контролю за наркотиками на право проведення контролю якості та безпеки лікарських засобів.

При дослідженні фармакологічної дії встановлено антиалергічну активність розробленого комбінованого рослинного екстракту.

Особистий внесок здобувача

Безпосередньо автором здійснено:

- інформаційно-патентний пошук за темою дисертаційної роботи;
- аналіз та систематизацію інформації стосовно проблеми алергічних захворювань у світі та використання при лікуванні алергій препаратів на основі лікарської рослинної сировини;
- аналіз існуючих нормативно-аналітичних документів зі стандартизації вибраних об'єктів;
- вхідний контроль якості вибраних об'єктів відповідно до вимог національних монографій ДФУ;
- розробку проектів національної монографії ДФУ 2.2 і ДФУ 2.5 «Череди трава^N» (розділи Ідентифікація А та Ідентифікація В, ТШХ - методики ідентифікації і контролю домішок інших видів череди в фармакопейному виді, уніфікована

спектрофотометрична методика визначення суми флавоноїдів у перерахунку на лютеолін-7-глюкозид, методика визначення вмісту суми полісахаридів);

- відпрацювання технології отримання комбінованого рослинного засобу в різних лікарських формах;

- розробку проектів МКЯ для різних лікарських форм комбінованого рослинного засобу;

- дослідження кореляції між вмістом поліфенолів у різних комбінаціях рослинних екстрактів, які є складовими комбінованого засобу та їх антиоксидантною активністю

- узагальнення даних отриманих у ході фармакологічних досліджень одержаних лікарських рослинних засобів.

Постанову мети, завдань дослідження, обговорення та узагальнення результатів здійснено за участю наукового керівника. Співавторами наукових праць є науковий керівник Гонтова Т.М та науковці, спільно з якими проведені дослідження, а саме Котов А.Г., Соколова О.О., Котова Е.Е., Вовк О.Г., Количев І.О., Безрук І. В., Кононенко Н.М., Чернявські Е.С., Рубан О.А., Чикіткіна В.В. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, дисертанту належить фактичний матеріал і основний творчий доробок.

Апробація матеріалів дисертації

Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня: VII Scientific and Practical Conference of Farmak's School of Young Scientists with International involvement "Science and Modern Pharmaceutical Manufacturing" (Kyiv November 21 st, 2019). науково-практичній дистанційній міжнародній конференції «Сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження» (Івано-Франківськ 19-20 травня 2020 р.); International e-conference «Contemporary pharmacy: issues, challenges and expectations» (Kaunas 23 October 2020); Міжнародній науково-практичній конференції «Planta+. Наука, практика

та освіта» (Київ, 19 лют. 2021 р); XXVIII міжнародній науково-практичній конференції Молодих вчених та студентів, присвяч. 150-річчю з дня народження М.О. Валяшка «Topical issues of new medicines development» (Харків, 18-19 березня 2021 р); 75-ой международной научно-практической конференции студентов-медиков и молодых учёных «Современная медицина и фармацевтика: новые подходы и актуальные исследования» (Самарканд, 18 мая 2021 г); науково-практичній дистанційній конференції «Державна Фармакопея України – європейська якість вітчизняних лікарських засобів» (Харків, 25-26 листопада 2021 року); науково-практичній конференції «Міждисциплінарні дослідження: гуманітарні та природничі науки» (Одеса, 22-23 липня 2022 р); Міжнародній науково-практичній конференції «Planta+. Наука, практика та освіта» (Київ, 20 лют. 2023 р).

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 233 сторінках машинописного тексту, складається із анотації, вступу, 5 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел та 3 додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає 167 сторінок друкованого тексту. Робота ілюстрована 51 таблицями та 38 рисунками. Список використаних джерел містить 179 найменувань, з них 82 кирилицею та 97 латиницею.

РОЗДІЛ 1
ЛІКАРСЬКА РОСЛИННА СИРОВИНА, ЩО ВИКОРИСТОВУЄТЬСЯ У ЯКОСТІ
ЗАСОБІВ АНТИАЛЕРГІЧНОЇ ДІЇ. ПІДХОДИ ДО ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ
РОЗРОБКИ І СТАНДАРТИЗАЦІЇ
(Огляд літератури)

1.1 Лікарська рослинна сировина як альтернатива традиційним засобам антиалергічної дії

В даний час в усьому світі відзначається щорічне зростання алергопатологій, викликаних в основному несприятливою екологічною обстановкою, зміною імунної реактивності організму, нераціональним харчуванням. За даними статистики до 30% населення страждає сьогодні від різних алергічних захворювань (алергічний риніт вражає від 10% до 30% населення). До 20% пацієнтів з алергією живуть із важкою виснажливою формою свого стану та щодня борються зі страхом можливого нападу астми, анафілактичного шоку чи навіть смерті від алергічної реакції [1,2]. Результати досліджень епідеміології алергічних хвороб вказують на їх широке поширення і неухильне зростання. Сьогодні понад 150 мільйонів європейців страждають від хронічних алергічних захворювань, і за поточними прогнозами до 2025 року половина всього населення Європи буде вражена алергічними захворюваннями [3].

Антигістамінні препарати – специфічна група протиалергічних ліків, фармакологічним ефектом яких є блокада H-рецепторів. Сьогодні на ринку присутні три покоління ЛП цієї групи:

– *антигістамінні препарати I покоління* — неселективні блокатори гістамінових рецепторів (димедрол, супрастин, діазолін, кетотифен та інші). Характерними для них є виражений седативний ефект. При тривалому їх застосуванні знижується їх ефективність;

– *антигістамінні препарати II покоління* — терфенадин, лоратадин, астемізол, цетиризін та інш. відрізняються відсутністю седативного ефекту. Однак терфенадин і астемізол мають суттєвий побічний ефект — вплив на серцево-судинну систему.

– *антигістамінні препарати III покоління* є активними метаболітами препаратів II покоління (фексофенадин, норастеміз, дезлоратадин), застосування їх найбільш раціональне при проведенні тривалої терапії алергічних захворювань (цілорічний алергічний риніт, сезонний алергічний риніт [4-6].

Таким чином, препарати, що блокують H1-рецептори гістаміну як 1-го так і 2-го покоління мають цілу низку небажаних ефектів, що, безумовно, обмежує їх застосування [7]. В результаті багато пацієнтів із хронічними алергічними захворюваннями шукають альтернативну медицину, щоб досягти кращого контролю над симптомами. Незважаючи на обмежені дані про ефективність та безпеку рослинних препаратів в лікуванні алергічних станів, у всьому світі зростає інтерес до використання альтернативної медицини, в тому числі і до лікарських рослин [8,9].

Тому актуальною є розробка протиалергійних препаратів на основі лікарської рослинної сировини (ЛРС). Особливо перспективною є група комбінованих галенових і новогаленових лікарських рослинних препаратів (ЛРП), які можна розглядати як альтернативу і / або доповнення до основного лікування. На користь цього говорить практика зростання їх використання в зв'язку з доступністю, відносно низькою токсичністю і можливістю тривалого використання без, практично, побічних ефектів. Препарати рослинного походження, завдяки наявності різноманітних біологічно активних речовин (БАР), можуть м'яко діяти на організм, впливати на різні сторони складного етіопатогенезу алергії, відновлювати порушені функції імунної відповіді [10,11]. Особливої уваги заслуговує факт обмеженості на фармацевтичному ринку України антиалергічних засобів на основі рослинної лікарської сировини, яка за умов вірного дозування та тривалості застосування не поступається ефективності синтетичним молекулам та значно перевищує їх за показником безпечності застосування. Аналіз ринку таких препаратів виявив, що в Україні зареєстрованим

лікарським рослинним препаратом є «Тесалін», виробник Швейцарія, та гомеопатичний препарат німецького виробництва «Ринітал», інші вітчизняні засоби, які позиціонуються як протиалергічні, не є лікарськими, і навіть деякі із них не є БАДами (деякі з них наведені в табл. 1.1), що підтверджує актуальність розробки вітчизняних протиалергічних препаратів на основі лікарської рослинної сировини.

Підходи до використання рослин у медицині, комбінації і синергія.

Традиційна практика використання лікарських рослин у фітомедицині в багатьох частинах світу передбачає призначення комбінацій лікарських рослин із широким спектром дії, які одночасно охоплюють декілька стратегій лікування. Комбінації забезпечують спільну роботу декількох активних складових, що може призвести до адитивного або синергетичного ефекту взаємодії. Термін «синергія» стосується рецептури цілих комбінацій трав, потенціал яких збільшується за допомогою адитивних, або синергетичних взаємодій. Майстерність та практика поєднання рослин таким чином - це досвід, який розвивався протягом багатьох поколінь [12,13].

Синергетичні взаємодії мають життєво важливе значення у фітомедицині для пояснення труднощів з виділенням єдиного активного інгредієнта та для пояснення ефективності явно низьких доз активних компонентів у рослинному продукті. Ця концепція, відповідно до якої повністю або частково очищений екстракт рослин, має перевагу перед окремим ізольованим інгредієнтом, також лежить в основі філософії фітотерапії [14].

Концепція синергії є також невід'ємною частиною філософії традиційної китайської медицини (ТКМ). Вважається, що синергетичні взаємодії між рослинами в складних сумішах ТКМ здатні збільшувати біодоступність активних компонентів, сприяти терапевтичним ефектам та / або зменшувати токсичність [15]. Дизайн рослинних сумішей повинен дотримуватися принципу відповідності, званому «Рейу», який вимагає розгляду різних взаємозв'язків рослинних інгредієнтів, включаючи синергізм.

Таблиця. 1.1

**Перелік препаратів і БАД на основі рослинної сировини антиалергічної дії,
зареєстрованих на ринку України**

№	Назва	Складові	Виробник	Дозована форма	Примітка
1	Тесалін	екстракт з листя кремени гібридної (Petasites hybridus L.)	Max Zeller Zyone AG, Швейцарія	таблетки	Лікарський препарат
2	Протиалергічна суміш	трава м'яти перцевої, корінь лопуха, трава череди, корінь солодки, квіти бузини, корені алтея, кульбаби	ТОВ НП, НВП, Віола Україна	Таблетки	Дієтична добавка
3	Алебонін	Екстракт бамбука Екстракт імбиру Екстракт конюшини	Yvonika, Україна	Капсули	Продукт не є лікарським засобом
4	Рінолірге тацин	Екстракт бамбука Екстракт імбиру	Yvonika, Україна	Капсули	Продукт не є лікарським засобом. Не є БАД
5	Алеріксун	Екстракт імбиру Екстракт шавлії	Yvonika, Україна	Капсули	Продукт не є лікарським засобом. Не є БАД
6	Алергіл фітоконцентрат	Водно-спиртові екстракти брусниці листя, берези листя, череди трави, споришу трави, фіалки, кукурудзи стовпчиків з рильцями, аронії чорноплідної плодів, солодки коренів	Екомед, Україна	Розчин	Дієтична добавка
7	Ринітал	Luffa operculata D4 25 мг, Galphimia glauca D3 25 мг, Cardiospermum D3 25 мг	Deutsche Homoeopathie-Union DHU-Arzneimittel GmbH & Co. KG Німеччина	Таблетки	Гомеопатичний препарат

Базуючись на цьому принципі, різні рослини поєднуються відповідно до правила «Jun-Chen-Zuo-Shi» (також відомого як «Імператор-міністр-помічник-кур'єр») для досягнення бажаних ефектів та / або для мінімізації побічних ефектів. «Jun» – це основна рослина в суміші з відносно більш високим співвідношенням у складі, безпосередньо спрямована на хворобу; «Chen» – є допоміжною рослиною для підвищення терапевтичного ефекту ключової рослини або для боротьби з супутніми симптомами; «Zuo» – зазвичай використовується для зменшення побічних ефектів рослинної суміші; «Shi» – це рослина, яке направляє активні інгредієнти, щоб досягти цільових органів або гармонізувати їх дії [15].

Принцип відбору рослин для даного дослідження. Рослинний препарат, завдяки наявності різноманітних біологічно активних речовин, може м'яко впливати на організм, впливати на різні сторони комплексного етіопатогенезу алергії, відновлювати порушені функції імунної відповіді. У зв'язку з цим перспективною є розробка комбінованого рослинного препарату поліфункціональної дії для лікування алергічних захворювань, що супроводжуються порушенням імунної функції, до складу якого можуть входити рослини з бактерицидною, протиалергічною, протизапальною активністю (наприклад: кропива, череда, ожина, коров'як, бузина, лопух та ін.), зі спазмолітичною та протисклеротичною дією (наприклад: ліщина, конюшина, глід, береза, шипшина, гінкго, спаржа та ін.), з репаративною та імунокоригуючою дією (наприклад, солодка, нагідки, женьшень, оман, алое, ехінацея та ін.) [16-19]. Ці види рослин не викликають побічних ефектів, таких як сонливість, негативний вплив на печінку та/або нирки тощо. Однак слід враховувати, що багато рослин самі часто є алергенами (наприклад, пилок рослин, квітуча рослина). Тому основним завданням пошуку є склад ЛРС з біологічно активними речовинами, які підвищують неспецифічну резистентність організму, нормалізують імунний статус [20].

У результаті вивчених даних, було обрано рослини які найчастіше використовуються для лікування алергії та супровідних захворювань і далі для дослідження були відібрані рослини на основі таких критеріїв: рослина росте в Україні,

має достатню сировинну базу і є достатньо вивченою (з хімічної й фармакологічної точки зору), в ідеалі якість її має бути регламентована монографіями ДФУ. В результаті вибір був зупинений на комбінації Череда-нагідки-глід.

1.2 Ботанічна характеристика, хімічний склад та фармакологічні властивості череди трироздільної трави, глоду листя та квіток, нагідок квіток

Череди трироздільної трава. За протиалергічну дію головною відповідальною рослиною в вибраному складі є *B. tripartita*. Рід череда (*Bidens* L.) об'єднує понад 200 видів, у флорі України він представлений 5 видами: ч. трироздільна (*B. tripartita* L.), ч. поникла (*B. cernua* L.), ч. східна (*B. orientalis* Velen.), ч. променева (*B. radiata* Thuill.) і ч. листяна (*B. frondosa* L.). Перші чотири види є автохтонними, аборигенними представниками флори. *B. frondosa* – адвентивний, інвазійний вид, занесений із Північної Америки, який за останні десятиріччя активно розселюється на території України та у багатьох точках свого вторинного ареалу витісняє аборигенні види, зокрема, *B. tripartita* [21-23].

Всі зазначені види череди, крім *B. orientalis*, яка зростає в Криму, поширені в межах всіх ботаніко-географічних районів України. За відношенням до умов зволоження ці види є гігрофітами, типовими представниками флори вологих екотопів. Вони переважно зростають вздовж берегів різних водойм, а *B. tripartita* та *B. frondosa*, крім того, часто трапляються на забур'янених місцях. Збіг ареалів та ідентичність місцезростань часто спричинює наявність у складі сировини фармакопейного виду – *B. tripartita* інших видів, сировину яких не слід заготовляти [24].

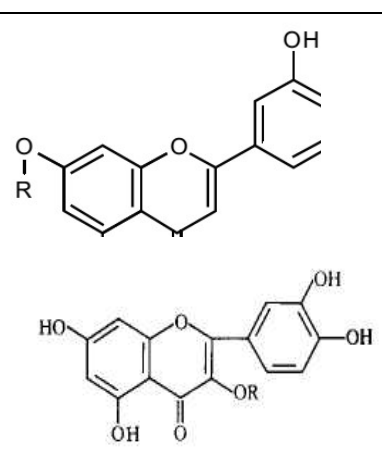
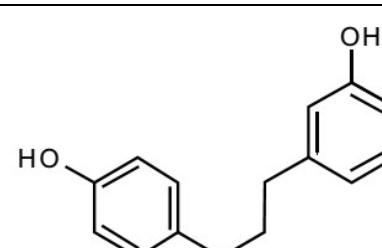
Трава *B. tripartita* користується значною популярністю в народній медицині завдяки її потогінній, бактерицидній, протизапальній, ранозагоювальній дії. У науковій медицині широко застосовується як потогінний засіб при простудних захворюваннях. Особливо показано її застосування в дитячій практиці при золотусі та діатезі, вона входить до складу збору за прописом М.Н. Здренка. [17, 22, 25].

Хімічний склад ч. трироздільної представлений наступними класами біологічно активних речовин (БАР): флавоноїдні сполуки - флавоноїди (лютеолін, лютеолін-7-глюкозид) (до 1,3 %), флаванони (ізокореопсин, флаваномареїн), асоційовані халкони (включаючи бутеїн); аурони (сульфуретин, сульфуреїн та ін.), полісахариди, вуглеводи (4,5-4,7 %), гідроксикоричні кислоти [26]. Вміст флавоноїдів у квітках вдвічі менше того, що міститься в траві. Основні компоненти екстрактів череди - флавоноїди 7-глюкозида ізооканіну, лютеоліну та похідні тридекану, такі як тридека-1,12-дієн-3,5,7,9-тетреїн [27]. Крім того інші фітохімічні дослідження *Bidens tripartita* показали наявність кумаринів, ефірної олії, полісахаридів, каротиноїдів, лактонів, амінів та мінеральних елементів. У петролейному екстракті трави череди ідентифіковані тритерпени, ненасичені аліфатичні вуглеводні, ефіри жирних кислот і стерини з домінуючим серед них стигмастерином [28-31].

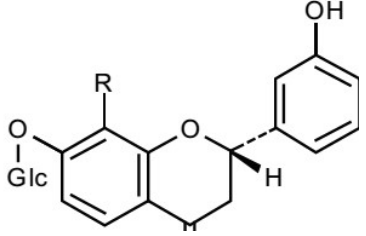
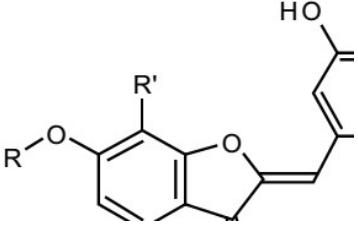
В табл. 1.2. наведено структурні формули основних БАР череди.

Таблиця 1.2

Основні БАР трави череди

Клас	Речовина	Структурна формула
Флавоноїди	Luteolin R = H	
	Cynarozide R = Glc	
	Quercitrin R = Rha	
Халкони	Butein	

Продовження табл. 1.2

Клас	Речовина	Структурна формула
Халкони	Isocoreopsin R = H	
	Flavanomarein R = OH	
Аурони	Maritimetin R = H R' = OH	
	Maritimein R = H R' = H	
	Sulfuretin R = Glc R' = OH	
	Sulfurein R = Glc R' = H	

В табл. 1.3 наведено літературні дані стосовно наявності основних БАР флавоноїдної природи в трьох видах роду череда [17, 32-34].

Таблиця 1.3

Хімічний склад видів роду череда

<i>Bidens tripartita</i>	<i>Bidens frondosa</i>	<i>Bidens cernua</i>
1	2	3
Флавоноїди: лютеолін (0.025 %), 7-глюкозид лютеоліна (0.48 %), 7-глюкопиранозид лютеоліна	лютеолін, 7-глюкозид лютеоліна	лютеолін, 7-глюкозид лютеоліна, кверцитрин (0.6%)
Халкони: битеїн (0.05 %), ізокореопсин (0.025 %), флаваномареїн (0.015 %), битеїн-7-О-β-D-глюкопиранозид	битеїн, кореопсин, окаїн, мареїн	флаваномареїн (0.09 %), ізокореопсин (0.14 %), битеїн, (0.006 %), кореопсин (0.025 %), битеїн-7-О-β-D-глюкопиранозид
Аурони: сульфуретин (0.4 %), сульфуреїн (0.2 %), маритиметин (0.35 %), маритимеїн (0.005 %)	маритиметин, сульфуретин, сульфуреїн	сульфуретин, маритиметин (0.45 %), маритимеїн (0.01 %)

Як видно із наведених даних у табл. 1.3, хімічний склад БАР різних видів череди достатньо близький. Єдина сполука, що відрізняє ч. пониклу від двох інших видів - це кверцитрин, кількість якого згідно [33] досить суттєва.

Препарати череди трави проявляють протиалергічну, антиоксидантну, протимікробну, протигрибкову, гепатопротекторну, імуностимулюючу та гіпотензивну дію. Ця фармакологічна активність визначається наявністю флавоноїдів, поліфенольних сполук, полісахаридів, компонентів ефірних олій, поліацетиленів тощо [18, 22, 25, 35-39].

Квітки та трава *B. tripartita* є джерелом антиоксидантів, які виявляють властивості поглинання радикалів. У цьому дослідженні зазначено, що хоча загальний вміст фенольних сполук в екстрактах трави вищий, ніж в екстрактах квіток, останні більш активні в поглинанні радикалів [27]. Автори припустили, що не тільки вміст суми поліфенолів, але й загальний склад екстракту та інші фактори (розчинник, антиоксидантний синергізм) можуть відігравати важливу роль у прогнозуванні його антиоксидантної активності.

Було показано, що *B. tripartita* має потужну протидіабетичну дію, а його активні компоненти (хлорогенова кислота, лютеолін і 7-О-глюкозид лютеоліну) корисні при діабеті та його ускладненнях [40]. У дослідженні зазначено, що водні екстракти *B. tripartita* мають виражену антибактеріальну активність проти грампозитивних коків, грамнегативної кишкової палички, а спиртові екстракти із сировини демонструють високу мембрано стимулюючу та протизапальну активність завдяки наявності поліфенольних сполук, гідроксикоричних кислот та органічних кислот [41].

У дослідженні для експериментального лікування хворих на псоріаз використовували 70% етанольний екстракт надземних частин череди та мазь, що містила 2,5% цього екстракту [36]. Гель на основі екстрактів череди, отриманих шляхом екстракції 60% етанолом, показав стійкі регенеративні властивості та прискорював процес рубцювання [42]. Було продемонстровано, що протианафілактичний ефект водних настоїв череди статистично значуще не відрізнявся

від одного з препаратів порівняння кромоглікату натрію, тому їх рекомендували як протиалергічні засоби [43]. Ті ж автори в іншій роботі показали, що полісахариди та флавоноїди череди статистично достовірно ($p < 0,05$) зменшують кількість дегранульованих тучних клітин порівняно з такою у зразку з алергеном, що свідчило про стабілізуючий ефект на тучні клітини полісахаридів і флавоноїдів сировини у досліджуваних дозах [44]. В інших дослідженнях показано, що флавоноїди череди зменшують кількість гістаміну при експериментальній алергії [45]. Крім того, протиалергічна активність лютеоліну та його похідних, які є домінантними серед флавоноїдів череди, підтверджена багатьма дослідниками [46, 47].

Також доведено, що сума полісахаридів череди регенерує імунні порушення і за своєю ефективністю не гірше за препарат «Імунал» для корекції імунодефіцитних станів [48, 49]. Водні настої надземної частини *B. tripartita* виявляли значну протизапальну активність порівняно з індометацином [50].

Виявлено, що екстракти череди *in vitro* мають тенденцію захищати ДНК і здатність пригнічувати ферменти, що беруть участь у поширених патологіях, таких як діабет і нейродегенеративні захворювання. Препарати череди також мають антипроліферативну дію, що може бути використано в подальшому для лікування раку. Автори пов'язують спостережувані біологічні властивості з наявністю біологічно активних метаболітів, таких як хлорогенова кислота, епікатехін і лютеолін-7-глюкозид [51].

Аналіз літератури показав, що хімічний склад ЛРС череди досить різноманітний і неможливо виділити якусь одну сполуку чи навіть певний клас природних сполук як маркери череди. Цей вид має широкий спектр фармакологічної дії, і за дію її препаратів відповідає не одна конкретна речовина (можливо, домінуюча серед інших), а весь комплекс біологічно активних речовин.

Нагідок квітки. Другою рослиною у вибраному складі є нагідки лікарські (календула лікарська) - *Calendula officinalis*, які не є традиційним засобом боротьби з алергією, але мають хорошу доказову базу їх протизапальної дії.

Нагідки лікарські - одна з найпоширеніших у всіх куточках земної кулі рослин. Відомо понад 20 видів роду календула, що ростуть у Середземномор'ї на Близькому Сході, а також у Центральній Європі, Африці та Азії. Календула лікарська здавна культивується як однорічна рослина, що використовується в декоративних та лікувальних цілях практично в кожній європейській країні, а також у США, Середній Азії та на Кавказі [18,22, 23, 52].

Широкий спектр дії календули обумовлений значним вмістом у сировині комплексу БАР: каротиноїдів, флавоноїдів, фенілпропаноїдів, стеринів, тритерпиноїдів, ефірних олій, кумаринів, макро- та мікроелементів [23, 53-57].

Квітки містять ізопренові сполуки: моно-, сескві-, ди-, три-, тетратерпеноїди. Серед монотерпенових сполук переважають біциклічні: камфен, борнеол, камфора. Тритерпенові спирти, представлені моноолами, діолами і тріолами, які в основному етерифікуються лауриною, пальмітиною, міристиною та оцтовою кислотами; тритерпенові глікозиди (похідні олеанолової кислоти): глікозид F (календулозид E), календулозид A (глікозид I), глікозид G, календулозид A (глікозид II), глікозид D (календулозид G), календулозид F, глікозид III, глікозид IV (календулозид C), глікозид B, глікозид C (календулозид H), календулозид B, глікозид V, календулозид D, глікозид A, глікозид VI, глікозид VII, глікозид VIII. Вміст глікозидів олеанолової кислоти в коренях і надземній частині Н.л. коливається від 4 до 5%. [58-61].

У складі нагідок містяться каротиноїди (у середньому 3% у квітках несправжньоязичкового типу): β -, γ -, δ -каротин, лікопін, неуроспорин, фітоєн, фітофлуїн, рубіксантин, ксантофіл (лютеїн), зеаксантин, віолоксантин, флавохром, цитроксантин (мутатоксанти), флавоксантин, хризантемаксантин. Вміст каротиноїдів у трубчастих жовтих квітках становить 91,2 мг%, в язичкових жовтих – 195,4 мг%; в язичкових темно-жовтогарячих квітках – 1546,6 мг% [52, 62].

Вміст флавоноїдів в сировині знаходиться у межах від 0,33 до 0,88%, основні з них ізорамнетин, ізорамнетин- 3-глюкозид, ізорамнетин- 3- рутинозид (нарцисин), ізорамнетин-3- β - глюкопіранозид, ізорамнетин- 3- β -D- глюкопіранозид- 6-1- β -L-

рамнофуранозид, кверцетин- 3- β -D- глюкопіранозид, рутин а також флавонолові аглікони ізорамнетин і кверцетин [22, 23, 56, 58, 60, 63-66].

Полісахариди нагідок представлені арабінозою, глюкозою, галактозою, ксилозою і рамнозою, уроноювою кислотою й манозою. Такі вуглеводи, як водорозчинні полісахариди (14,75%), геміцелюлоза (5,92%) й пектинові речовини (9,67%) містяться в суцвіттях нагідок [67, 68]. При вивченні компонентного складу комплексу водорозчинних полісахаридів календули, було встановлено, що вони складаються із 5 основних компонентів, які є кислими полісахаридами (рамногалактуронан I) і саме вони є відповідальними за імунотропну активність препаратів календули [69].

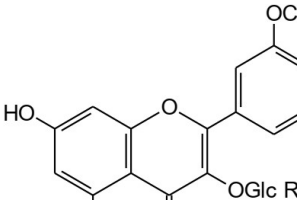
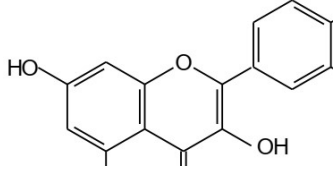
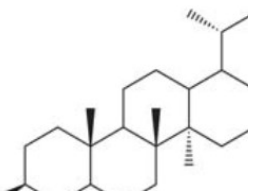
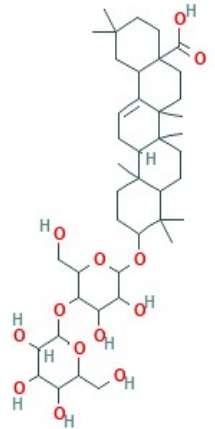
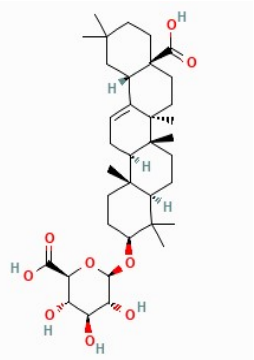
В табл.1.4 наведено структурні формули деяких із основних БАР нагідок квіток.

Календула використовується як у традиційній, так і в народній медицині через її антибактеріальну та протигрибкову дію, протівірусну активність, протизапальну, імуностимулюючу, протипухлинну та протиліпідемічну дію [52, 56, 70-73]. Кверцетин, що входить до складу сировини має високі антиоксидантні та протизапальні властивості, що доведено багатьма дослідженнями *in vivo* та *in vitro* [74, 75]. Механізм протиалергічної дії кверцетину через інгібування ферментів і медіаторів запалення також був детально вивчений [76]. Встановлено, що кверцетин не тільки пригнічує синтез та секрецію медіаторів анафілаксії, але й має пряму розслаблюючу дію на анафілактичні скорочення гладкої мускулатури, індуковані гістаміном, ацетилхоліном [77].

Водорозчинні полісахариди нагідок квіток асоціюють з імуностимулюючою активністю препаратів нагідок. Полісахариди PS-I, -II та -III нагідок квіток мають імуностимулюючу активність при концентрації від 10,5 до 10,6 мг/мл, що стимулює фагоцитоз людських гранулоцитів *in vitro* [52, 69]. Протиалергічна і протизапальна дія спиртового екстракта та інших препаратів календули пояснюється здатністю знижувати синтез лейкотриєнів й пригнічувати міграцію лейкоцитів у центрі запалення. Виділені з нагідок флавоноїдні глікозиди ізорамнетину є інгібіторами ліпооксигенази [78].

Таблиця 1.4

Деякі основні БАР нагідок квіток

Клас	Речовина	Структурна формула
Флавоноїди	Ізорамнети́на-3-О-рутинозид (нарцисин)	
	Кверцетин	
Сапоніни	Фарадіол-3-О-лаурат (R-лаурат) Фарадіол-3-О-міристат (R-міристат) Фарадіол-3-О-пальмітат (R-пальмітат)	
Похідні олеанолової кислоти	Календулозид А	
	Календулозид Е	

Терпеноїди сировини зокрема тритерпенові спирти та глікозиди олеонової кислоти-календулозиди А-Н проявляли виражену протизапальну активність [79, 80].

Похідні фарадіолу нагідок такі як ефір фарадіол-3-міристинової кислоти, ефір фарадіол-3-пальмитинової кислоти і 4-тараксостерол, відомі своєю протизапальною, а також протинабряковою дією, що є важливим для полегшення стану, спричиненого алергічною реакцією [81,82].

Глоду листя та квітки. І третьою сировиною у вибраному складі є глоду листя та квітки. Глід (*Crataegus* L.), мабуть, один із найпопулярніших родів, плоди, квіти та листя багатьох видів якого широко використовуються як у народній, так і в науковій медицині. Плоди та квітки глоду є офіційними практично у всіх європейських країнах та країнах СНД [17, 22, 23, 25, 53, 56, 83].

Глід - чагарник або деревце, часто з колючками, з черговим перистолопатовим або роздільним листям і невеликим двостатевим білим (є види і з червоними) п'ятипелюстковими квітами, зібраними в щитковидне суцвіття. В Україні зростає близько 30 видів цієї рослини, фармакопейними серед них є *Crataegus sanguinea* Pall., *C. laevigata* (Poir.) DC. (синоніми: *C. oxyacanthoides* Thuill.; *C. Oxyacantha* auct.), *C. korolkowii* L. Henry (синоніми *C. Altaica* (Loud.) Lange p.p., *C. rusanovii* Cinovskis, *C. wattiana* auct. p.p.), *C. chlorocarpa* Lenne & C. Koch (синоніми *C. altaica* (Loud.) Lange p.p. incl. typo, *C. sanguinea* Pall. var. *sanguinea* f. *chlorocarpa* (Lenne & C. Koch) Cinovskis, *C. wattiana* auct. p.p.), *C. dahurica* Koehne & Schneid., *C. monogyna* Jacq., *C. alemanniensis* Cinovskis, *C. orientobaltica* Cinovskis, *C. curvisepala* Lindm., *C. × curonica* Cinovskis, *C. × dunensis* Cinovskis, *C. pentagyna* Waldst. & Kit. або їх гібридів [16, 84].

Рослини роду *Crataegus* широко поширені і давно використовуються в народній медицині для лікування різних захворювань, таких як серцево-судинні захворювання, захворювання центральної нервової системи, імунної системи, репродуктивної системи, печінки, нирок. Глід, який фітотерапевти розглядають як «їжу для серця», є однією із найбільш науково підтверджених щодо специфічної користі для серця сировини з усіх інших лікарських рослин. І плоди, і листя з квітками рослини

покращують приплив крові через коронарні артерії до серця, покращують поглинання кисню та підвищують ефективність його закачування. Конкретні показання включають нерегулярність серцебиття серця, легку стенокардію та ранні ознаки серцевої слабкості [56, 79].

Флавоноїди вважаються найважливішими складовими і в першу чергу відповідають за фармакологічну активність цієї рослини [85, 86]. Профіль флавоноїдів і пропорції активних компонентів відрізняються в межах кожного виду. Хоча компоненти ягід і листя з квітками схожі, відносна кількість окремих флавоноїдів і проціанідинів відрізняється. Основними флавоноїдами в плодах є гіперозид і рутин з невеликою кількістю похідних кверцетину, наприклад ізокверцетину [87]. Основними флавоноїдами в листі є вітексин і вітексин-2"-О-рамнозид, які незначно присутні або взагалі відсутні в плодах [64, 86]. Флавоноли, які присутні в плодах, листі та квітучих верхівках, включають аглікон кверцетин і його глікозиди (наприклад, гіперозид, рутин, ізокверцитрин, кверцитрин і кемпферол та його глікозиди (наприклад, 8-метоксікемпферол-3-оглюкозид, 8-метоксікемпферол-3-О-неогесперидозид, кемпферол-3-О-неогесперидозид) [86-88]. Серед флавонів визначають наявність у листі глікозидів апігеніну та лютеоліну (наприклад, вітексин (апигенін 8-С-глюкозид), ізовітексин (апигенін 6-С-глюкозид), вітексин-2"-О-рамнозид, ацетилвітексин-2"-О-рамнозид, орієнтин (лютеолін-8-С-глюкозид), лютеолін-7-О-глюкозид, лютеолін-3'7'-диглюкозид) [86, 89, 90].

Проціанідини (похідні (+)-катехіну і (-)-епікатехіну, до 2,4 %) – ще одна із основних складових рослини. Димерний проціанідин В2 і тримерний проціанідин С1 є основними складовими як ягід, так і листя з квітками. Також присутні тетрамери (наприклад, D1) і олігомери, які переважно складаються з (-)-епікатехінових одиниць [86, 91, 92].

В листях так квітках глоду містяться також тритерпенові кислоти в кількості до 0,6 %, такі як урсолова кислота, кратеголова кислота, олеанолова, а також фенольні

кислоти, такі як кофейна кислота, хлорогенова кислота, корична кислота, протокатехінова кислота) [57, 64, 87, 88].

Серед інших складових зазначають про наявність амінів (наприклад, фенілетиламін, о-метоксифенетиламіни, тирамін), які містяться в основному в квітках, стерини (наприклад, бета-ситостерин); мінерали в плодах (наприклад, кальцій, кобальт, хром, залізо, магній, калій, селен, цинк); вітаміни (наприклад, аскорбінова кислота, бета-каротин) [56, 64, 87, 88, 90].

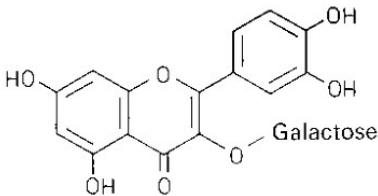
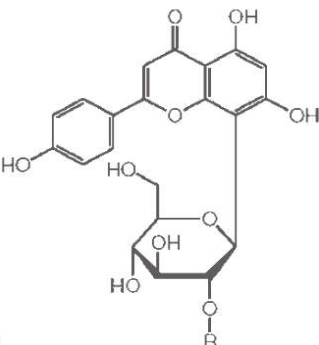
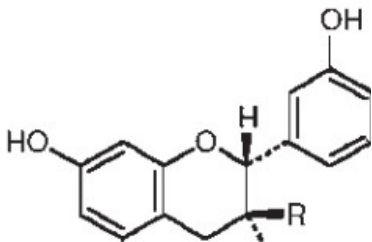
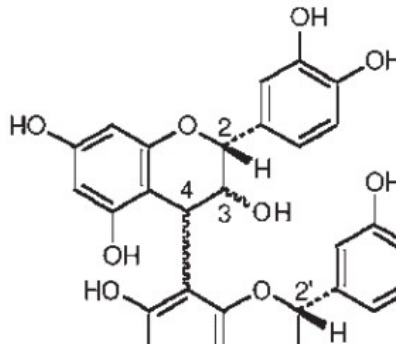
В табл.1.5 наведено структурні формули деяких із основних БАР квіток та листя глоду, відповідних за фармакологічну активність їх препаратів.

Сучасне та традиційне використання глоду листя та квіток, пов'язано з їх кардіотонічною, коронарною та периферичною судинорозширювальною дією, гіпотензивною, діуретичною та антиритмічною дією для лікування таких станів, як стенокардія, артеросклероз, гіпертонія, серцева недостатність та пов'язані з ними серцево-судинні розлади. На основі результатів мета-аналізу рандомізованих досліджень лікування хронічної серцевої недостатності дійшли висновку, що *Crataegus spp.* можна рекомендувати як додаткову терапію для покращення фізичної працездатності та полегшення симптомів серцевої недостатності у пацієнтів з хронічною серцевою недостатністю [93, 94]. Дослідження окремих компонентів показали, що терапевтичні переваги *Crataegus* отримують лише тоді, коли використовується цілий рослинний препарат, а не окремі його компоненти [86].

Фармакологічно активними речовинами сировини листя та квітки глоду, в першу чергу, вважаються проціанідини і флавоноїди. Вивчено вплив основних флавоноїдів глоду на коронарний потік, серцебиття, тиск у лівому шлуночку та швидкість скорочення та релаксації досліджували на серцях морських свинок [95]. У дослідженні зафіксовано збільшення коронарного потоку на 186% для лютеолін-7-глюкозиду; 66% для гіперозиду і 66% для рутина. Швидкість коронарної релаксації зростала на 104% у групі якій вводили лютеолін-7-глюкозид, на 62% - гіперозид та на 73% - рутин.

Таблиця 1.5

Деякі основні БАР глуду листя та квіток

Клас	Речовина	Структурна формула
Флавоноїди	Гіперозид	
	Вітексин R=H	
Проціанідини	R R' Катехін ОН Н Епі-катехін Н ОН	
	Проціанідин 2 2' 3 3' 4 B₁ α-(R) α-(R) α-(R) β-(S) β-(R) B₂ α-(R) α-(R) α-(R) α-(R) β-(R) B₃ α-(R) α-(R) β-(S) β-(S) α-(S) B₄ α-(R) α-(R) β-(S) α-(R) α-(S)	

Крім того, глікозидам лютеоліну та апігеніну, які входять до складу сировини, крім інших дій приписують протиалергічну дію [96]. Терпенові кислоти сировини (олеанолова кислота, урсолова кислота, кратеголова кислота) сприятливо впливають на коронарний кровообіг [23, 85].

В іншому дослідженні задокументована серцево-судинна активність для глоду завдяки проціанідинам сировини [97]. Сухий етанольний (45%) екстракт листя та квіток глоду, стандартизований за вмістом олігомерних проціанідинів (18,75%), у дозі 100 мг/кг перорально протягом семи днів значно покращували серцеву функцію та зменшували розмір інфаркту у щурячої моделі тривалої ішемії та реперфузії порівняно з контролем ($p < 0,05$).

Був виявлений прямий зв'язок між концентрацією проціанідинів в екстрактах квіток, листя і плодів глоду та бета-адреноцепторною блокуючою активністю при вивченні *in vivo* у собак та *in vitro* на серцях жаб [98]. Негативні хронотропні й позитивні інотропні дії спостерігалися *in vitro* з використанням серця морських свинок, які приписувались фракціям флавоноїдів і проантоціанідинів глоду [99].

1.3 Підходи до стандартизації череди трироздільної трави, нагідок квіток, глоду листя та квіток.

Череди трава. Аналіз нормативної документації ч. трироздільної показав, що трава введена до ДФ ХІ та ДФ РБ [100, 101]. В світових Фармакопеях даний вид ЛРС не описаний.

До введення монографії на ЛРС в ДФУ, якість вітчизняної сировини регламентується вимогами ДФ ХІ [102], у разі череди - статтю «Трава череди». Дана стаття включає наступні показники якості: ідентифікація (зовнішні ознаки, мікроскопія, якісна реакція на цукри, ідентифікація флавоноїдів методом паперової хроматографії), числові показники (сторонні домішки, волога, зола і тощо.) та кількісний вміст полісахаридів гравіметричним методом (не менш 3,5 %).

Контроль домішки ч. пониклої, яка є близьким видом ч. трироздільної і може бути домішкою/фальсифікатом ЛРС, в даній статті проводиться методом паперової хроматографії. Згідно з методикою на хроматограмі досліджуваного розчину не допускається присутність темно-коричневої плями в УФ-світлі за довжини хвилі 360

нм з R_f близько 0,75 (домішка череди пониклої). Наявність зони домішки визначається тільки за значенням R_f без використання речовин порівняння, що не дозволяє достовірно і відтворювано визначати положення регламентованої зони. Також недоліком цієї методики є тривалий час відтворення (понад 16 годин).

У монографії ДФ РБ також описана методика ідентифікації череди трави методом ТШХ, де в якості речовини - порівняння використовуються лютеолін-7-глюкозид, прояв хроматограми проводять в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм після обприскування розчином 10 г/л дифенілборної кислоти аміноетилового ефіру в метанолі. У даній монографії контролюється домішка ч. пониклої - не допускається додаткової жовтої плями, розташованої у верхній третині хроматограми вище зони лютеолін-7-глюкозиду. Необхідно відзначити, що ч. листяна в даній монографії розглядається не як домішка череди трави, а як ЛРС (поряд з ч. трироздільною).

З огляду на відсутність сучасної національної нормативної документації на даний вид ЛРС, а також недосконалість методик, наведених в діючих на території України нормативних документах, а саме брак специфічності, актуальною була розробка нових, сучасних підходів до стандартизації сировини череди трави, які враховують досвід ДФУ по використанню уніфікованих методик контролю якості ЛРС [103].

Нагідок квітки. Стандартизація сировини нагідок квітки у ведучих Фармакопеях (Європейській, Чеській, Німецькій) [104-106] так само як і в ДФУ [84] проводиться за кількісним вмістом суми флавоноїдів в перерахунку на гіперозид з регламентацією – не менше 0,4%. Ідентифікація сировини проводиться за хроматографічним профілем флавоноїдних сполук методом ТШХ. В ДФУ додатково проводять ідентифікацію сировини за наявністю характерних зон календулозидів, яку також проводять методом ТШХ.

Стандартизація препаратів, виготовлених на основі даного виду сировини, залежить від того, які саме діючі речовини виділяються при отриманні того або іншого препарату. Так наприклад «Карофілен», який містить суму каротиноїдів квіток календули, стандартизований за кількісним вмістом суми каротиноїдів, препарат, який

є сумою водорозчинних полісахаридів квіток календули, стандартизують за вмістом моно- і полісахаридів, а флавоноїдний препарат квіток календули “Калефлон” стандартизований за кількісним вмістом суми флавоноїдів [107]. Стандартизація настойки календули більшості фармацевтичних підприємств проводиться за флавоноїдами (ідентифікація методом ТШХ і кількісне визначення методом СФ). В Україні на ряду фармфабрик настойку календули додатково стандартизують, ідентифікуючи календулозиди препарату методом ТШХ [107].

Глоду листя та квітки: Стандартизація сировини глоду листя та квітки у ведучих Фармакопеях (Європейській, Німецькій) [108, 109], так само як і в ДФУ [84] проводиться за кількісним вмістом суми флавоноїдів в перерахунку на гіперозид з регламентацією – не менше 1.0%. Ідентифікація сировини в Фармакопеях проводиться за хроматографічним профілем флавоноїдних сполук методом ТШХ.

Що стосується стандартизації препаратів на основі даного виду сировини з’ясовано наступне:

- для стандартизації настоїв і відварів з глоду описані СФ-методики кількісного визначення флавоноїдів, засновані на реакції комплексоутворення з $AlCl_3$;
- для стандартизації таблеток з плодів глоду розроблені характеристики достовірності (опис діагностичних ознак при мікроскопічному дослідженні) і показники якості (метод ТШХ для ідентифікації флавоноїдів, тритерпенових сполук, каротиноїдів). - вміст гіперозиду в таблетках пропонується визначати методом ВЕРХ, жирні кислоти – методом ГХ;
- для визначення кількісного вмісту суми тритерпенових сполук в квітках, плодах і паростках 6 видів глоду запропонований гравіметричний метод;
- для стандартизації екстракту глоду густого запропонована СФ-методика визначення суми флавоноїдів з використанням рутину як стандартного зразку [107].

Таким чином, спектр підходів до стандартизації як сировини глоду, так і препаратів, приготованих на її основі, достатньо широкий. Переважаючою у

вітчизняній нормативній документації є стандартизація за кількісним вмістом суми флавоноїдів в перерахунку на гіперозид.

1.4 Фітохімічний і фітофармакологічний дизайн сумарних рослинних препаратів

При розробці рослинних препаратів передбачуваний ефект впливу на організм тієї чи іншої ЛРС деякі автори пов'язують з наявністю в її складі БАР, тобто використовують так званий, дизайн фітопрепарату, а саме фітофармакологічний дизайн препарату (ФФД) і фітохімічний дизайн препарату (ФХД) [110,111]. ФФД і ФХД дозволяють більш наочно і впорядковано співвіднести структури діючих сполук з різними видами їх активності. Умовно ці терміни можна розшифрувати як: ФФД – проекція наукових знань про фармакологічні властивості, а також використання в народній медицині ЛРС на передбачуваний препарат; ФХД – проекція наукових знань про хімічний склад ЛРС на передбачуваний ЛРП.

Однак оцінка передбачуваної дії сумарного ЛРП не обмежується базовими літературними і емпіричними даними щодо кількісного вмісту певних груп БАР в цих ЛРС і такими ж даними про їх фармакологічну дію. Маючи ці, здавалося б, незрівнянні величини (кількісно оцінюється тільки хімічний склад), складно говорити про передбачувану ефективність майбутнього ЛРП без будь-яких експериментальних фармакологічних досліджень. Останні, на сучасному етапі, є досить витратними як за часом, так і за вартістю навіть для однокомпонентного ЛРП. Тому для отримання попередніх даних і використовуються літературно-логічні методи і/або системно-порівняльний аналіз інформації, які не завжди дозволяють впевнено прогнозувати фармакологічний ефект. Це може бути пов'язано з тим, що:

а) залежність фармакологічних ефектів БАР з рослин, може бути пряма (серцеві глікозиди конвалії – кардіотонічна дія та ін), тобто від вмісту в ЛРС конкретних БАР з доведеним видом фармакологічної дії;

в) ефект визначається сукупністю БАР (наприклад, есцин, ескулін гіркокаштана кінського плодів – при лікуванні варикозного розширення вен);

с) в більшості випадків – відомий фармакологічний ефект, але не доведено які саме БАР і / або їх сума його викликають (наприклад, флавоноїди, іридоїди, сапоніни та ін. собачої кропиви трави – седативна, спазмолітична, гіпотензивна дія) ;

д) певний ефект базується на різних БАР однієї і тієї ж ЛРС (наприклад, гіперіцин зі звіробою трави – заспокійливий ефект, сума фенольних сполук (флавоноїди, гідроксикоричні кислоти тощо) – капіляророзміцнювальний, протизапальний, сечогінний та ін) [112].

Крім того, у випадку з комбінованим (сумарним) ЛРП ця неможливість впевненого прогнозу пов'язана, по суті, з призначенням одночасно декількох ЛРС, які самі по собі є ЛРП. Тобто ми стикаємося з таким явищем, як поліпрагмазія (одночасне призначення безлічі лікарських засобів) [113].

Деякими авторами застосовуються, досить вдало, статистичні методи обробки літературно-логічної інформації (системно-порівняльного аналізу інформації). Наприклад, метод лінійної кореляції із застосуванням експертної кількісної оцінки (ЕКО) фармакологічної активності (ФА) рослинних компонентів, запропонованої А.Я. Кобзар [114].

1.5 Фармацевтична розробка – основа створення якісних ефективних та безпечних лікарських препаратів

Основним етапом створення ЛРЗ є фармацевтична розробка (ФР), де закладаються не лише основи якості, але й ефективності та безпечності застосування. Об'єктами досліджень з ФР є всі компоненти ЛРЗ – активні фармацевтичні інгредієнти (АФІ) та допоміжні речовини, лікарська форма, технологічний процес та пакувальні

матеріали, мікробіологічні властивості ЛРЗ та сумісність компонентів. Згідно Керівництву СТ-Н МОЗУ 42-3.0:2011 фармацевтична розробка – це «комплексні експериментальні дослідження, спрямовані на наукове обґрунтування складу лікарського препарату у лікарській формі, виробничого процесу та його контролю, вибору пакувальних матеріалів, а також вивчення фізико-хімічних, біологічних та мікробіологічних властивостей [115, 116]. Здійснювати ці дослідження необхідно протягом життєвого циклу продукції з метою створення якісного препарату, його реєстрації та забезпечення якості під час серійного виробництва». Мета фармацевтичної розробки – створити препарат відповідної якості та постійно випускати продукцію із заданими функціональними характеристиками. Важливо також розуміти, що якість не може бути повністю перевірена у препараті; якість має бути закладена при його розробці (вбудована якість).

Фармацевтична розробка передбачає створення оптимальної лікарської форми та її технології. Досягти цих вимог можна тільки за рахунок проведення великої кількості досліджень, які дозволять здійснити науково-обґрунтоване вивчення якісних і кількісних факторів.

Якщо щодо розробки ЛРЗ з хімічної субстанції все, описане у Керівництві, досить ясно, то у разі застосування ЛРС можуть виникнути певні труднощі. Так, ніколи не можливо заготувати або закупити ЛРС (початкову субстанцію для рослинних препаратів) з тим самим змістом чи маркерів чи діючих речовин. Однак можливо контролювати процес їх вилучення та переробки. При розробці алгоритму технології рідких, густих та сухих екстрактів спочатку вивчаються фармако-технологічні параметри ЛРС, наступним етапом є вибір оптимальних параметрів здійснення технологічного процесу після чого розробляється аналітичний контроль технологічного процесу одержання ЛЗ [117].

Враховуючи все це етапи, фармацевтична розробка у разі передбачуваного комбінованого ЛРЗ нами представлені такими:

1) Дослідження якості вихідної ЛРС (вхідний контроль).

Якість вихідного ЛРС підтверджується за допомогою фармакопейних методів, фармакогностичних, хімічних, технологічних, які займають важливу роль під час проведення фармацевтичної розробки.

2) Дизайн передбачуваного ЛРЗ

Передбачуваний склад ЛРЗ буде представлений сумішшю ЛРС (див. вище), вибраного на підставі даних літератури про ефективність застосування в поєднанні протиалергічних, протизапальних, імунокоригувальних властивостей при фармакотерапії алергічних захворювань, підтверджених скринінговими фармакологічними дослідженнями.

3) Опрацювання технології отримання передбачуваного комбінованого ЛРЗ (визначення критичних параметрів тощо).

Планується опрацювання технології отримання ЛРЗ антиалергічної дії у вигляді подрібненого збору ЛРС для пакування в коробку та фільтр-пакет, а також екстракту сухого із заданими критеріями стандартизації для виготовлення різних лікарських форм (таблетки, капсули та ін).

4) Розробка методик контролю якості проміжних продуктів та ЛРЗ, які будуть уніфікованими для будь-якої контрольної точки технологічного процесу (аналітичне забезпечення процесу виробництва).

При розробці методик використовуються загальні вимоги ДФУ з деякими підходами, специфічними для рослинних препаратів. Для забезпечення відтворюваного і передбачуваного терапевтичного ефекту, оптимального рівня постійного складу і фармако-технологічних характеристик рослинного ЛРЗ розробляється система критеріїв якості, стандартизації. Критерії меж вмісту БАР у ЛРЗ розраховують з урахуванням вмісту цих сполук у вихідній субстанції чи у екстрактах як АФІ, їх внеску у склад готового ЛРЗ і особливостей технології виробництва [118, 119].

5) Вивчення фармакологічної активності одержаних ЛРЗ.

Отже, у літературному огляді описано проблеми алергічних захворювань, показана актуальність розробки для застосування при лікуванні алергій препаратів на основі ЛРС; представлена ботанічна, хімічна, фармакологічна оцінка сировини череди трава, нагідок квітки, глоду листя та квітки, а також їх сучасна стандартизація; висвітлені питання фармацевтичної розробки щодо лікарських рослинних препаратів і можливі підходи до їх реалізації.

Результати аналізу літературних джерел за темою дисертації наведено в таких публікаціях:

1. Котов С.А., Сербін А.Г., Котова Е.Е. Актуальність розробки сучасних методів стандартизації причепи трави. *«Фармація XXI століття: тенденція та перспективи»*: матеріали VIII національного з'їзду фармацевтів України. Харків: НФаУ, 2016. Т.1. С. 100-101.
2. Kotov S. Precondition to the development of the herbal medicinal product with desensitizing activity. *Український часопис*. 2019. Т. 2, № 6 (134) : Science and Modern Pharmaceutical Manufacturing : materials of VII Scientific and Practical Conference of Farnak's School of Young Scientists with International involvement. Kyiv, November 21 st, 2019. P. 12–13.
26. Kotova E. E., Kotov S. A., Kotov A. G. Study of chromatographic fingerprint of flavonoid compounds of the bur-marigold herb. *Scientific Study & Research – Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*. 2021. Vol. XXII, № 1. P. 65–79.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ, МЕТОДИ ТА МЕТОДИКИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Об'єкти дослідження

Об'єктами досліджень були зразки череди трироздільної (ч. трироздільної) трави, череди листяної (ч.листяної) трави, череди пониклої (ч. пониклої) трави, нагідок квіток та глоду листя та квіток. Зразки сировини було отримано від виробників/постачальників ЛРС та заготовлено на території 2 областей України (табл. 2.1). Згідно із загальноприйнятими рекомендаціями щодо збирання лікарської рослинної сировини, череди траву заготовляли в період бутонізації та початку цвітіння, глоду листя та квітки заготовляли в період масового цвітіння (травень-червень). Заготовлені зразки сушили повітряно-тіньовим методом за температури не вище 35 °C [120]. Серії ЛРС зареєстровано в ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів».

Таблиця 2.1

Зразки лікарської рослинної сировини

№з/п	RS зразка	Вид	Виробник/Місце заготівлі	Номер серії/ Дата заготівлі
1	2	3	4	5
Зразки череди трави				
1	347*	ч. трироздільна	Аптека лікарських рослин/Полтавська обл	320814
2	348	ч. трироздільна	ПрАТ ФФ Віола	040414
3	390	ч. трироздільна	ЕЙМ/ ФЛП «Крук Е.П	061114
4	413	ч. трироздільна	ЕЙМ/ ФЛП «Крук Е.П.	300615
5	414	ч. трироздільна	ООО «Камамила»	300615
6	415	ч. трироздільна	ФЛП «Крук Е.П.	300615
7	699	ч. трироздільна	Сумська обл., Охтирський район	08.2016
8	700	ч.листяна	Сумська обл., Охтирський район	08.2016
9	707	ч. листяна	НФаУ, Харків	08.2016

Продовження табл. 2.1

1	2	3	4	5
10	708	ч. трироздільна	ФЛП «Крук Е.П.	041016
11	717	ч. поникла	Київський ботанічний сад	141116
12	1053	ч. трироздільна	Харківська обл., Мерефа	09.2019
13	1081	ч. трироздільна	ПрАТ «Ліктрави», Житомир	091019
14	1090	ч. трироздільна	ЕЙМ	231019
15	1093	ч. трироздільна	ПрАТ «Ліктрави», Житомир	281019
Зразки нагідок квіток				
16	1023		Харківська обл., м.Чугуїв	240619
17	1080		ПрАТ «Ліктрави», Житомир	091019
18	1115		Полтавська обл., м. Лубни	201219
Зразки глоду листя та квіток				
19	907		Харківська обл., Харківський район	05.2018
20	1029		Харківська обл., Харківський район	05.2019
21	1116		Харківська обл., Зміївський район, м.Ізюм	06.2019

Примітка. * – серії, зареєстровані в ДП «Фармакопейний центр»

Об'єктами досліджень були також напрацьовані відповідно до розробленої технології, описаної в Розділі 4, 3 серії сухого комбінованого рослинного екстракту (с.310819, с.221019, с.101020), а також 3 серії капсул, одержаних із капсульної маси відповідно до Розділу 4.2. (с.110520, с..201219, с.310121).

2.2 Матеріали, методи та обладнання досліджень

2.2.1 Фізичні, хімічні та фізико-хімічні методи аналізу

Фізичними, хімічними та фізико-хімічними методами аналізу, які використовували при дослідженні у роботі, були визначення втрати в масі під час висушування, загальної золи, гравіметричний аналіз, ТШХ, ВЕТШХ з подальшим

використанням денситометрії, ВЕРХ, спектрофотометрія в ультрафіолетовому та видимому діапазонах.

Втрата в масі під час висушування. Визначення цього показника якості проводили відповідно до вимог ДФУ 2.2.32 «Втрата в масі під час висушування» у всіх зразках сировини [121].

Загальна зола. Визначення проводили відповідно до вимог ДФУ, 1 вид., 2.4.16. Наважку близько 1,0 г подрібненої на порошок сировини поміщають у заздалегідь прожарений і зважений кварцовий тигель. Висушують при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 1 год і потім спалюють до постійної маси у муфельній печі при температурі (600 + 25) °С.

Гравіметричні методи. Кількісний вміст полісахаридів визначали гравіметричним методом. За основу взята фармакопейна методика, яка описана в декількох національних монографіях ДФУ («Алтея корені», «Подорожника великого листя», «Ламінарії слані») [84].

Вміст суми водорозчинних полісахаридів, у відсотках, обчислювали за формулою (2.1):

$$\frac{(m_2 - m_1) \times 1000}{m} \quad (2.1)$$

де m – маса наважки випробовуваної сировини, у грамах;

m_1 – маса фільтра, у грамах;

m_2 – маса фільтра із залишком, у грамах.

Дослідження якісного і кількісного вмісту БАР сировини хроматографічними і спектрофотометричними методами проводили на базі ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів» з консультативною допомогою начальника відділу ДФУ, д. фарм. н. А. Г. Котова та завідувача сектора «Експериментальна підтримка розробки монографій на ЛРС», к. фарм. н. Е. Е. Котової.

Метод тонкошарової хроматографії (ТШХ) для ідентифікації ЛРС і визначення сторонніх домішок.

Ідентифікацію сировини череди трави, нагідок квіток і глоду листя та квіток на наявність фенольних сполук, зокрема флавоноїдів та гідроксикоричних кислот, а також на наявність календулозидів в сировині нагідок квітки проводили з використанням ТШХ. Для хроматографування використовували ТШХ-пластинки Silicagel 60 F₂₅₄ (Merck, Німеччина) з товщиною шару від 5 до 40 мкм із скляною та алюмінієвою основами. Використовувані пластинки відповідали вимогам ДФУ щодо тесту «Перевірка хроматографічної розділювальної здатності ТШХ-пластинок».

Хроматографічні системи готували з використанням розчинників кваліфікації «ч.д.а.», «х.ч.» або «для ВЕРХ». Використовували такі системи розчинників: для череди трави та квіток нагідок – *кислота мурашина безводна Р – вода Р – етилацетат Р* (10:10:80), для глоду листя та квіток – *кислота мурашина безводна Р – вода Р – метилетилкетон Р – етилацетат Р* (10:10:30:50), у разі ідентифікації календулозидів – *хлороформ Р - оцтова кислота льодяна Р - метанол Р - вода Р* (35:16:6:4).

Для приготування розчинів порівняння використовували наступні ФСЗ ДФУ: гіперозид, рутин, кофейна кислота, лютеолін, лютеолін-7-глікозид, хлорогенова кислота, у разі ідентифікації календулозидів – ФСЗ ДФУ календулозидів.

Високоєфективна тонкошарова хроматографія. Для хроматографування з подальшим денситометричним обчисленням кількісного вмісту олеанолової кислоти в сухих екстрактах обрано хроматографічну пластину HPTLC plates silica gel 60 F₂₅₄ (Merck), 20 x 10 cm.

Випробовувані розчини. Точні наважки 0,3 г сухих екстрактів гідролізували 2М метанольним розчином хлористоводневою кислоти (20 мл) зі зворотним холодильником на водяній бані за температури 100 °С протягом 2 годин. Екстракт фільтрували через фільтрувальний папір, а залишок, що залишився після екстракції, промивали метанолом. Об'єднані фільтрати переносили в мірну колбу місткістю 25 мл і доводили об'єм метанолом до позначки.

Розчини порівняння. Метанольні розчини 0,06 мг/мл, 0,12 мг/мл, 0,18 мг/мл ФСЗ ДФУ олеанолової кислоти.

Для напіваавтоматичного нанесення зразків на хроматографічну пластину використовували аплікатор Linomat 5 (Camag) зі швидкістю нанесення 150 нл/с., об'єми – 20 мкл розчинів зразків (у трьох повторях на ТШХ пластині) та 10 мкл – розчинів порівняння. Хроматографування проводили у скляній подвійній камері (Camag), у рухомій фазі *толуол–етилацетат–мурашина кислота* (7:3:0,2, об/об/об) на відстань 8,0 см при 25 °С. Після прояву пластини висушували на повітрі при кімнатній температурі. Після-хроматографічну дериватизацію проводили методом занурення у розчин анісового альдегіду Р із використанням Immersion Device (Camag). Сканування виконували на TLC Scanner 3 (Camag). Отримані результати обчислювали програмним забезпеченням «winCATS».

Метод абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовому (УФ) і видимому діапазонах.

Кількісне визначення флавоноїдів та поліфенолів в ЛРС проводили методом УФ – спектроскопії на спектрофотометрі HP 8453 UV–VIS фірми «Hewlett Packard» (США) відповідно до вимог ДФУ, 1 вид., 2.2.25. При визначенні загального вмісту флавоноїдів як у зразках рослинної сировини, так і в екстрактах, отриманих із неї, використовували методику, описану в національній монографії ДФУ 2.5 «Череди трава» [121].

Вміст суми флавоноїдів, у перерахунку на лютеолін-7-глюкозид, у відсотках, обчислювали за формулою (2.2):

$$\frac{A_1 \times m_2 \times 20 \times 1.63 \times p}{A_2 \times m_1} \quad (2.2)$$

де A_1 – оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 410 нм;

A_2 – оптична густина розчину порівняння за довжини хвилі 410 нм;

m_1 – маса наважки сировини, використаної для приготування випробовуваного розчину, у грамах;

m_2 – маса наважки ФСЗ ДФУ лютеоліну, використаного для приготування розчину порівняння, у грамах;

1.63 – коефіцієнт перерахунку лютеоліну на лютеолін-7-глюкозид;

p – вміст лютеоліну у ФСЗ ДФУ лютеоліну, у відсотках.

При визначенні загального вмісту сполук поліфенольної природи як у зразках рослинної сировини, так і в екстрактах, отриманих із неї, використовували методику ДФУ, описану в ст. 2.8.14. «Визначення танінів у лікарській рослинній сировині» [122]. Усі операції з екстрагування та розведення здійснювали у захищеному від світла місці.

Спектрофотометричне визначення антиоксидантної активності як вихідної сировини, так і в отриманих із неї екстрактах проводили 2-ма методами.

Метод ABTS. Випробовуваний розчин. 0,5 г (точна наважка) подрібненої на порошок (355) сировини поміщали в мірну колбу місткістю 25,0 мл, додавали 20 мл метанолу і витримували на ультразвуковій бані протягом 15 хв, після чого доводили до позначки тим самим розчинником, перемішували і фільтрували крізь паперовий фільтр «синя стрічка». До 100 мкл досліджуваного розчину додавали 4,9 мл робочого розчину ABTS і через 30 хв вимірювали оптичну густину за довжини хвилі 734 нм. Паралельно готували розчин стандарту Тролоксу. Визначення проводили у перерахунку на Trolox еквівалент та суху сировину.

Неокупроїновий метод. До наважки сухих екстрактів додавали метанол і нагрівали суміш на водяній бані зі зворотним холодильником. Одержані витяги фільтрували, відбирали відповідні аліквоти і змішували з 1 мл розчину хлориду міді, 1 мл буферного розчину амонію ацетату, 1 мл розчину неокупроїну, 0,9 мл води і залишали протягом 30 хв у темному місці. Паралельно готували розчин стандарту Тролоксу. Вимірювання проводили за довжини хвилі 450 нм. Значення ТЕАС розраховували в ммол ТЕ/г (the mmol “trolox equivalent” (TE) антиоксидантної активності в грамі екстракту), а також в г/мл отриманих витягів в перерахунку на стандарт Тролоксу.

Метод високоефективної рідинної хроматографії. При визначенні хроматографічного профілю флавоноїдних сполук і гідроксикоричних кислот у різних зразках череди трави, а також у зразках сухих екстрактів череди, нагідок, глоду і комбінованого екстракту використовували хроматограф Waters Alliance з модулем розділення Waters 2690 і детектором 996 PDA (Waters, США). Розділення здійснювали

на колонці Kromasil 100-5-C18 4,6 × 250 мм (Nouryon Bohus, Швеція) з попередньою колонкою (2 мм), що містить той самий адсорбент. Температуру колонки підтримували постійною на рівні 30°C, і рухому фазу подавали зі швидкістю потоку 1,0 мл/хв, а довжину хвилі детектування встановлювали на 360 нм. УФ-спектри вимірювали в діапазоні довжин хвиль від 200 до 800 нм. Об'єм зразка становив 10 мкл, і кожен зразок аналізували в трьох повторах. Компоненти були ідентифіковані шляхом порівняння їхнього часу утримування та УФ-спектрів із аналогічними стандартами за ідентичних умов аналізу. Бінарна система розчинників рухомої фази складалася з розчинника А (0,1% трифтороцтової кислоти у воді) і розчинника В (ацетонітрилу). Програму лінійного градієнта застосовували наступним чином: 0–8 хв, 5–15% В; 8–30 хв, 15–20% В; 30–48 хв, 20–40% В; 48–58 хв, 40–50% В; 58–65 хв, 50%; 65–66 хв, 50–95% В.

Випробовувані розчини. 5 г здрібненої на порошок сировини поміщали у круглодонну колбу місткістю 200 мл, додавали 100 мл етанолу (70 %, об/об), нагрівали на водяній бані зі зворотним холодильником 60 хв, охолоджували і фільтрували у круглодонну колбу. Отриманий фільтрат упарювали до об'єму 50 мл, відстоювали добу в холодильнику, фільтрували в ділильну воронку і екстрагували спочатку 50 мл бутанолу, потім 40 мл бутанолу. Екстракти бутанолу випарювали до сухого залишку на водяній бані. Залишок порціями метанолу кількісно переносили в мірну колбу місткістю 25 мл і тим же розчинником доводили до позначки. 5,0 мл отриманого розчину переносили в мірну колбу місткістю 20,0 мл і доводили до позначки метанолом.

У разі аналізу сухих екстрактів, до 0,25 г сухих екстрактів додавали 20 мл метанолу, обробляли ультразвуком при 50 °C протягом 20 хв. Екстракт фільтрували через фільтрувальний папір, а залишок, що залишився після екстракції, промивали метанолом. Об'єднані фільтрати переносили в мірну колбу на 25 мл і доводили об'єм до позначки метанолом.

Розчини стандартів. Розчини порівняння готували шляхом розчинення 1 мг еталонних стандартів у 10 мл метанолу. Використані сполуки хлорогенова кислота

(100 %), лютеолін-7-глюкозид (99 %), лютеолін (98 %), кверцетин (100 %), кофейна кислота (100 %), гіперозид (100 %), рутин (100 %), вітексин (95 %), олеанолова кислота (100 %) були ФСЗ ДФУ. Сполуки порівняння (ізорамнетин-3-О-(2'',6''-ди-рамнозил)-глюкозид, ізорамнетин-3-О-рутинозид)) були отримані раніше з *C. Officinalis* [58].

2.2.2 Фармакогностичні методи аналізу

Фармакогностичні дослідження проводилися згідно з методами аналізу ДФУ 2.8 «Методи фармакогнозії» [122]. Відбір проб і пробопідготовку вихідної сировини проводили відповідно до вимог ДФУ монографії 2.8.20 «Лікарська рослинна сировина: відбір проб і пробопідготовка». Визначення вмісту сторонніх домішок проводили відповідно до вимог ДФУ 2.8.2 «Сторонні домішки у лікарській рослинній сировині» [122]. Макро- і мікроскопічне дослідження сировини для аналізу проводили згідно з методикою ДФУ 2.8.23 «Мікроскопічне дослідження лікарської рослинної сировини». Досліджували подрібнену на порошок та просіяну крізь сито 355 сировину згідно з вимогами ДФУ монографії 2.9.12 «Ситовий аналіз», яку просвітлювали за допомогою хлоральгідрату Р [122]. Макроскопічний аналіз проводили оглядом складових компонентів аналітичної проби візуально і за допомогою бінокулярного мікроскопа БМ-51-2. При проведенні мікроскопічного використовували світловий мікроскоп МЕОРТА «PRAHA», мікроскопічні ознаки фіксували за допомогою цифрової фотокамери MIKROmed MDC-500-5.0 Mpix.

2.2.3 Фармакологічні методи аналізу

Дослідження фармакологічної дії розробленого комбінованого сухого рослинного екстракту на моделі анафілактичного шоку, на моделі активної кожної анафілаксії, в тесті непрямой дегрануляції тучних клітин проводили на базі кафедри нормальної та патологічної фізіології Національного фармацевтичного університету за

консультативною допомогою д. мед. н., проф. Кононенко Н.М., канд. мед. н. Чикіткіної В.В.

Експерименти проводили на 48 мурчаках обох статей масою 340-560 г та 24 білих нелінійних щурах-самцях масою 200-250 г вирощених у розпліднику віварію НФаУ. В якості препаратів порівняння використовували: 1 – блокатор гістамінових рецепторів H1 – Діазолін у таблетках (діюча речовина – мебгідролін) у дозі 12 мг/кг (ВАТ «ФАРМАК»); 2 – Дезлоратадин, один із схвалених у Європі антигістамінних препаратів 3-го покоління (виробництва ПрАТ «Технолог», Україна) у дозі 0,5 мг/кг; 3 – в якості еталонного фітопрепарату обрано Тесалін (виробництва Max Zeller Zyone AG, Швейцарія) у дозі 1 мг/кг, який містить екстракт з листя кремени гібридної (*Petasites hybridus* L.). Дози референтних препаратів розраховували за методикою [123] на основі їх добових доз для дорослої людини [124].

Модель анафілактичного шоку у мурчаків. Відтворення анафілактичного шоку здійснювали на мурчаках, яких сенсibilізували 0,1 нормальною конячою сироваткою (НКС). Після інкубаційного періоду на 21-й день від моменту першої сенсibilізуючої ін'єкції всім експериментальним тваринам внутрішньоочеревинно вводили розв'язувальну дозу антигену, яка складала 0,6 мл НКС [125].

Усі експериментальні тварини були розподілені на такі групи: 1 група – інтактний контроль (ІК) – тварини, які отримували ін'єкції фізіологічного розчину за схемою сенсibilізації; 2 група – контрольна патологія (КП) – мурчаки, яких сенсibilізували НКС; 3 група – тварини, які на фоні сенсibilізації НКС отримували комбінований екстракт дозою 30 мг/кг (встановлена як умовнотерапевтична доза за протизапальною активністю), 4 група – тварини, які на фоні сенсibilізації НКС отримували препарат порівняння – таблетки «Діазолін» дозою 12 мг/кг, Дезлоратадин дозою 0.5 мг/кг та Тесалін дозою of 1 мг/кг.

Виразність анафілактичного шоку визначали за Weige W.O. [126] за 4-и бальною шкалою:

0 балів – шок не розвинувся, його ознаки відсутні;

1 бал – шок слабкий (деякий неспокій, прискорене дихання, короточасне почухування мордочки, мимовільне сечовиділення та дефекація);

2 бали – шок помірний (чітко виражені почухування, невеликі судоми, виражені прояви бронхоспазму);

3 бали – шок важкого ступеня (загальні судоми, асфіксія, тварина втрачає здатність утримуватися на лапках, падає на бік, мимовільне сечовиділення та дефекація, спастичний кашель, залишається живою);

4 бали – шок з летальним кінцем.

Антиалергічну активність комбінованого екстракту визначали за його здатністю зменшувати виразність анафілактичного шоку порівняно з групою контрольної патології та виражали у відсотках за формулою (2.3):

$$AA = \frac{A_{SK} - A_{ST}}{A_{SK}} \times 100 \quad (2.3)$$

де: AA – антиалергічна активність, %;

АШ_к – виразність анафілактичного шоку в групі тварин контрольної патології, бали;

АШ_д – виразність анафілактичного шоку в групі дослідних тварин, бали.

Модель активної кожної анафілаксії на мурчаках. Сенсibilізацію мурчаків здійснювали за наступною схемою: тваринам дослідних груп (окрім групи інтактного контролю) вводили підшкірно 0,2 мл 1% розчину яєчного білка трикратно через 2 дні [127]. Комбінований екстракт та препарати порівняння вводили внутрішньошлунково з першого дня сенсibilізації протягом 21-го дня.

Експериментальні тварини були розподілені на такі групи: 1 група – інтактний контроль (ІК) – тварини, які отримували ін'єкції фізіологічного розчину за схемою сенсibilізації; 2 група – контрольна патологія (КП) – мурчаки, яких сенсibilізували яєчним білком; 3 група – тварини, які на фоні сенсibilізації яєчним білком отримували комбінований екстракт дозою 30 мг/кг, 4 група – тварини, які на фоні сенсibilізації яєчним білком отримували таблетки «Діазолін» дозою 12 мг/кг, Дезлоратадин дозою

0.5 мг/кг та Тесалін дозою of 1 мг/кг. На 21-й день після початку сенсibilізації усіх експериментальних тварин наркотизували ефіром.

На вистрижену ділянку шкіри правого боку внутрішньошкірно вводили розв'язувальну дозу 40 мкл розчину яєчного білка, який готували на фізіологічному розчині. Потім мурчакам внутрішньовенно в стегнову вену вводили 0,5 мл 1 % розчину синього Еванса. Через 30 хвилин тварин знеживлювали під ефірним наркозом, відсепаровували шкіру та визначали площу забарвлених плям на внутрішній поверхні шкіри в місці введення розв'язувальної ін'єкції. Виразність кожної алергійної реакції оцінювали за площею зафарбованих плям у місці введення розв'язувальної дози. Крім того, у крові мурчаків вивчали показники, які свідчили про вплив комбінованого екстракту на розвиток сенсibilізації. Для раннього виявлення функціональних зсувів в організмі в період сенсibilізації також досліджували вміст лейкоцитів за стандартною методикою [128]. Оскільки алергічна реакція супроводжується утворенням комплексів «антиген-антитіло», імунологічний статус тварин оцінювали за вмістом циркулюючих імунних комплексів (ЦІК).

Визначення впливу комбінованого екстракту на дегрануляцію опасистих клітин у щурів. Щурів сенсibilізували (окрім тварин групи інтактного контролю) 0,2 мл 1% розчином яєчного білка трикратно через день підшкірними ін'єкціями.

Експериментальні тварини були розподілені аналогічно моделі активної кожної анафілаксії. Досліджувані засоби вводили експериментальним тваринам у профілактичному режимі – з першого дня сенсibilізації внутрішньошлунково протягом 21-го дня. На 21-й день щурів знеживлювали під ефірним наркозом й отримували сироватку крові. Реакцію дегрануляції проводили на опасистих клітинах, які отримували з перитонеального ексудату інтактних щурів. У попередніх експериментах підбирали концентрацію алергену (НКС, який готували на фізіологічному розчині), що викликає не більше 10% неспецифічної дегрануляції. До 0,03 мл суміші опасистих клітин додавали 0,03 мл сироватки дослідної

(сенсibilізованої) або контрольної (інтактної) групи тварин і 0,03 мл розчину алергену. При постановці реакції враховували такі контролі:

1. 0,03 мл суспензії гладких клітин, 0,03 мл досліджуваних сироваток і 0,03 мл фізіологічного розчину;
2. 0,03 мл суспензії гладких клітин і 0,06 мл фізіологічного розчину.

Потім препарати інкубували 15 хвилин при 37 °С та досліджували під світловим мікроскопом «Біолам». У кожній камері підраховували по 100 клітин. Оцінку результатів проводили за відсотком дегранульованих клітин [128].

2.2.4 Технологічні випробування

Дослідження текучості, насипної густини та густини після усадки капсульної маси проводили за методиками ДФУ, 2.9.16, 2.9.34 [122]. Для визначення текучості використовували прилад ERWEKA GT, Німеччина, насипної густини - ERWEKA SVM 202, Німеччина та прилад ВП-12А (Маріупольський завод технічного обладнання).

Розподіл частинок капсульної маси за розмірами визначали в суспензії методом лазерної дифракції (ДФУ 2.0, 2.9.31) [122] за допомогою лазерного дифракційного аналізатора частинок «Shimadzu SALD-2201». Як дисперсійне середовище використовували поліметилсілоксанову рідину низької в'язкості ПМС-5, в якій компоненти маси практично не розчинні. Результати порівнювали із даними, отриманими в аналогічних умовах для зразка «чистої» МКЦ. Для виготовлення випробовуваної суспензії 50 мг капсульної маси поміщали в мірну колбу місткістю 100 мл, додавали 50 мл поліметилсілоксанової рідини ПМС-5 та ретельно перемішували, після чого мірну колбу поміщали на ультразвукову баню та гомогенізували суспензію протягом 1-2 хв. Доводили об'єм вмісту до позначки тією ж рідиною і ретельно перемішували, після чого негайно відбирали пробу для вимірювання (концентрація 0,50 мг/мл). Для встановлення базової оптичної густини використовували поліметилсілоксанову рідину ПМС-5. Мікрофотографії отримували при дослідженні

зразків методом оптичної мікроскопії за допомогою мікроскопа з окуляр-мікрометром (фірма «Krüss MBL-2100», Німеччина).

2.2.5 Статистична обробка результатів

Статистична обробка отриманих результатів проводилася відповідно до вимог ДФУ, 5.3.N.1 «Статистичний аналіз результатів хімічного експериментуN» з використанням програми «SPSS Statistics 26.0». Використовували непараметричний критерій Манна–Уїтні, при порівнянні статистичних показників був прийнятий рівень значущості $p < 0,05$ [122].

При вивченні фітохімічного і фітофармакологічного дизайну розробляемого засобу як статистичний метод обробки літературно-логічної інформації (системно-порівняльного аналізу) був використаний коефіцієнт рангової кореляції Спірмена.

Коефіцієнт кореляції Спірмена обчислювали за формулою (2.4):

$$p = 1 - 6 \frac{\sum d^2}{n^3 - n} \quad (2.4)$$

де d^2 – сума квадратів різниць між рангами;

n – кількість ознак, які брали участь в ранжируванні.

Значимість коефіцієнта рангової кореляції Спірмена обчислювали за формулою (2.5):

$$T_{kp} = t(\alpha, k) \sqrt{\frac{1 - p^2}{n - 2}} \quad (2.5)$$

де n – обсяг вибірки;

p – вибірковий коефіцієнт рангової кореляції Спірмена

$t(\alpha, k)$ – критична точка двосторонньої критичної області, яку знаходять за таблицями критичних точок розподілу Стюдента, за рівнем значущості α і числа ступенів свободи $k = n - 2$.

РОЗДІЛ 3

ВХІДНИЙ КОНТРОЛЬ ЛРС, ЩО ВХОДИТЬ ДО СКЛАДУ РОСЛИННОГО ЗАСОБУ

Першим обов'язковим етапом фармацевтичної розробки препарату є встановлення відповідної якості її складових, у разі рослинного препарату – відповідної якості ЛРС, що використана для його виробництва.

Якість вихідної ЛРС має регламентуватися монографіями ДФУ, а в разі їх відсутності – методами контролю якості, які мають бути розроблені з урахуванням вимог ДФУ та ЄФ або інших сучасних міжнародних стандартів [102]. Вибраний склад майбутнього препарату представлений сумішшю ЛРС, в якій якість двох складових, а саме нагідок квіток і глоду листя та квіток регламентується відповідними національними монографіями ДФУ, а якість череди трави на момент початку робіт зі створення препарату – застарілим нормативним документом часів СРСР [100]. Тому в перших 2 випадках необхідно було проконтролювати сировину на відповідність ДФУ, а для череди трави актуальним виявилось розробка сучасної нормативної документації.

3.1 Дослідження якості нагідок квіток на відповідність вимогам національної монографії ДФУ «Нагідок квітки»

Результати аналізу зразків RS 923, 924, 925 нагідок квіток (Розділ 2) відповідно до вимог національної монографії ДФУ 2.0 «Нагідок квітки» представлені в табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Результати аналізу зразків нагідок квіток відповідно до вимог ДФУ

Показники	Регламентація	Зразок		
		RS 923	RS 924	RS 925
Опис	Цілі або різані, висушені, повністю розкриті квітки, без квітколожа, махрових форм <i>Calendula officinalis</i> L.	+	+	+

Продовження табл. 3.1

Показники	Регламентация	Зразок		
		RS 923	RS 924	RS 925
Ідентифікація А (макроскопія)	Сировина має макроскопічні ознаки, зазначені у випробуванні А	+	+	+
Ідентифікація В (мікроскопія)	Сировина має мікроскопічні ознаки, зазначені у випробуванні В	+	+	+
Ідентифікація С (тонкошарова хроматографія)	На хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися описані зони	+	+	+
Ідентифікація D (тонкошарова хроматографія)	На хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися описані зони календулозидів	+	+	+
Сторонні домішки (2.8.2):				
-залишків квітконосів, у тому числі відділених при аналізі	Не більше 6 %	0,8 %	1,6 %	-
-кошиків із несправжньоязичковими і трубчастими квітками, що повністю обсипалися	не більше 20 %	5,5 %	3,0 %	1,8 %
-побурілих кошиків	не більше 3 %	-	-	-
-інших частин рослини	не більше 3 %	0,4 %	-	-
-органічних домішок	не більше 0.5 %	-	-	-
-мінеральних домішок	не більше 0.5 %	0,05 %	0,05 %	0,01 %
Втрата в масі під час висушування	Не більше 14 %	6,5 %	7,2 %	4,3 %
Загальна зола	Не більше 11%	9,5 %	8,3 %	8,5 %
Кількісне визначення	не менше 0,4 % флавоноїдів, у перерахунку на гіперозид і суху сировину	0,45 %	0,42 %	0,57 %

Примітка. (–) – не виявлено.

Таким чином, всі аналізовані зразки нагідок квіток відповідали вимогам ДФУ за всіма показниками, вони були об'єднані і надалі для виробництва препарату використовували об'єднану серію.

3.2 Дослідження якості глоду листя та квіток на відповідність вимогам національної монографії ДФУ «Глоду листя та квітки»

Результати макроскопічного аналізу зразків сировини RS 1080, 1032, 1018 (Розділ 2) відповідно до вимог національної монографії ДФУ 2.0 «Глоду листя та квітки» представлені в табл. 3.2.

Таблиця 3.2

Результати аналізу зразків глоду листя та квіток відповідно до вимог ДФУ

Показники	Регламентация	Зразок сировини		
		RS 1018	RS 1032	RS 1080
1	2	3	4	5
Ідентифікація А (макроскопія)	Сировина має макроскопічні ознаки, зазначені у випробуванні А	Сировина за ознаками відповідає <i>C.curvisepala</i>	Сировина за ознаками відповідає <i>C.curvisepala</i>	Сировина за ознаками відповідає <i>C.curvisepala</i>
Ідентифікація В (мікроскопія)	Сировина має мікроскопічні ознаки, зазначені у випробуванні В	+	+	+
Ідентифікація С (тонкошарова хроматографія)	На хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися: в нижній третині хроматограми жовтаво-зелена флуоресціююча зона (вітексин-2"-рамнозид), блакитна флуоресціююча зона, розташована на рівні зони хлорогенової кислоти, жовтаво-оранжева флуоресціююча зона, розташована на рівні зони гіперозиду та жовтаво-зелена флуоресціююча зона (вітексин), розташована вище за зону гіперозиду.	+	+	+
Сторонні домішки (2.8.2): здерев'янілих гілочок понад 2.5 мм у діаметрі Інших сторонніх домішок	не більше 8 % не більше 2 %	- 0,1%	- 0,4 %	- 0,2 %

Продовження табл.3.2

1	2	3	4	5
Втрата в масі під час висушування	не більше 14 %	8,3 %	7,5 %	6,5 %
Загальна зола	не більше 12%	7,8%	5,6 %	4,4 %
Кількісне визначення	не менше 1.3 % флавоноїдів, у перерахунку на гіперозид і суху сировину	1,5 %	2,0 %	1,8 %

Примітка. (–) – не виявлено

Таким чином, всі аналізовані зразки глоду листя та квіток відповідали вимогам ДФУ за всіма показниками, вони були об'єднані і надалі для виробництва препарату використовували об'єднану серію.

3.3 Розробка показників якості череди трави для національної монографії ДФУ

3.3.1 Вивчення макроскопічних та мікроскопічних ознак череди трироздільної у порівнянні із іншими видами роду

Першочерговим завданням було вивчення макроскопічних діагностичних ознак трави *B. tripartita* у порівнянні із ознаками інших близьких видів роду череда. Детальний порівняльний макроскопічний аналіз видів череди та дещо морфологічно подібних видів флори України виявив відмінні морфологічні ознаки, що дозволяють зі значним ступенем достовірності виявляти та діагностувати у природі під час заготівлі сировини та в лабораторії під час товарознавчого аналізу ЛРС *B. tripartita* та інші неофіційальні види як сторонні домішки (див. Додаток А, табл.А1) [129, 130]. Діагностичні ознаки кожного виду в таблиці виділено жирним шрифтом.

Аналіз нормативних документів, що регламентують якість сировини виявив наступне. Монографія на дану сировину представлена в ДФ РБ «Череди трава» [101], де окрім *B. tripartita* також введена *B. frondosa*. У даній монографії описані загальні та відмінні макро- та мікроскопічні ознаки обох видів. Не описані макроскопічні ознаки плодів, за якими відрізняються *B. tripartita* та *B. frondosa*, а саме кількість остюків на

верхівці сім'янки (у *B. frondosa* їх 2, у *B. tripartita* їх може бути 2-3), характер поверхні плодів (у *B. tripartita* поверхня гладенька, у *B. frondosa* густо бородавчаста) та спрямованість щетинок на остюках та бічних ребрах сім'янок (у *B. frondosa* вони спрямовані догори, у *B. tripartita* – донизу). В мікроскопічних ознаках не вказано тип сосочкоподібних виростів епідерми віночка квіток і тип секреторних каналів листків, листочків обгортки, віночка.

ДФ XI регламентує збір сировини *B. tripartita* у фенологічні фази бутонізації та початку цвітіння [100]. Можливо, за логікою цієї вимоги зазначена фармакопея не допускає наявності у сировині *B. tripartita* плодів-сім'янок. Ретельне дослідження процесу висушування у часі ЛРС *B. tripartita* та *B. frondosa* показало, що у деяких суцвіть відбувається дозрівання квіток сировини і утворюються плоди, які вивільняються з кошиків. Саме цей факт пояснює наявність у досліджуваній ЛРС череди значної кількості сім'янок. Таким чином, необхідно зазначити що, крім макроскопічних ознак стебел, листків, кошиків та квіток, саме особливості морфологічної будови сім'янок мають стати надійним ключем для ідентифікації та діагностики ЛРС *B. tripartita*, а також інших, не фармакопейних, видів череди [131].

Об'єктами дослідження були ЛРС *B. tripartita* RS 347, 348, 390, 413, 414, 415, 699, *B. frondosa* RS 700 і *B. cernua* RS 717.

Макроскопічний аналіз проводили візуально та за допомогою бінокулярного мікроскопа БМ-51-2. При макроскопічному аналізі звертали увагу на:

- розмір, колір, форму, характер поверхні стебла;
- розмір, форму, колір, розташування, характер розсіченості листків, форму краю листової пластинки і форму черешка;
- тип, форма, розмір, орієнтація суцвіття;
- кількість, розмір, колір, форма, характер опушення листочків обгортки,
- тип, колір, розмір квіток, наявність або відсутність крайових квіток;
- тип, розмір плодів, а також на кількість і розмір остюків та спрямованість опушення остюків і бічних ребер сім'янок.

За результатами макроскопічного аналізу досліджуваних 7 зразків *B. tripartita* виявили наступне: сировина у більшості випадків дуже здрібнена, ступінь здрібнення листків і суцвіть не дозволяє провести її повноцінний макроскопічний аналіз та достовірно визначити вид ЛРС; у складі сировини, що досліджували, незалежно від ступеню її здрібнення завжди були наявні плоди сім'янки.

Деякі макроскопічні ознаки *B. tripartita* (RS 699), *B. frondosa* (RS 700) та *B. cernua* (RS 717) представлені на рис. 3.1. У результаті макроскопічного аналізу сировини трави *B. tripartita* виявлено, що фармакопейна сировина – це суміш цілих або фрагментованих стебел із листками, листків, квіткових кошиків і сім'янок. Узагальнюючи дані порівняльного аналізу ознак різних видів череди наведених в табл.А1 Додатку А та у вивчених нормативних документах, а також результати проведеного аналізу різних зразків сировини було сформульовано макроскопічні ознаки для *B. tripartita*:

Стебла зелені або зеленувато-фіолетові, округло-овальні, вздовж борозенчасті, до 0.8 см завтовшки. Листки до 15 см завдовжки, зелені або бурувато-зелені, із зубчастопильчастим краєм, супротивні, звужені в короткі, дещо крилаті черешки; серединні листки з 3–5-роздільною пластинкою з ланцетними пальчастими долями, верхівкові листки, а деколи й нижні – цілісні широколанцетні. Суцвіття – прямостоячі кошики 0.6–1.5 см у діаметрі, ширина їх майже дорівнює висоті. У *B. cernua* кошики пониклі. Кошики *B. tripartita* не містять крайових квіток, на відміну від *B. frondosa* і *B. cernua*. Плоди *B. tripartita* плескаті сім'янки, до 8 мм завдовжки, до 3 мм завширшки, на верхівці з 2 або 3 остюками, вдвічі коротшими, ніж сім'янка. Остюки й бічні ребра сім'янок вкриті щетинками, верхівки яких спрямовані вниз. У *B. cernua* сім'янки обернено клиноподібної форми з 4 остюками та щетинками на остюках і бічних ребрах, що спрямовані вниз. У *B. frondosa* сім'янки густо бородавчасті з 2 остюками та щетинками на бічних ребрах, які спрямовані вгору (рис. 3.1).

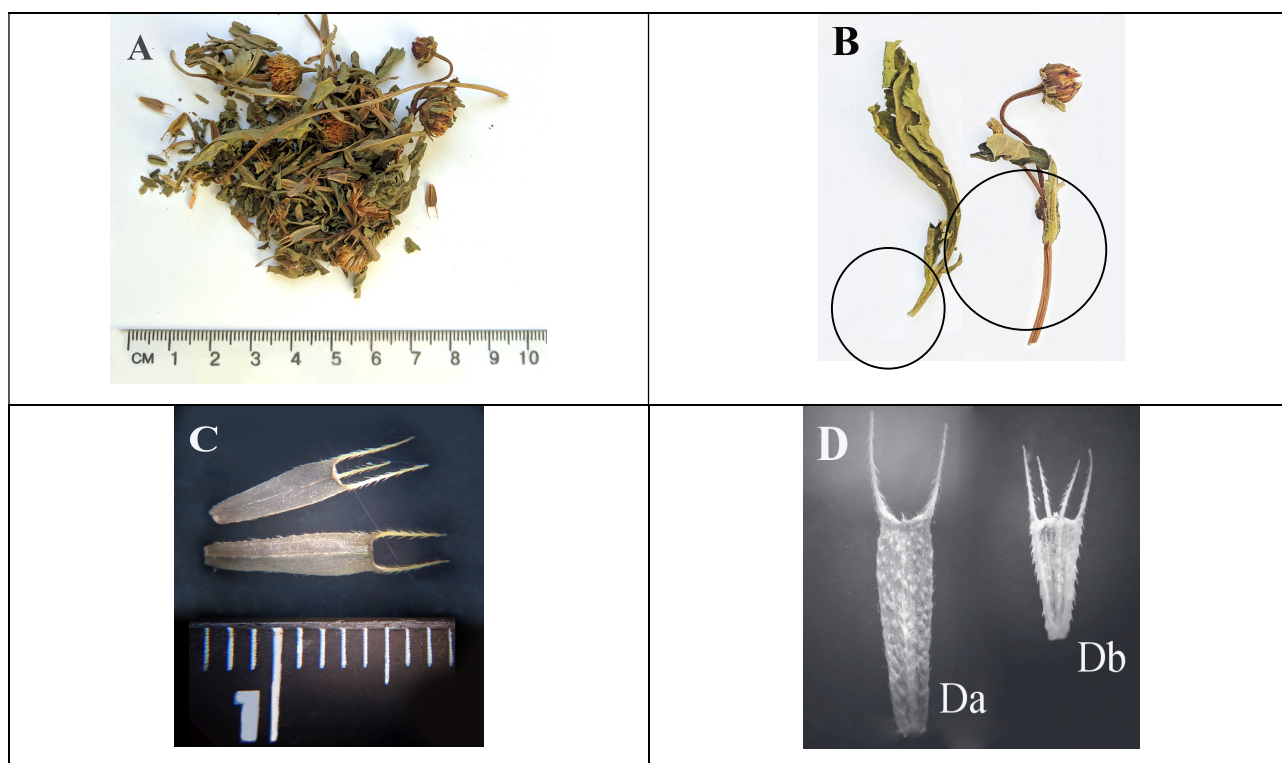


Рис. 3.1 Фрагменти сировини видів роду череда

А – різана трава *B. tripartita*, В – фрагменти листків і суцвіття *B. tripartita*, С – плоди *B. tripartita*; D – плоди: *B. frondosa* (Da) , *B. cernua* (Db)

Таким чином, було сформульовано ознаки, за якими можна достовірно контролювати домішки інших видів череди в фармакопейному виді на стадії проведення макроскопічного аналізу.

Сторонньою домішкою *B. tripartita* є сировина *B. cernua* та *B. frondosa*, в якій: всі листки мають цілісну, видовжено-ланцетну пластинку із пилчато-зубчастим краєм; кошики пониклі на зігнутих квітконіжках, ширина їх у 2-3 рази перевищує висоту; сім'янки ребристі, звичайно з 4 остюками, з них черевний остюк коротший спинних, ребра сім'янки та остюки вкриті щетинками, верхівки яких спрямовані донизу (ознаки ч. пониклої – *B. cernua*, (лупа 10×)); серединні листки мають три-п'яти глибоко розсічену пластинку та довгий, некрилатий черешок, сегменти пластинки видовженої форми із загостреною верхівкою, виїмки між сегментами досягають середньої та бічних жилок 1 порядку; сім'янки сплюснуті, клиноподібні, з 2 ребрами, густо вкриті бородавками та притисненими щетинками, верхівки яких спрямовані догори, що краще

помітно на ребрах; переважно із 2 остюками, вкритими 2 рядами щетинок, спрямованих верхівками донизу (ознаки ч. листяної - *B. frondosa*, (лупа 10×)).

На основі проведеного аналізу сформульовано текст для розділів Ідентифікація А та Сторонні домішки для проектів національної монографії «Череди трава^N» для ДФУ 2.2 та ДФУ 2.5 [121, 132].

Наступним етапом було вивчення мікроскопічних ознак сировини для розробки відповідного розділу національної монографії. Мікроскопічний аналіз проводили на порошку сировини *B. tripartita*, просіяному через сито з діаметром отворів 355, оскільки за вимогами ЄФ та ДФУ це є стандартизованою процедурою при визначення діагностичних ознак ЛРС методом мікроскопії [102].

При мікроскопічному аналізі звертали увагу на:

- форму і розміри клітин, характер потовщення та звивистості клітинних оболонок;
- тип продихового апарату;
- характер опушення листкової пластинки, прилистків та обгортки;
- наявність і тип секреторних каналів;
- наявність і форма верхівок сосочкоподібних виростів епідерми віночку;
- характер потовщення стінок судин;
- характер екзини пилку;
- наявність та тип тканин насіння.

В результаті проведеного мікроскопічного аналізу трави *B. tripartita* виявлені ознаки, що приведені на рис. 3.2.

Виявлено фрагменти пластинки листка з жилками, вздовж яких проходять секреторні канали із червонувато-бурым вмістом; фрагменти пластинки листка де епідерма складається з основних клітин зі звивистими оболонками, продихових апаратів аномоцитого типу, покривних гусеницеподібних волосків з 9–18 тонкостінних клітин, іноді з бурым вмістом, зрідка товстостінних покривних волосків з 2–13 клітин, вкритих поздовжньою складчастою кутикулою; фрагменти епідерми стебел з прямокутних видовжених клітин з потовщеними оболонками; фрагменти епідерми

внутрішніх листочків обгортки з видовжених прямокутних тонкостінних клітин і членистих розгалужених секреторних каналів; фрагменти епідерми трубчастих квіток з багатокутних клітин із округлими сосочкоподібними виростами; фрагменти сітчастих або спіральних судин; округлі пилкові зерна із шипуватою екзиною; фрагменти насінної шкірки з пігментованими темно-коричневими клітинами гіподерми й прилеглим нижнім шаром видовжених жовтуватих склереїд.

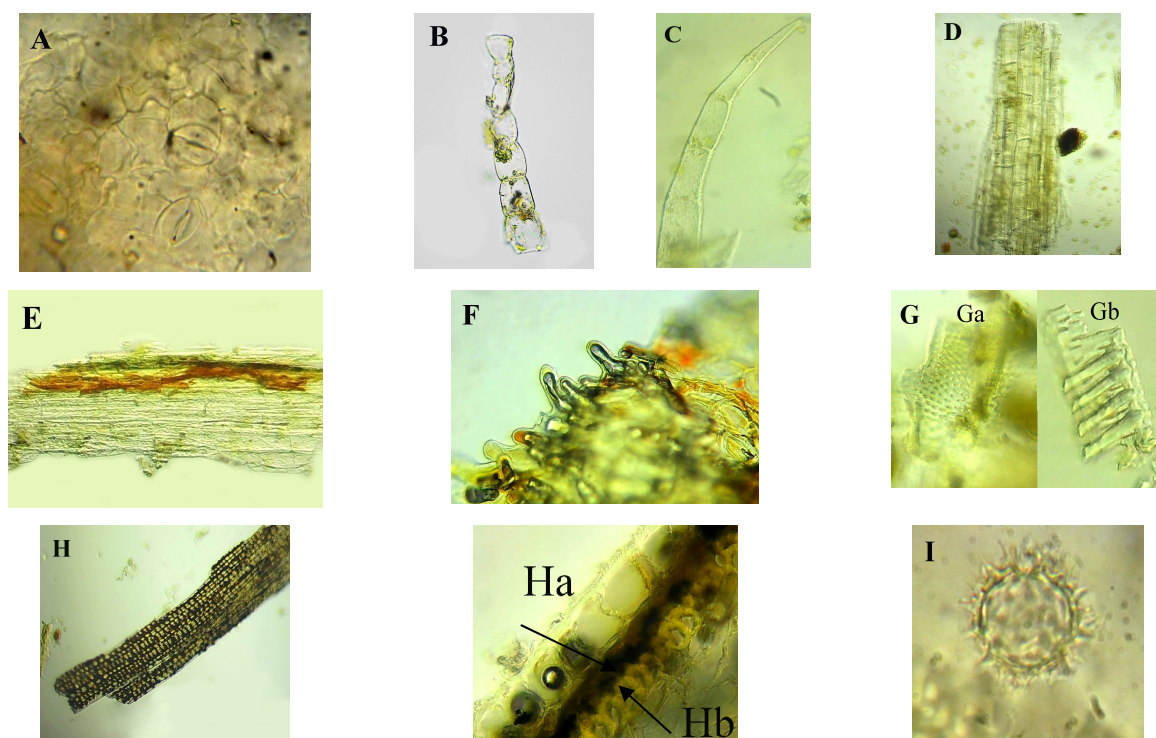


Рис. 3.2 Мікроскопічні ознаки сировини трави *B. tripartita*: фрагменти: А – епідерми листка ($\times 300$); В – гусеницеподібного покривного волоска ($\times 300$); С – товстостінного покривного волоска ($\times 200$); D – епідерми стебла ($\times 200$); E – епідерми внутрішніх листочків обгортки з членистими розгалуженими секреторними каналами ($\times 200$); F – сосочкоподібної епідерми трубчастих квіток ($\times 300$); G – сітчастих (Ga) та спіральних (Gb) судин ($\times 400$); H – поперечний зріз насінної шкірки з пігментованими темно-коричневими клітинами гіподерми (Ha) й прилеглим нижнім шаром жовтуватих склереїд (Hb) ($\times 300$); I – пилкове зерно ($\times 450$)

На основі проведеного аналізу розроблений текст розділу Ідентифікація В для проектів монографії “Череди трава^N” для ДФУ 2.2 та ДФУ 2.5 [133].

3.3.2 Розробка ТШХ методик ідентифікації БАР череди трави та контролю домішок інших видів череди

Наступним етапом дослідження стало вивчення хроматографічних умов визначення БАР череди трави. Нижче наведено розроблені хроматографічні умови та пробопідготовка, які при цьому використовувалися.

Випробовуваний розчин. До 1.0 г подрібненої в порошок сировини (500) додавали 10 мл *етанолу 70 % (об/об)*, кип'ятили протягом 20 хв зі зворотним холодильником, охолоджували і фільтрували.

Розчин порівняння. У якості розчину порівняння обрано розчин суміші ФСЗ ДФУ (ФСЗ ДФУ) – 3 мг гіперозиду, 3 мг рутину та 1 мг кофейної кислоти в 10 мл *метанолу Р* (розчин порівняння 1). Також при проведенні експерименту використовували розчин суміші ФСЗ ДФУ – 3 мг лютеоліну, 3 мг лютеолін-7-глікозиду та 2 мг хлорогенової кислоти в 10 мл *метанолу Р* (розчин порівняння 2).

Стаціонарна фаза. При проведенні ідентифікації трави череди методом ТШХ відповідно до вимог ДФУ (2.2.27) використовували ТШХ-пластинки з товщиною шару від 5 до 40 мкм (Silicagel 60 F₂₅₄ фірми «Merck») на скляній і / або алюмінієвій підложці [122].

Рухома фаза. Використовували уніфіковану рухому фазу, яка широко застосовується для аналізу речовин флавоноїдної природи: *кислота мурашина безводна Р – вода Р – етилацетат Р* (10:10:80) [134].

Детектування (візуальна оцінка). Пластинку висушували при температурі 100-105 °С, ще теплу обприскували 1 % розчином *дифенілборної кислоти аміноетилового ефіру Р* у *метанолі Р*, а потім 5% розчином *макроголу 400 Р* у *метанолі Р*. Пластинку сушили на повітрі протягом 30 хв і переглядали в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм (виявлення А) та при денному світлі (виявлення В). На рис. 3.3 наведено вид хроматограм, отриманих при аналізі різних серій сировини в описаних вище умовах при 2-х видах виявлення.

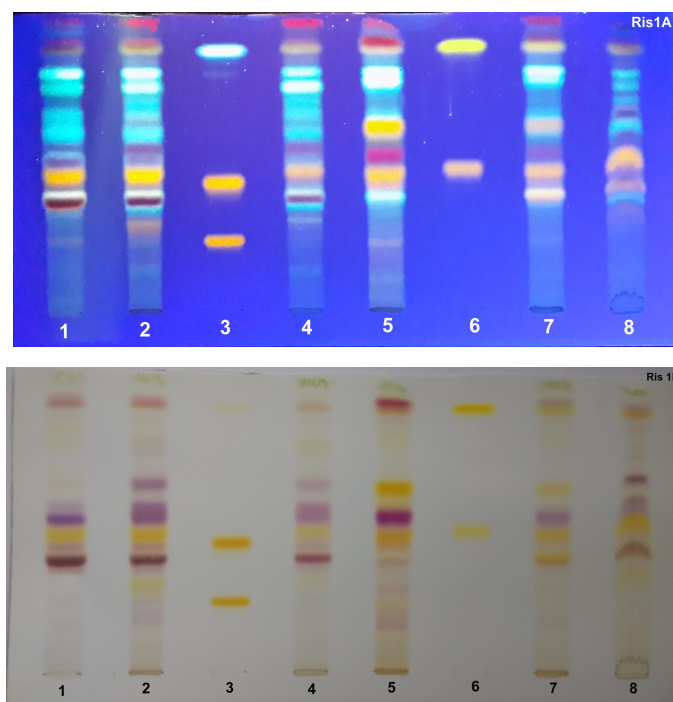


Рис. 3.3 Вид хроматограм, отриманих при ідентифікації речовин флавоноїдної природи трави ч. трироздільної: верхня – УФ 365 нм, нижня – денне світло; 1,2,4,5,7,8 – випробовувані розчини, отримані для шести зразків череди трави, 3 – розчин порівняння 1, 6 – розчин ФСЗ ДФУ лютеоліна та лютеолін-7-глюкозида

Нанесення зразка. В ході досліджень вивчали вплив об'єму нанесення на одержані результати, порівнюючи хроматографічні профілі, отримані при нанесенні досліджуваного розчину у кількості 5 і 10 мкл; зони наносили за допомогою мікрошприца, смугами 10 x 2 мм; відстань між смугами 1 см (рис. 3.4). За отриманими результатами обрано найбільш придатним об'єм нанесення 10 мкл.

Відстань, що має пройти рухома фаза. Порівнювали вплив відстані, що має пройти рухома фаза: 8,5-9 см та 15 см на хроматографічні профілі випробовуваних розчинів. Аналіз отриманих хроматограм дозволяє стверджувати, що для розділення хроматографічних зон достатньо відстані 8,5-9 см.

Робастність. Визначали вплив на одержані хроматографічні профілі випробовуваних розчинів використання різних ТШХ-пластинок Silicagel 60 F₂₅₄ (Merck, Німеччина) із основами: скляною та алюмінієвою. При використанні обраної рухомої фази на всіх використаних ТШХ-пластинках виявлено близькі

хроматографічні профілі різних досліджуваних зразків ч. трироздільної відносно обраних стандартних зразків (значення R_f , послідовність розташування, розмір, інтенсивність забарвлення).

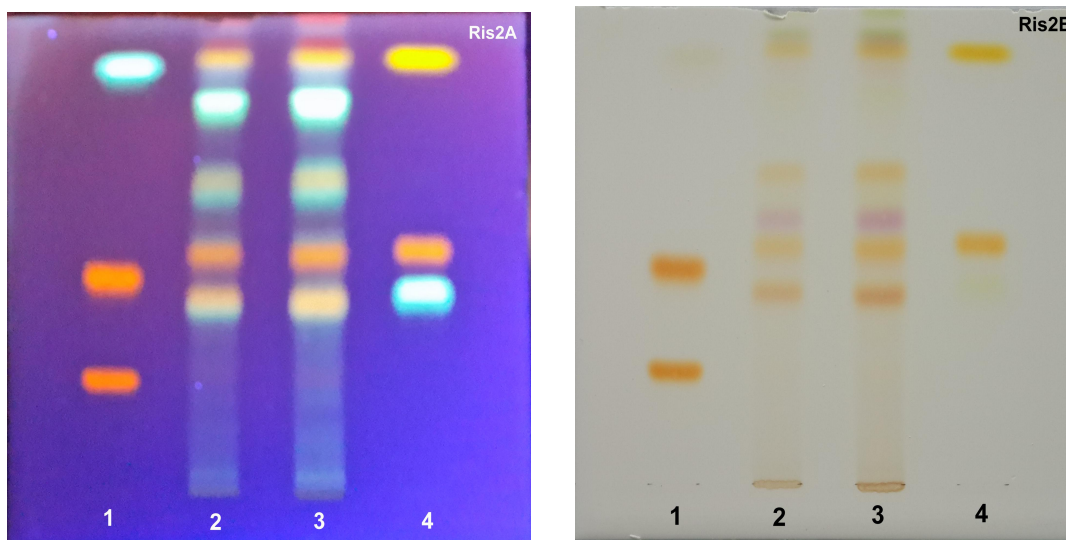


Рис 3.4 Вид хроматограм, отриманих при вивченні впливу об'єму нанесення для випробовуваного розчину череди трави: ліва – УФ 365 нм, права – денне світло; 1 – розчин порівняння 1; 2 – 5 мкл випробовуваного розчину, 3 – 10 мкл випробовуваного розчину, 4 – розчин порівняння 2

Після проведення валідаційних досліджень розробленої методики в якості маркерів вирішено використовувати лютеолін та гіперозид, розташування зон яких в розроблених хроматографічних умовах охоплював практично весь діапазон характерних зон на хроматограмах випробовуваних розчинів череди трави.

Визначення недопустимих домішок череди листяної та череди пониклої на одній хроматографічній пластинці в умовах проведення методики ідентифікації. Для цього на одну хроматографічну пластинку паралельно з досліджуваним розчином ч. трироздільної наносили досліджувані розчини достовірних зразків можливих неприпустимих домішок – ч. листяної та ч. пониклої. Досліджувані розчини ч. листяної та ч. пониклої були приготовлені аналогічно випробовуваним розчинам ч. трироздільної.

При перегляді пластинки в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм на хроматограмі досліджуваного зразка ч. пониклої виявляється характерна зона поглинання із значенням R_f близьким до 0.75, тоді як на хроматограмах розчинів ч. трироздільної та ч. листяної описана зона поглинання відсутня (рис. 3.5), тобто ця зона для ч. пониклої є характерною.

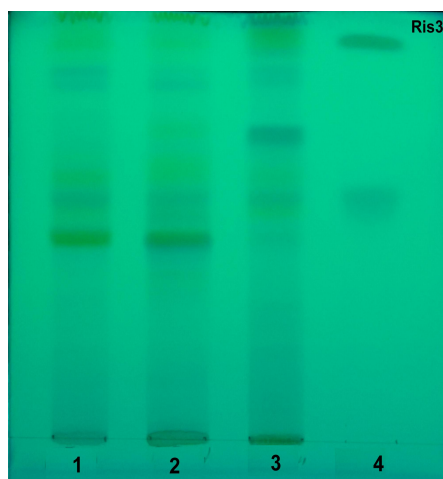


Рис. 3.5 Зразок хроматограми, отриманої при розробці методики контролю домішок при перегляді в УФ – світлі за довжини хвилі 254 нм: 1 - ч. трироздільної, 2- ч. листяної, 3- ч. пониклої, 4 - ФСЗ ДФУ лютеоліна та гіперозида

Одержані хроматограми обробляли у спосіб, що застосували при проведенні ідентифікації сировини та порівнювали хроматографічні профілі трьох досліджуваних видів череди (рис.3.6).

У зв'язку із тим, що зона з R_f близько 0.75 на хроматограмі розчину зразка ч. пониклої є характерною при всіх видах виявлення, було вирішено в методиці контролю домішок залишити виявлення умов методики ідентифікації. Для з'ясування природи речовини, що відповідає за дану характерну для ч. пониклої зону, були проведені додаткові дослідження.

Враховуючи дані про наявність в ч. пониклої у достатній кількості кверцитрин [33], було проведено хроматографування розчину достовірного зразка кверцитрину разом із розчином, отриманим із ч. пониклої в розроблених хроматографічних умовах (рис. 3.7). Як видно із рис. 3.7, на хроматограмі розчину із ч. пониклої характерна зона

з R_f близько 0.75 знаходиться майже на рівні зони кверцитрину, але для з'ясування детальної природи речовини потрібні додаткові дослідження.

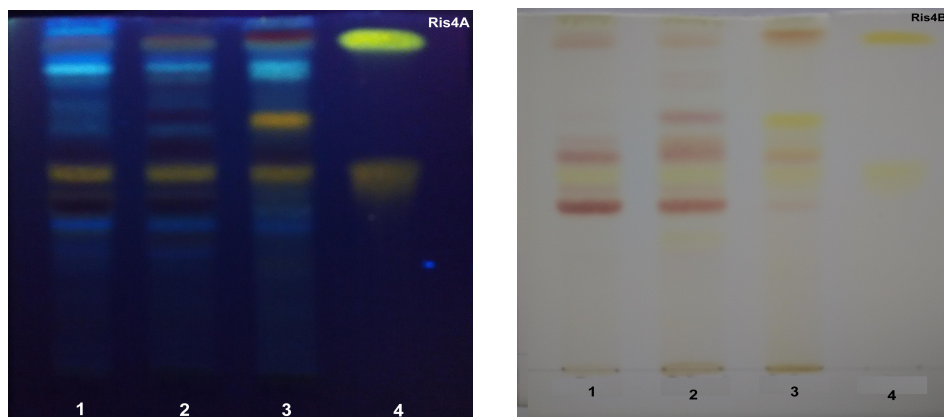


Рис. 3.6 Вид хроматограми, отриманої при розробці методики контролю домішок інших видів череди при проявленні в умовах методики ідентифікації: ліва – УФ 365 нм, права – денне світло; зразки трави: 1 – ч. трироздільної, 2 – ч. листяної, 3 – ч. пониклої; 4 – суміші ФСЗДФУ лютеоліну та гіперозиду

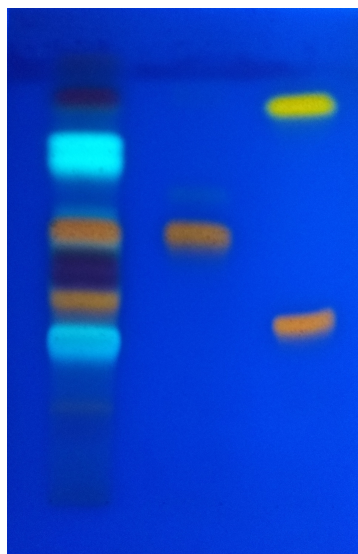


Рис. 3.7 Вид хроматограми, отриманої при розробці методики контролю домішок інших видів череди при проявленні УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм: 1 – зразок ч. пониклої, 2 – СЗ кверцитрину, 3 – суміш ФСЗДФУ лютеоліну та гіперозиду

Як видно із рис. 3.7, на хроматограмі розчину із ч. пониклої характерна зона з R_f близько 0.75 знаходиться майже на рівні зони кверцитрину, але для з'ясування детальної природи речовини потрібні додаткові дослідження.

Для підтвердження специфічності та робасності методики контролю домішок проведені додаткові випробування із іншими зразками ч. трироздільної, ч. листяної, ч. пониклої на інших хроматографічних пластинках (рис. 3.8).

Як показує аналіз, досліджувані розчини зразків ч. трироздільної виявляють близький хроматографічний профіль речовин флавоноїдної природи по відношенню до обраних стандартних зразків. В умовах проведення методики недопустимі домішки ч. трироздільної – ч. листяна та ч. поникла, незважаючи на те, що хроматографічні профілі розчинів всіх видів череди є близькими, можливо контролювати за їх характерними зонами. Так, при перегляді пластинки після обприскування в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм, інтенсивна жовта флуоресціююча зона, що виявляється на хроматограмі випробовуваного розчину ч. пониклої у нижній частині верхньої третини хроматограми (R_f близько 0.75) є характерною і вона проявляється навіть у разі присутності даного виду в зразках ч. трироздільної в невеликих кількостях (менше 5%).

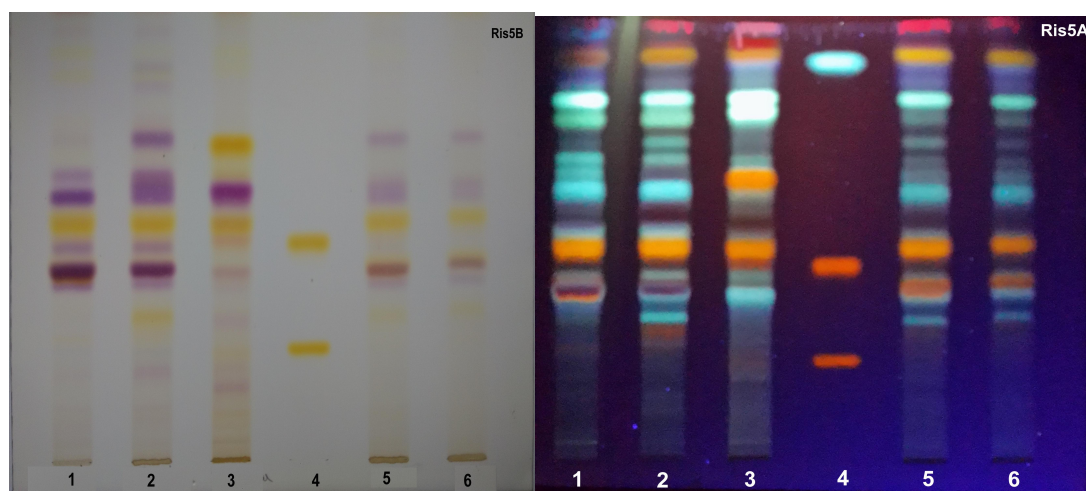


Рис 3.8 Вид хроматограм, отриманих при розробці методики контролю домішок на ТШХ-пластинках із скляною підложкою: ліва – денне світло, права – УФ 365 нм; зразки трави 1 – ч. трироздільної, 2 – ч. листяної, 3 – ч. пониклої, 4 – хроматограма розчину порівняння 1, 5 та 6 – хроматограми різних зразків ч. трироздільної

При перегляді у денному світлі, ця зона проявляється як інтенсивна жовта зона. Характерною є також інтенсивна рожево-фіолетова зона на хроматограмі розчину ч.

листяної, яка виявляється майже на тому ж рівні. Зазначені межі – менше 5% домішок знайдені експериментально при проведенні макроскопічного аналізу досліджуваних зразків ч. трироздільної трави, в результаті яких були виявлені і кількісно оцінені домішки інших видів, а саме ч. пониклої (рис. 3.9, хроматограми 1 і 4) і ч. листяної (рис. 3.9, хроматограми 2 і 8).

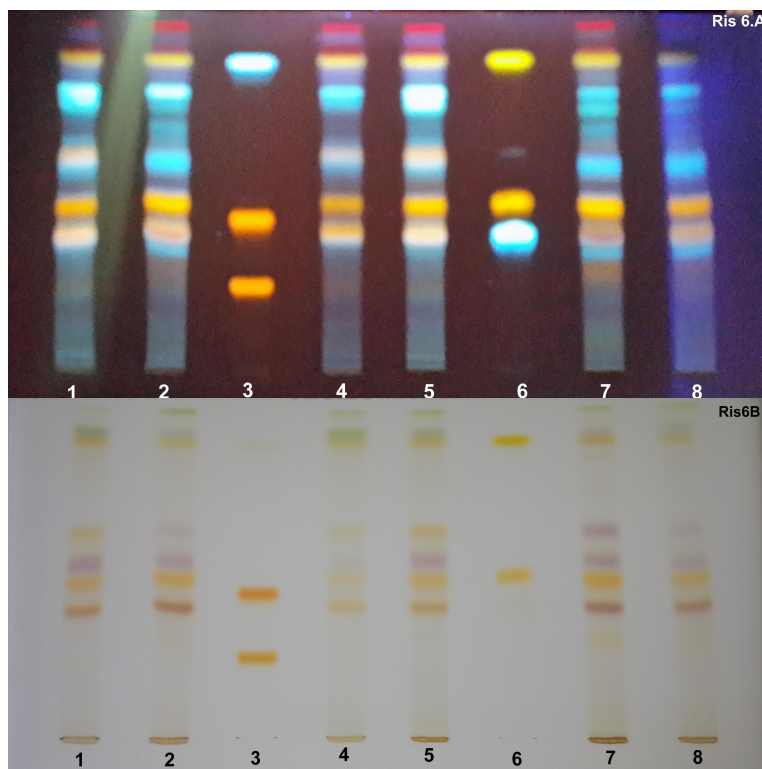


Рис. 3.9 Вид хроматограм, отриманих при розробці методики контролю домішок інших видів череди на ТШХ-пластинках із алюмінієвою підложкою: верхня – УФ 365 нм, нижня – денне світло; 1,4 – зразки ч. трироздільної з домішкою ч. пониклої; 2, 8 – зразки ч. трироздільної з домішкою ч. листяної; 3- хроматограма розчину порівняння 1; 5 – зразок ч. пониклої; 6 – хроматограма розчину порівняння 2; 7 – зразок ч. листяної

В результаті було встановлено, що при наявності менше 5% домішок ч. пониклої та ч. листяної, їх можна хроматографічно контролювати.

Враховуючи отримані результати обрано наступну регламентацію розділу «Інші види череди»:

Виявлення А: переглядають в УФ світлі за 365 нм.

Результати А: на хроматограмі випробовуваного розчину в нижній частині верхньої третини хроматограми не має виявлятися інтенсивна жовта флуоресціююча зони на рівні відповідної зони на хроматограмі розчину порівняння ФСЗДФУ ч. пониклої.

Виявлення В: переглядають за денного світла.

Результати В: на хроматограмі випробовуваного розчину в нижній частині верхньої третини хроматограми не має виявлятися інтенсивна жовта зона на рівні відповідної зони на хроматограмі розчину порівняння ФСЗДФУ ч. пониклої або інтенсивна рожево-фіолетова зони на тому ж рівні (ч. листяна) [135].

3.3.3. Вивчення хроматографічного профілю флавоноїдних сполук різних видів роду череда

Як показано раніше, три зазначених вида череди відрізняються хроматографічним профілем при вивченні методом ТШХ. Головною діагностичною відмінністю ч. пониклої від 2-х інших видів є наявність на хроматограмі характерної інтенсивної зони у верхній третині хроматограми, тоді як на хроматограмах розчинів ч. трироздільної та ч. листяної описана зона відсутня, таким чином дана зона для ч. пониклої є діагностичною. Для з'ясування природи даної речовини проведено хроматографування розчину ч. пониклої методом ТШХ в умовах зазначених вище, знята з хроматографічної пластинки область силікагелю, відповідна рівню елюювання вказаної зони, силікагель вичерпно проекстрагований метанолом і далі отриманий після упарювання розчинника залишок розчиняли у метанолі до отримання концентрації 1 мг/10 мл й проаналізований методом ВЕРХ в умовах наведених у Розділі 2. Паралельно проаналізовано розчин СЗ кверцитрина (1 мг/10 мл).

Для ідентифікації речовини використовували як час утримування піків, так і їх УФ-спектри. В табл. 3.3. наведено отримані результати, на рис. 3.10 виміряні УФ-спектри. Виходячи із отриманих результатів, а саме із збігу як часів утримування, так і

максимумів спектрів поглинання, з великою долею ймовірності можна стверджувати, що діагностична зона на хроматограмі ч. пониклої належить кверцитрину.

Таблиця 3.3

Час утримування і максимум УФ-спектра піка кверцитрину і піка зони, виділеної з хроматографічної пластинки

Кверцитрин		Зона, виділена з ТШХ-пластинки	
Час утримування, хв	Максимум УФ-спектра	Час утримування, хв	Максимум УФ-спектра
21.0	256 нм, 349 нм	21.0	256 нм, 347 нм

Для детального вивчення компонентного складу флавоноїдів і гідроксикоричних кислот проаналізовані 8 зразків череди трави методом ВЕРХ в умовах, наведених в Розділі 2. Використано 5 зразків фармакопейної сировини: зразки ч. трироздільної (RS 707, 1053, 1081, 1090, 1093), 1 зразок ч. пониклої (RS 717), 1 зразок ч. листяної (RS 700) і 1 зразок – суміш ч. трироздільної і ч. пониклої. (RS 708). Випробовувані розчини готували, як описано у Розділі 2, паралельно готували розчини стандартів флавоноїдної природи (як агліконів, так і глікозидів) і гідроксикоричних кислот у концентрації 1 мг/10 мл метанолу.

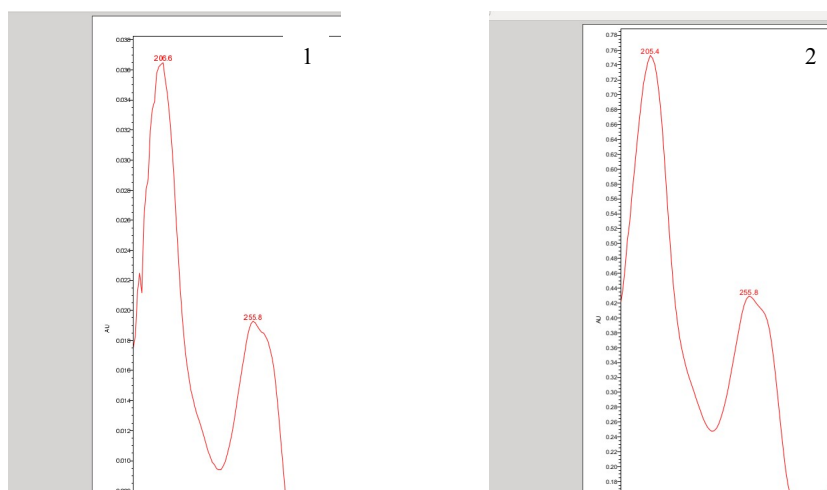


Рис. 3.10 УФ-спектри піка кверцитрина; 2- УФ-спектр піка виділеної зони

На рис. 3.11 показані УФ-спектри еталонних речовин, піки яких виявлені на хроматограмах досліджуваних зразків, а на рис. 3.12 показана об'єднана хроматограма 9 еталонних зразків та їх час утримування.

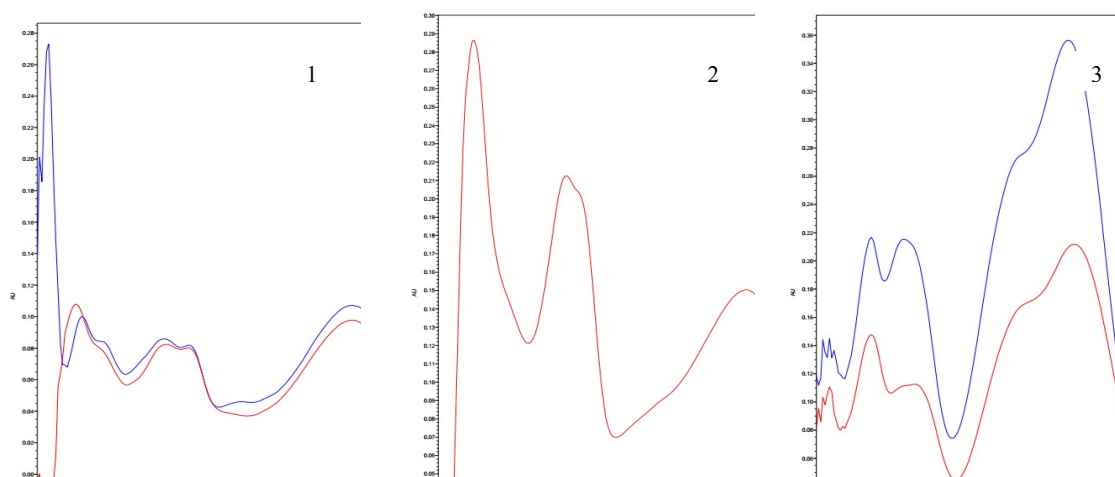


Рис. 3.11 УФ-спектри піків: 1 – лютеолін-7-глюкозида (червоний) + лютеоліна (синій); 2 – кверцитрина; 3 – хлорогенової кислоти (червоний) + ферулової кислоти (синій)

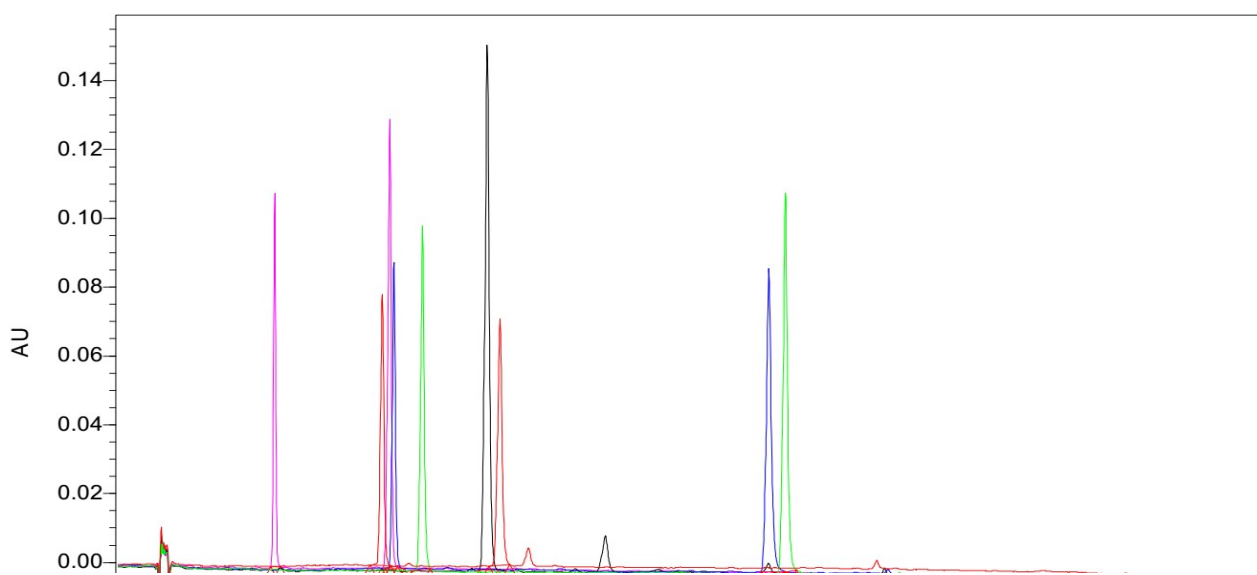


Рис. 3.12 Комбінована хроматограма стандартних речовин та їх час утримування: хлорогенова кислота (9,1 хв) + ферулова кислота (15,5 хв) – рожевий колір; рутин (15,1 хв) + апігенін-7-глюкозид (21,7 хв) – червоний колір; лютеолін-7-глюкозид (17,4 хв) + лютеолін (37,5 хв) – зелений колір; гіперозид (15,7 хв) + кверцитин (36,7 хв) – синій колір; кверцитрин (21,0 хв) – чорний колір

На рис. 3.13 наведено хроматографічний профіль для зразків 3 видів: RS 1081 – зразок *B. tripartita*, RS 700 – зразок *B. frondosa*, RS 717 – зразок *B. cernua*

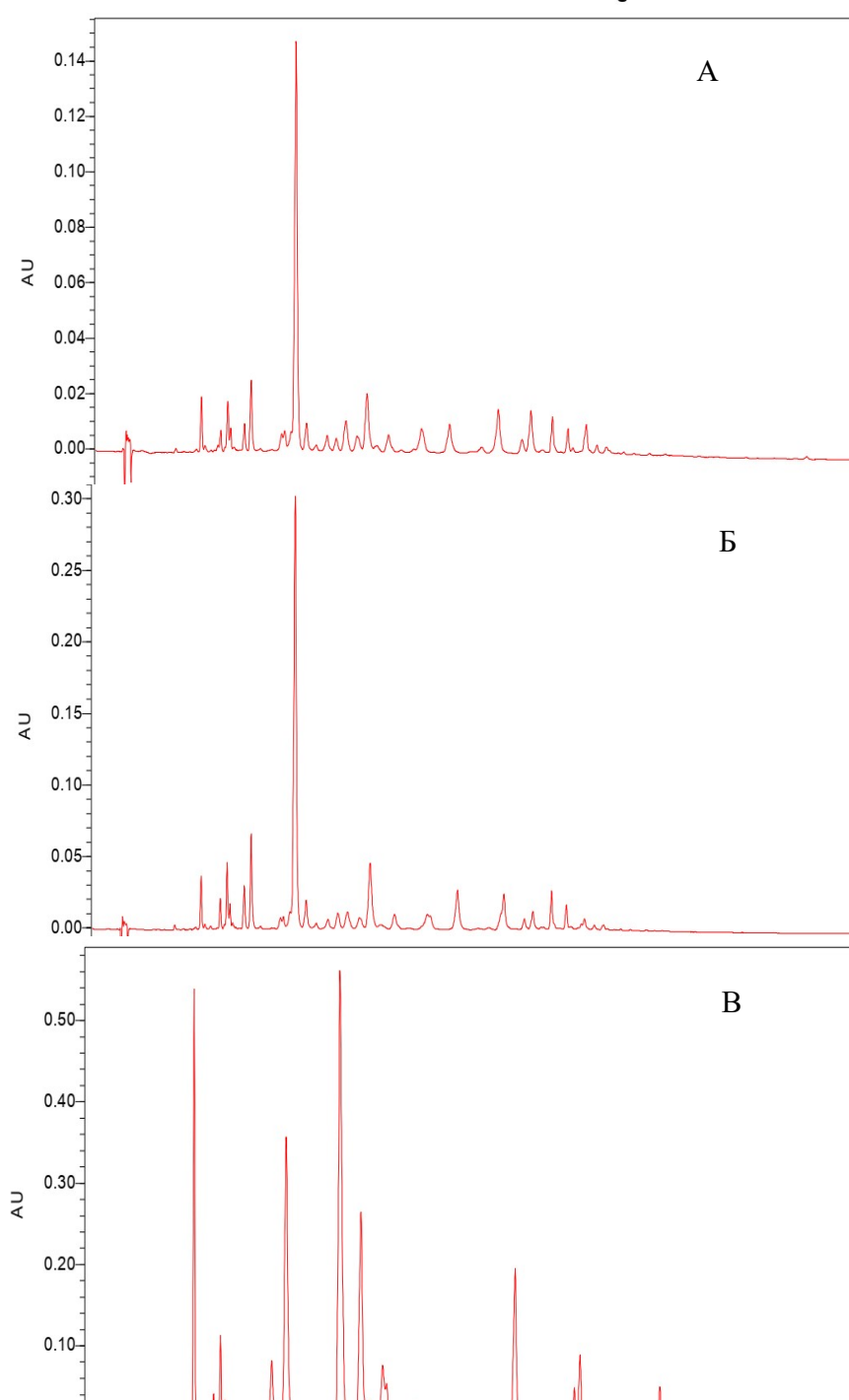


Рис. 3.13 Хроматографічний профіль зразків 3-х аналізованих видів череди: А – RS 1081 – зразок *B. tripartita*, Б – RS 700 – зразок *B. frondosa*, В – RS 717 – зразок *B. cernua*

На рис. 3.14 наведено УФ-спектри найбільш специфічних піків на хроматограмах випробовуваних розчинів череди трави, а в Табл. А2 Додатку А – результати ВЕРХ для всіх досліджуваних зразків.

Для вивчення кореляції між хроматографічними профілями, отриманими методом ВЕРХ і ТШХ, деякі зразки додатково аналізували в умовах ідентифікації монографії ДФУ «Череди трава» (рис. 3.15). Як видно з рис. 3.13 і даних наведених у табл. А2 Додатку А, виявлено подібність хроматографічного профілю для ч. трироздільної і ч. листяної.

Для розчину ч. пониклої (RS 717) в першу чергу, на відміну від інших зразків, відзначається наявність інтенсивного піку, час утримування якого (близько 21 хв) близький до часу утримування кверцетрину та максимум його спектру поглинання відповідає максимуму спектру поглинання кверцетрину (рис. 3.14 (3)/зелена лінія).

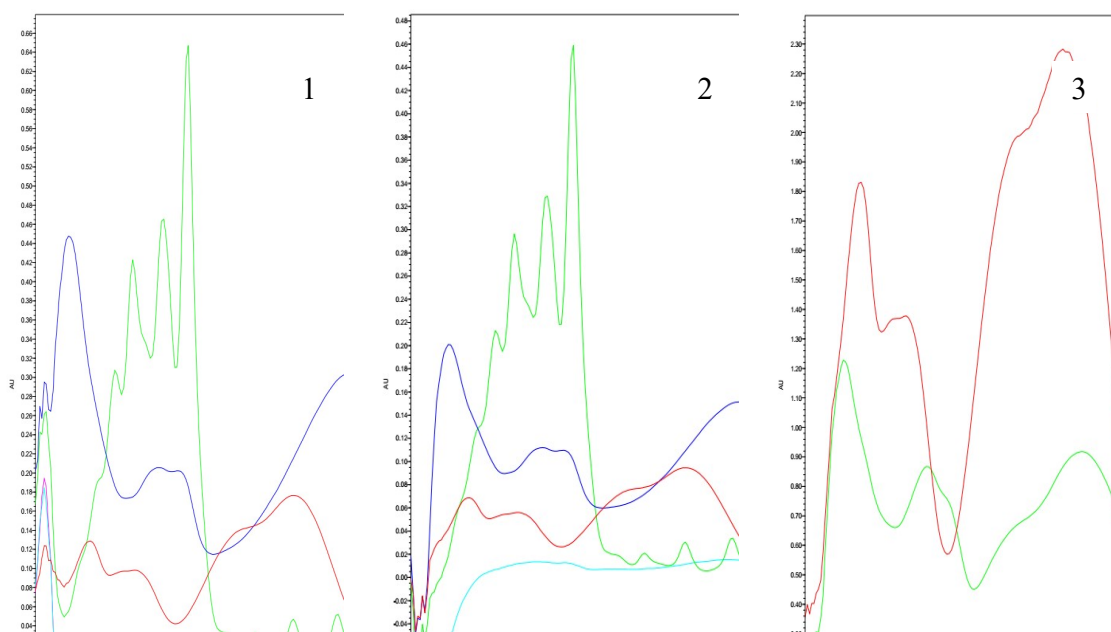


Рис. 3.14. УФ-спектри найбільш специфічних піків на хроматограмах розчинів череди трави: 1 – (RS 700), 2 – (RS 1081) – пік із часом утримування хлорогенової кислоти (червоний колір), пік із часом утримування лютеолін-7-глюкозида (синій колір), пік із часом утримування 20.5-20.9 хв з характерною для поліацетиленів формою спектра (зелений колір), 3 – (RS 717) – пік із часом утримування кверцетрину (зелений колір), пік із часом утримування хлорогенової кислоти (червоний колір).

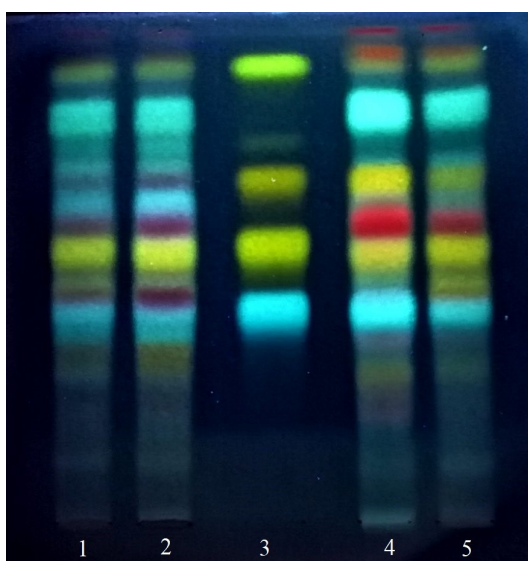


Рис. 3.15 ТШХ-хроматограми: 1 – RS 1081 *B. tripartita*, 2 – RS 700 *B. frondosa*, 3 – хлорогенова кислота + лютеолін-7-глюкозид + кверцитрин + лютеолін (в порядку зростання R_f), 4 – RS 717 *B. cernua*, 5 – RS 708 *B. tripartita* з домішкою *B. cernua*

На хроматограмах ТШХ (рис. 3.15) основною відмінністю між 3 видами була наявність інтенсивної жовтої флуоресцентної зони на рівні зони кверцитрину на хроматограмі *B. cernua*, яка, як показано вище, належить до кверцитрину. Окрім зразка RS 717, пік кверцитрину виявлено на хроматограмі зразка RS 708, для якого під час макроскопічного аналізу встановлено, що це суміш ч. трироздільної та ч. пониклої. Вміст цієї речовини у вказаних зразках, визначений шляхом внутрішньої нормалізації, становив 29% для RS 717 і 16% для RS 708, що також корелювало з хроматографічним профілем цих зразків, отриманим методом ТШХ (рис. 3.15), присутність інтенсивної жовтої флуоресціюючої зони у верхній третині хроматограми для зразка RS 717 і менш інтенсивної для зразка RS 708.

На хроматограмах усіх зразків виявлено пік, час утримування якого близький до часу утримування хлорогенової кислоти та УФ-спектр якого збігається зі спектром хлорогенової кислоти (рис. 3.13 (3)/червона лінія та рис. 3.14 (1), 3.14 (2)/червона лінія). Максимальний вміст виявлено у зразку *B. cernua*. Отримані дані співвідносилися з результатами ТШХ аналізу вказаних зразків. На рівні зони хлорогенової кислоти виявлені інтенсивні сині флуоресцентні зони, інтенсивність яких

на хроматограмі ч. пониклої була вищою, ніж на хроматограмах зразків ч. трироздільної і ч. листяної (рис. 3.15). Крім того, на хроматограмах усіх зразків виявлено піки з часом утримування близько 11 хв, які, виходячи з максимумів поглинання, також належать похідним кофейної кислоти. Вміст їх коливався від 1 до 6 %.

Основним компонентом для всіх зразків череди трави, крім зразка RS 717, була речовина, час утримування якої близький до часу утримування лютеолін-7-глюкозиду та максимуми УФ-поглинання якої збігаються з максимумами поглинання лютеолін-7-глюкозиду. (рис. 3.14 (1)/червона лінія та рис. 3.14 (1), 3.14 (2)/синя лінія). Отримані дані також узгоджуються з ТШХ аналізом зазначених зразків (рис. 3.15) – на всіх хроматограмах з'являється інтенсивна оранжево-жовта зона на рівні зони лютеолін-7-глюкозиду. Його вміст коливався в межах від 30 до 63% для зразка RS 1093. Для 3-х зразків (RS 708, RS 1090 і RS 1093) також виявлено пік, який елюювався після піку лютеолін-7-глюкозиду, УФ-спектр якого подібний до УФ-спектру лютеолін-7-глюкозиду. Тому можна припустити, що ця речовина також належить до глікозидів лютеоліну. Крім того, в усіх зразках, крім зразка RS 717, виявлено пік, час утримування якого близький до часу утримування лютеоліну і максимуми УФ-поглинання якого збігаються з УФ-максимумами лютеоліну. Вміст цієї речовини коливався від 1 до 12%.

У 4-х зразках череди трави додатково визначали вміст флавоноїдів СФ- методом описаним в Розділі 2. У табл. 3.4 наведено результати СФ-визначення вмісту флавоноїдів, у перерахунку на лютеолін-7-глюкозид і результати визначення методом ВЕРХ вмісту суми лютеолін-7-глюкозиду та лютеоліну для 4 зразків череди трави. Як видно з порівняння результатів, також існує кореляція між результатами, отриманими методом УФ-визначення, і результатами, отриманими за допомогою визначення ВЕРХ. Максимальний вміст лютеолін-7- глюкозиду та аглікону (СФ-методом їх визначають разом) виявлено для зразка RS 1093 (2,3%), що також корелювало з результатами,

отриманими методом ВЕРХ – максимальний вміст лютеоліну та його глюкозиду (1,3%) було знайдено саме для цього зразка.

Таблиця 3.4

Результати визначення вмісту суми флавоноїдів у перерахунку на лютеолін-7-глюкозид в зразках череди трави

Визначення	Зразки			
	RS 1053	RS 1081	RS 1090	RS 1093
Вмісту суми флавоноїдів СФ-методом	$1,8 \pm 0,06$	$1,0 \pm 0,04$	$1,4 \pm 0,05$	$2,3 \pm 0,06$
Вмісту суми лютеолін-7-глюкозиду та лютеоліну визначений ВЕРХ-методом	$0,9 \pm 0,04$	$0,4 \pm 0,03$	$0,7 \pm 0,04$	$1,3 \pm 0,05$

Примітка. Дані представлені у % як середнє $\pm$ SD (n=3)

Аналізуючи дані ВЕРХ результатів виявлено, що на хроматограмах усіх зразків відсутній пік із часом утримування рутину, що також відповідає результатам ТШХ, наведеним вище в розділі 3.3.2 (відсутність зони на рівні зони рутину на усіх хроматограмах випробовуваних розчинів череди трави). Слід зазначити, що наші результати не збігаються з опублікованими даними, де для зразків *B. tripartita*, що ростуть у Литві, у зразках методом ВЕРХ ідентифікували рутин [136].

Іншим характерним піком на хроматограмах усіх зразків був пік із часом утримування 20,5–20,9 хв та специфічною спектральною формою (рис. 3.14 (1) та 3.14 (2)/зелена лінія), яка, згідно з опублікованими даними, характерна для поліацетиленів. Пік з часом утримання близько 23 хв, який також виявлений на хроматограмах усіх зразків, мав специфічний довгохвильовий максимум за довжини хвилі 380 нм. За опублікованими даними, він може належати до халконів, що мають гідроксильні радикали в положеннях 3' і 4' (наприклад, бутеїн) [137]. Ці сполуки характеризуються наявністю максимуму поглинання в діапазоні довжин хвиль 340-390 нм і слабо виражений максимум - за 220-270 нм. Вміст цієї речовини коливався в різних зразках (крім зразка RS 1053) від 8 до 11 %.

3.3.4 Розробка методик кількісного визначення БАР череди трави

Розробка спектрофотометричної методики кількісного визначення суми флавоноїдів. Як показано вище при вивченні вмісту флавоноїдних сполук сировини методами ТШХ та ВЕРХ, домінантними речовинами череди трави є флавіон лютеолін-7-глюкозид та його аглікон. У ДФУ в декількох монографіях на ЛРС, що містять флавоноїди використано уніфіковану СФ-методику їх визначення. Методика заснована на спектрофотометричному визначенні глікозидів флавоноїдів після реакції з сумішшю борна-щавлева кислота у середовищі кислот мурашина-оцтова. Вона використовується в монографіях ДФУ для визначення флавоноїдних сполук ЛРС, які представлені переважно флавонами (монографії «Пасифлора», «Материнки трава^N», «Ромашки квітки^N», «Пижма квітки^N», «Фіалка триколірна») [84, 132]. Враховуючи наявність флавіонів у череди траві нами використана дана методика для їх кількісного визначення в сировині.

При виборі стандарту для розрахунку враховували кілька факторів, а саме: 1 – наявність даної сполуки в сировині, 2 – збіг максимуму поглинання розчину обраного стандарту з максимумом поглинання випробуваного розчину сировини, 3 – доступність стандартного зразка. У результаті встановлено, що спектри поглинання розчинів СЗ лютеоліну та лютеолін-7-глюкозиду практично збігаються зі спектром поглинання випробуваного розчину череди трави і спектри мають однакові максимуми поглинання за довжини хвилі 410 ± 2 нм. Спектри представлені на рис. 3.16.

Таким чином, підтверджена специфічність даної методики для визначення флавоноїдів у череді траві. Вибір зупинено на стандартному зразку лютеоліну як більш доступному, а при розрахунках необхідно використовувати коефіцієнт перерахунку на лютеолін-7-глюкозид.

Лінійність та діапазон застосування даної методики вивчалися раніше при розробці різних монографій на ЛРС, що стандартизують за вмістом флавоноїдів [137-139].

Регламентация вмісту суми флавоноїдів у перерахунку на лютеолін-7-глюкозид в череді траві встановлено на рівні не менше 1 % за результатами аналізу більш 10 серій сировини із різних місць та років збору.

Розробка методики кількісного визначення полісахаридів. Враховуючи те, що полісахариди череди трави також є відповідальними за фармакологічну активність препаратів череди, нами проведені дослідження з розробки методики кількісного визначення полісахаридів. Дана методика запропонована як випробування, що рекомендується у разі використання сировини для виробництва лікарських рослинних препаратів, в яких регламентовано вміст полісахаридів.

За основу взята фармакопейна методика, яка описана в декількох національних монографіях ДФУ («Алтея корені», «Подорожника великого листя», «Ламінарії слані») [84]. Методика заснована на гравіметричному визначенні полісахаридів після висадження їх з водного витягу сировини етанолом. Враховуючи, що в різних монографіях наведені різні співвідношення аліквот водних витягів із сировини і кількість доданого етанолу, був проведений експеримент де до аліквоти водного витягу череди трави 25,0 мл додавали 50,0 мл (співвідношення (СВ) 1:2), 75,0 мл (СВ 1:3) і 100,0 мл (СВ 1:4) етанолу 96% відповідно і далі проводили висадження та гравіметричне визначення відповідно до методики. В табл. 3.6 наведено результати для 3 серій сировини.

Таблиця 3.6

Результати, отримані при вивченні залежності вмісту полісахаридів від кількості доданого спирту

RS/ CB	Вміст полісахаридів, у %	RS/CB	Вміст полісахаридів, у %	RS/CB	Вміст полісахаридів, у %
414/1:2	5,82 ± 0,25*	708/1:2	3,37 ± 0,16	699/1:2	3,14 ± 0,18
414/1:3	7,07 ± 0,32	708/1:3	4,24 ± 0,27	699/1:3	4,10 ± 0,30
414/1:4	7,10 ± 0,28	708/1:4	4,30 ± 0,24	699/1:4	4,05 ± 0,27

Примітка. * середнє значення, n=3

Як видно із наведених даних при переході від СВ 1:2 до СВ 1:3 кількість висаджених полісахаридів суттєво (майже на 20 %) зростає, тоді як при переході від СВ 1:3 до СВ 1:4 результати визначення статистично не відрізняються. У результаті проведеного експерименту вибір зупинено на співвідношенні водної аліквоти витягу із сировини до кількості доданого етанолу 96 % 1:3. Тобто 25,0 мл водного розчину поміщають у центрифужну пробірку, додають 75,0 мл *етанолу 96 % Р* і далі проводять визначення за методикою.

Перевірено прецизійність результатів визначення вмісту полісахаридів у сировині однієї серії паралельно із 5 наважок сировини. Метрологічні характеристики наведено у табл. 3.7.

За результатами аналізу 7 серій сировини із різних місць та років збору регламентація вмісту полісахаридів в череді траві встановлено на рівні не менше 4 % [140, 141].

Таблиця 3.7

Результати перевірки прецизійности методики визначення полісахаридів

$X_i, \%$	f	$\bar{X}$	S	S_x	$P, \%$	$t(P, f)$	Δ_x	$\varepsilon, \%$
4,05	4	4,16	0,135	0,078	95	2,77	0,168	4,03
4,32								
4,18								
4,08								
4,45								

3.4. Дослідження якості череди трави на відповідність національної монографії ДФУ «Череди трава^N»

Результати аналізу зразків череди трави (RS 1081, 1090, 1093) відповідно до вимог проекту національної монографії ДФУ 2.5 «Череди трави» представлені в табл. 3.8.

Таблиця 3.8

Результати аналізу зразків череди трави відповідно до вимог ДФУ

Показники	Регламентация	Зразки		
		RS 1081	RS 1090	RS 1093
1	2	3	4	5
Опис	Висушена трава дикорослої та/або культивованої однорічної рослини <i>Bidens tripartita</i> L., зібрана у фазі бутонізації та початку цвітіння	+	+	+
Ідентифікація А (макроскопія)	Сировина має макроскопічні ознаки, зазначені у випробуванні А	+	+	+
Ідентифікація В (мікроскопія)	Сировина має мікроскопічні ознаки, зазначені у випробуванні В	+	+	+
Ідентифікація С (тонкошарова хроматографія)	На хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися описані зони	+	+	+
Сторонні домішки (2.8.2): - частин рослини, що змінили забарвлення, - стебел, зокрема виділених під час аналізу; - сторонніх часток	Не більше 8 % Не більше 40 % Не більше 4 %	Не виявлено 30,8 % Не виявлено	Не виявлено 15,5 % Не виявлено	Не виявлено 27,0 % Не виявлено
Інші види череди (ТШХ)	На хроматограмі випробовуваного розчину в нижній частині верхньої третини хроматограми не має виявлятися інтенсивної жовтої зони на рівні відповідної зони на хроматограмі розчину порівняння 2 (<i>B. serpu</i> a L.) або інтенсивної рожево-фіолетової зони на тому самому рівні (<i>B. frondosa</i> L.).	Не виявлено	Не виявлено	Не виявлено
Втрата в масі під час висушування	Не більше 10 %	8,5 %	7,7%	6,8 %
Загальна зола	Не більше 10%	5,5 %	4,3 %	7,6 %
Кількісне визначення	Не менше 1 % флавоноїдів, у перерахунку на лютеолін-7-глюкозид і суху сировину	1,0 %	1,8 %	1,2 %

Як видно із наведених даних, всі аналізовані зразки череди трави відповідали вимогам ДФУ за всіма показниками, вони були об'єднані і надалі для виробництва препарату використовували об'єднану серію

Висновки до розділу 3

1 Всі проаналізовані зразки нагідок квіток, глоду листя та квіток, які подальше використовували для отримання багатокомпонентного рослинного засобу, відповідали за всіма показниками вимогам ДФУ.

2 Проведений аналіз різних зразків череди трави дало змогу сформувати тексти розділів Ідентифікація А та Ідентифікація В для проектів національної монографії «Череди трава^N» для ДФУ 2.2 та ДФУ 2.5.

3 Розроблено та валідовано ТШХ – методики ідентифікації череди трави і контролю домішок інших видів череди в фармакопейному виді, де в якості стандартів запропоновано використання ФСЗ ДФУ лютеоліна, гіперозида та вперше ФСЗ ДФУ череди пониклої. Методики запропоновані для проекту національної монографії «Череди трава^N».

4. Методами ВЕРХ і ТШХ досліджено компонентний склад флавоноїдних сполук різних видів трави череди. Встановлено подібність компонентного складу для ч. трироздільної та ч. листяної та відмінність для ч. пониклої. Методи ТШХ, ВЕРХ використано для виділення та ідентифікації кверцитрину, речовини, що є діагностичною для *B. cernua*, домішки якої можна контролювати за допомогою описаних методів у фармакопейному виді. З'ясовано, що основним компонентом у досліджених зразках ч. трироздільної є лютеолін-7-глюкозид із вмістом від 30 до 63 %. Показано кореляційний зв'язок між результатами кількісного визначення суми флавоноїдів СФ-методом та результатами ВЕРХ визначення основних компонентів – лютеоліну та лютеоліну 7-глюкозиду в зразках ч. трироздільної, а також кореляційний зв'язок між інтенсивністю зон на ТШХ-хроматограмах різних зразків та вмістом

відповідних речовин (хлорогенової кислоти, лютеолін-7-глюкозиду, кверцитрину), отриманих методом ВЕРХ.

5. Розроблено методику, що ґрунтується на спектрофотометричному визначенні глікозидів флавоноїдів після реакції з сумішшю борна-щавлева кислота у середовищі кислот мурашина-оцтова на основі аналізу більш 10 серій сировини із різних місць України та років збору.

6. Розроблено методику, що ґрунтується на гравіметричному визначенні полісахаридів після висадження їх із водного витягу сировини етанолом на основі аналізу 7 серій сировини із різних місць України та років збору.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Котова Е.Е., Количев І.А., Котов А.Г., Котов С.А. Проблеми достовірної діагностики фармакопейного виду причепи. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів*: матеріали VI наук.- практич. конф. з міжнародною участю. Тернопіль: ТДМУ «Укрмедкнига», 2016. С. 52-53.
2. Вовк О.Г., Котов А.Г., Котова Е.Е., Количев І.О., Котов С.А. До питання макроскопічної ідентифікації лікарської сировини череди трироздільної трави. *Фармаком.* 2017. № 1, С.17-23.
3. Котов С. А., Гонтова Т. М., Соколова О. О. Удосконалення фармакопейної ідентифікації череди трави за макро- і мікроскопічними ознаками. *Вісник фармації.* 2022. № 1 (103). С.3-9.
4. Котова Э.Э., Котов А.Г., Колычев И.А., Котов С.А. Разработка ТСХ- методик идентификации и контроля примесей для национальной монографии Государственной Фармакопеи Украины «Череды трава». *Вестник фармации.* (Витебск). 2017. № 3 (77). С. 62–67.
5. Kotov Simon, Gontova Tetiana. Evaluation of the polysaccharide fraction content of the bur-marigold herb by gravimetric and spectrophotometric methods. *Contemporary pharmacy:*

issues, challenges and expectations: International e-conference, Kaunas, 23 October 2020. Kaunas: Lithuanian University of Health Sciences, 2020. P. 38.

6. Kotova E., Kotov S., Kotov A. Study of chromatographic fingerprint of flavonoid compounds of the bur-marigold herb. *Scientific Study & Research - Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*. 2021. XXII (1). P. 65-79.

7. Котов С., Гонтова Т. Підходи до стандартизації череди трави за вмістом полісахаридів. *Planta+. Наука, практика та освіта*: матеріали Міжнар. наук.-практ. конф., м. Київ, 20 лют. 2023 р. Київ: Паливода А. В., 2023. Т.2. С.59-62.

РОЗДІЛ 4

ПІДХОДИ ДО ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ РОЗРОБКИ РОСЛИННОГО ЗАСОБУ АНТИАЛЕРГІЧНОЇ ДІЇ, ЇЇ АНАЛІТИЧНЕ ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ЯКОСТІ

4.1. Дизайн комбінованого рослинного засобу

У результаті даних, зібраних з попередньо вивчених джерел, наведених у Розділі 1, було вибрано рослини які найчастіше використовуються для лікування алергії та супровідних захворювань. Далі для дослідження відібрані рослини на основі таких критеріїв: рослина зростає в Україні, має достатню сировинну базу і якість її має бути регламентована монографіями ДФУ. В результаті вибір зупинили на комбінації череда-нагідки-глід.

Вибраний нами склад рослин узгоджується з філософією ТКМ «Jun-Chen-Zuo-Shi»: череда – це головна рослина, безпосередньо направлена на лікування алергії, нагідки – рослина-помічник, завдяки у тому числі і додатковій протиалергійній дії кверцетину, а також вона допомагає в боротьбі з супутніми симптомами завдяки протизапальної та протинабрякової дії. Крім того, враховуючи, що алергія визначається як захворювання, що виникає внаслідок реакції імунної системи на нешкідливий антиген, може бути не зайвою імуностимулююча активність екстрактів нагідок. Глід гармонізує дію перших 2-х рослин завдяки покращенню припливу крові через коронарні артерії до серця, покращенню поглинання кисню та підвищенню ефективності його закачування .

На даному етапі актуальним став пошук шляхів науково обґрунтованого проектування комбінованого засобу поліфункціональної, зокрема антиалергічної дії на основі ч. трироздільної, що нормалізує функціонування систем захисту організму, підвищує неспецифічну резистентність організму, нормалізує імунний статус, за допомогою літературно- логічних і статистичних методів аналізу.

Перспективним представилось для оцінки передбачуваної дії сумарного рослинного препарату використання фітофармакологічного дизайну препарату (ФФД) і фітохімічного дизайну (ФХД) препарату (Розділ 1), а як статистичні методи обробки літературно-логічної інформації застосувати метод лінійної кореляції із застосуванням експертної кількісної оцінки (ЕКО) фармакологічної активності (ФА) [114] з використанням коефіцієнту рангової кореляції Спірмена. Для демонстрації застосовності методу лінійної кореляції ЕКО ФА обраний майбутній комбінований лікарський рослинний препарат, що розробляється. До складу препарату входять череди трава (5-7 частин), календули квітки (2,5-3,5 частин), глоду листя і квітки (0,5-1,5 частин), які теоретично, в комбінації, можуть проявляти протиалергічну дію і покращувати імунний статус організму.

ФХД комбінованого рослинного засобу

При розробці ФХД різних комбінацій ЛРС використані відомості про вміст в ЛРС таких БАР як флавоноїди, оксикоричні кислоти, поліфеноли, тритерпени, антоціани, білки/амінокислоти, полісахариди, які окремо і в сукупності можуть володіти такими видами фармакологічної активності як загальнозміцнювальна, протизапальна, репаративна, десенсибілізуюча, протисвербіжна, жовчогінна, імуностимулююча та інші. Частина з вказаних БАР (флавоноїди, поліфеноли, полісахариди) визначалася експериментальним шляхом з використанням уніфікованих методик, описаних в ДФУ [143], частина – в результаті літературного пошуку даних [16-19, 25, 56, 83]. У табл. 4.1 наведено інформацію про вміст (у %) даних БАР в ЛРС, яка входять до складу комбінованого ЛРП, а також в 3-х комбінаціях ЛРС, які охоплюють можливий діапазон його складу.

З даних табл. 4.1 видно, що найбільше відхилення (крім антоціанів) спостерігається у складі оксикоричних кислот і тритерпеноїдному складі досліджуваних комбінацій (5% і 4% відповідно), і це навряд чи може, навіть теоретично, вплинути на фармакологічну дію комбінованого ЛРП. Несподівано велике відхилення від середнього значення ($\pm 22\%$), виявилось у вмісті антоціанів. Однак з

огляду на те, що навіть при можливому варіюванні вмісту антоціанів, вони навряд чи значущо вплинуть на таку фармакологічну дію, як десенсибілізуючу, логічним є припущення щодо незначущості впливу вмісту антоціанів на фармакологічну дію комбінованого ЛРП.

Таблиця 4.1

Фітохімічний дизайн комбінованого лікарського рослинного препарату та його деяких комбінацій

БАР	Ч*	Н*	Г*	Вміст БАР в комбінаціях ЛРП, у %												Від- хилен ня, %
				6:3:1				5:3,5:1,5				7:2,5:0,5				
				Ч	Н	Г	Σ	Ч	Н	Г	Σ	Ч	Н	Г	Σ	
Флавоноїди	1,0	0,4	2,0	0,6	0,1	0,2	0,9	0,5	0,1	0,3	0,9	0,7	0,1	0,1	0,9	-
Оксикоричні кислоти	1,2	1,3	1,5	0,7	0,4	0,2	1,3	0,6	0,5	0,2	1,3	0,8	0,3	0,1	1,2	± 5
Поліфеноли	1,4	1,3	2,1	0,8	0,4	0,2	1,4	0,7	0,4	0,3	1,4	1,0	0,3	0,1	1,4	-
Тритерпени	1,4	1,7	2,0	0,8	0,5	0,2	1,5	0,7	0,6	0,3	1,6	1,0	0,4	0,1	1,5	± 4
Антоціани	0,5	0,5	2,7	0,3	0,2	0,3	0,8	0,3	0,2	0,4	0,9	0,4	0,1	0,1	0,6	± 22
Білки/амінокис- лоти	3,0	3,0	3,5	1,8	0,9	0,4	3,1	1,5	1,1	0,5	3,1	2,1	0,8	0,2	3,1	-
Полісахариди	4,0	4,0	3,0	2,4	1,2	0,3	3,9	2,0	1,4	0,5	3,9	2,8	1,0	0,1	3,9	-

Примітка. n = 3; p ≤ 0,05;

* Ч – череди трава, Н – нагідок квітки, Г – глоду листя та квітки

Таким чином, можна зробити висновок, що за хімічним складом досліджувані комбінації ЛРС практично не відрізняються. Дані ФХД можуть бути використані: для попередньої оцінки біологічної дії; для коригування дозування комбінованого ЛРП або дієтичних добавок на основі комбінованого ЛРП (разової добової дози); під час розробки методик стандартизації комбінованого ЛРП і навіть для аналітичного забезпечення розробки та затвердження технологічних процесів виробництва комбінованого ЛРП.

ФФД комбінованого рослинного засобу

На першому етапі при розробці ФФД за літературними даними визначено спектри фармакологічної активності кожної з рослин комбінованого ЛРЗ [111, 112,

114]. На другому етапі за допомогою методу ЕКО була надана КО фармакологічної активності кожної з рослин, що входять до складу препарату за системою балів. Наприклад, череди траві, яка має антиалергічні властивості, був привласнений вищий бал (КО) десенсибілізуючої дії, іншим компонентам відповідно менші. Далі аналогічним способом були проранжировані додаткові фармакологічні властивості ЛРС, що входять до складу комбінованого ЛРП: протизапальну, спазмолітичну, судинорозширювальну, гіпотензивну, кардіотонічну, сечогінну, капіляророзміцнювальну, седативну, анальгезуючу, репаративну, потогінну, жовчогінну, гепатопротекторну, імуностимулюючу, загальнозміцнюючу, протисвербіжну, що поліпшує обмін речовин (табл 4.2).

Таблиця 4.2

**Фітофармакологічний дизайн комбінованого лікарського рослинного препарату і
ЕКО ФА його компонентів**

ЛРС Дія	Протизапальна	Спазмолітична	Судинно- розширювальна	Гіпотензивна	Кардіотонічна	Сечогінна	Капіляророзміцнюваль	Заспокійлива	Анальгезуюча	Репаративна	Потогінна	Жовчогінна	Гепатопротекторна	Імуностимулююча	Загальнозміцнюваль	Десенсибілізуюча	Протисвербіжна	Поліпшує обмін речовин
Ч*	10	0,1	0,1	5	3	8	10	5	0,1	5	8	10	8	10	5	10	10	10
Н	10	10	8	8	8	3	10	8	3	10	0,1	8	8	10	8	0,1	0,1	5
Г	5	8	10	1	1	10	10	10	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	10	0,1	0,1	8

Примітка. * Ч – череди трава, Н – нагідок квітки, Г – глоду листя та квітки

На третьому етапі роботи отримані бали відкоригували (перерахували) відповідно до співвідношення компонентів у складі 3-х різних комбінацій ЛРС, що вивчаються та які охоплюють можливий діапазон складу комбінованого ЛРП. Для кожної дії розраховано середній бал ЕКО ФА (табл. 4.3). З даних табл. 4.3 видно, що так само спостерігаються мінімальні відхилення в балах у 3-х складах в ряду «фармакологічна дія», що підтверджує (нехай і побічно) результати фітохімічного дизайну. Таким чином комбінації ЛРС, що вивчаються, практично не відрізняються.

При аналізі даних табл. 4.3 виявлено, що показники ФФД також можуть бути використані для попередньої оцінки сумарної біологічної дії комбінованого ЛРС.

Таблиця 4.3

**Фітофармакологічний дизайн комбінованого рослинного засобу і ЕКО ФА з
урахуванням складу деяких комбінацій ЛРС**

Фармакологічна дія	Склад комбінацій ЛРС									Середній бал ЕКО ФА
	Ч*	Н	Г	Ч	Н	Г	Ч	Н	Г	
	6	3	1	5	3,5	1,5	7	2,5	0,5	
Протизапальна	6	3	0,5	5	3,5	0,75	7	2,5	0,25	9,50
Спазмолітична	0,06	3	0,8	0,05	3,5	1,2	0,07	2,5	0,4	3,86
Судиннорозширювальна	0,06	2,4	1	0,05	2,8	1,5	0,07	2	0,5	3,46
Гіпотензивна	3	2,4	1	2,5	2,8	1,5	3,5	2	0,5	6,40
Кардіотонічна	1,8	2,4	1	1,5	2,8	1,5	2,1	2	0,5	5,20
Сечогінна	4,8	0,9	1	4,0	1,05	1,5	5,6	0,75	0,5	6,70
Капіляррозміцнювальна	6	3	1	5	3,5	1,5	7	2,5	0,5	10,00
Заспокійлива	3	2,4	1	2,5	2,8	1,5	3,5	2	0,5	6,40
Анальгезуюча	0,06	0,9	0,01	0,05	1,05	0,015	0,07	0,75	0,005	0,97
Репаративна	3	3	0,01	2,5	3,5	0,015	3,5	2,5	0,005	6,01
Потогінна	4,8	0,03	0,01	4,0	0,035	0,015	5,6	0,025	0,005	4,84
Жовчогінна	6	2,4	0,01	5	2,8	0,015	7	2	0,005	8,41
Гепатопротекторна	4,8	2,4	0,01	4,0	2,8	0,015	5,6	2	0,005	7,21
Імуностимулююча	6	3	0,01	5	3,5	0,015	7	2,5	0,005	9,01
Загально зміцнювальна	3	2,4	1	2,5	2,8	1,5	3,5	2	0,5	6,40
Десенсибілізуюча	6	0,03	0,01	6	0,035	0,015	7	0,025	0,005	6,37
Протисвербіжна	6	0,03	0,01	5	0,035	0,015	7	0,025	0,005	6,04
Поліпшує обмін речовин	6	1,5	0,8	5	1,75	1,2	7	1,25	0,4	8,30

Примітка. * Ч – череди трава, Н – нагідок квітки, Г – глоду листя та квітки

Основні дії досліджуваних комбінацій (6 і більше балів) пов'язані з: 1 група (24,8%) – капіляррозміцнювальною, протизапальною, імуностимулюючою діями (9-10 балів, сума 28,51 балів); 2 група (20,8%) – жовчогінною, гепатопротекторною, що поліпшує обмін речовин діями (7-8 балів, сума 23,92 бала); 3 група (38,5%) – сечогінною, гіпотензивною, седативною, загальнозміцнювальною, десенсибілізуючою,

протисвербіжною, репаративною діями (6-7 балів, сума 44,32 бали). Такі види дії як спазмолітична, судинорозширювальна, кардіотонічна, потогінна, анальгезуюча (4 група - 15,9%) очікувано опинилися за межами (1-5 балів, сума 18,33 бала). Проведено розрахунок кореляційної залежності між КО фармакологічної активності ЛРС у досліджуваних рослинних комбінаціях і вмістом БАР в них, використовуючи ранговий коефіцієнт Спірмена. Отримані дані наведені в табл. А3 Додатку А.

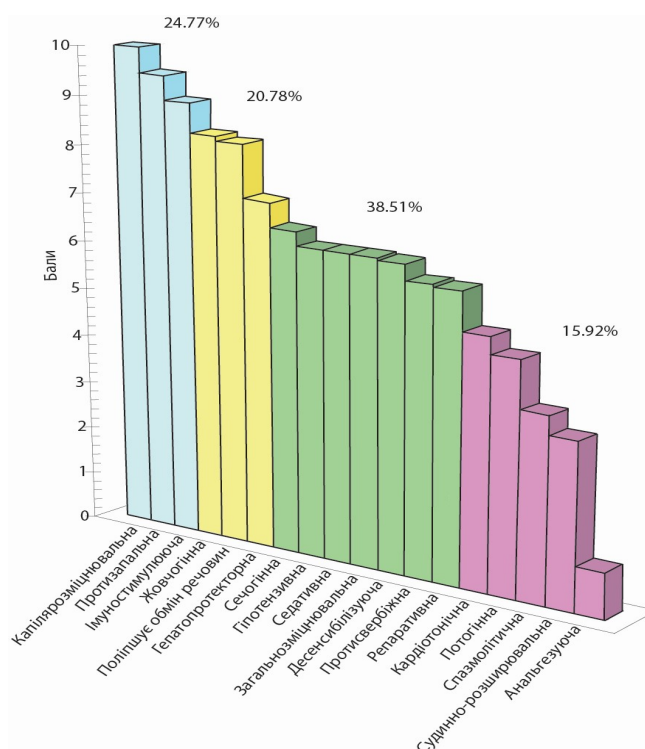


Рис.4.1 Діаграма зв'язку основних фармакологічних дій досліджуваних комбінацій ЛРС

У результаті з'ясовано наступне: для досліджуваних комбінацій ЛРС, що входить до складу передбачуваного комбінованого ЛРП (в діапазоні їх можливого вмісту в композиції) виявлена сильна, пряма і статистично значуща кореляційна залежність (r від 0,924 до 0,997) між вмістом оксикоричних кислот, поліфенолів, тритерпенів, білків/амінокислот, полісахаридів і такими фармакологічними діями як капіляророзміцнювальна, протизапальна, імуностимулююча (1 група); жовчогінна, гепатопротекторна, що поліпшує обмін речовин (2 група); сечогінна, гіпотензивна, седативна, загальноозміцнювальна, десенсибілізуюча, протисвербіжна, репаративна (3 група); потогінна (4 група), що стало несподіваним позитивним ефектом при виявленні

кореляційної залежності «дія-сума БАР». Дивним виявився так само факт практично повної відсутності кореляційної залежності «дія-флавоноїди» і «дія-антоціани», за винятком сечогінної дії. Відсутність сильної, прямої та статистично значущою кореляційної залежності між спазмолітичною, судинорозширювальною, кардіотонічною, анальгезуючою діями і вмістом всіх БАР в загальному і цілому виявилася передбачуваною ще на етапі розробки ФФД (очікувано залишились за межами інтересів).

Таким чином, вибір зупинено на комбінації суміші ЛРС череди трава (5-7 частин), календули квітки (2,5-3,5 частин), глоду листя і квітки (0,5-1,5 частин) для розробки препарату що може проявляти протиалергійну дію і покращувати імунний статус організму [144].

4.2. Відпрацювання технології, визначення критичних параметрів отримання рослинного засобу в лабораторних умовах

Якість ЛРП пов'язана, як із якістю використовуваної ЛРС, так із етапами її переробки та з іншими етапами фармацевтичної розробки ЛРП [145]. Відпрацювання технологічних параметрів екстракції ЛРС є одним з етапів фармацевтичної розробки кінцевого ЛРП.

4.2.1 Вивчення технологічних параметрів екстракції

Об'єктами дослідження були об'єднані серії ч. трироздільної трави, нагідок квіток та глоду листя та квіток, які попередньо ми проаналізували на відповідність вимогам монографій ДФУ (Розділ 3).

1. Проведення ситового аналізу для кожного обраного виду ЛРС

Ситовий аналіз: Проводився вручну за допомогою стандартних сит, що відрізняються розмірами комірок: СИТО 3000/2000/1000 (ДФУ, 2.9.12).

2. Визначення насипного об'єму для кожного обраного виду ЛРС.

Для визначення використовувалася верифікований мірний градуйований циліндр об'ємом 100 мл. Експеримент проводився три рази, як результат використовувалася усереднений результат.

3. Вибір екстрагенту для максимально ймовірного вилучення всіх необхідних БАР з випробовуваної ЛРС. Використовували наступні розчинники: 25%, 40%, 60% етанол.

4. Вибір методу отримання екстрактів. Перколяція - метод приготування настоек і рідких екстрактів, за якого екстрагент в ході процесу безперервно оновлюється [122]. Випробовувану сировину ретельно змішували з порцією зазначеного екстрагенту і залишали на 4-5 год. Далі, сировину переносили в перколятор, заливали екстрагентом до утворення «дзеркала», і проводили екстракцію 24-60 год, до повного виходу перколяту самотпливом. Об'єднанні витяги відстоювали протягом 2 діб за температури 8 °C і фільтрували від можливих домішок.

У результаті проведених експериментів отримали наступні результати:

1. Ситовий аналіз. Через використані сита 3000/2000/1000 пройшла наступна кількість частинок у вище перерахованих рослин (табл. 4.4).

2. Насипний об'єм становив: для череди трави – 19 г /100 мл, нагідок квіток – 22 г /100 мл, глоду листя та квіток – 33 г / 100 мл.

Таблиця 4.4

Результати ситового аналізу вибраних компонентів комбінованого ЛРП

ЛРС	СИТО 3000	СИТО 2000	СИТО 1000
Череди трава	14,3%	36,7%/	49%
Нагідок квітки	30,6%	38,9%	30,6%
Глоду листя та квітки	23,4%/	50,2%	26,4%

3. Вибір екстрагенту. Нижче наведено результати залежності вмісту екстрактивних речовин в отриманих перколятах для всіх проаналізованих ЛРС від часу екстракції та вибраного екстрагенту (табл. 4.5).

Таблиця 4.5

Динаміка вилучення екстрактивних речовин з ЛРС

Екстрагент	Час екстракції, год	Вміст екстрактивних речовин, в перерахунку на сировину, %		
		Череди трава	Нагідок квітки	Глоду листя та квітки
25% етанол	24	20,1	15,2	14,2
	36	24,9	20,8	18,5
	48	25,5	21,8	19,7
	60	25,2	21,6	19,5
40% етанол	24	19,0	28,6	31,0
	36	21,6	36,6	33,5
	48	22,9	38,5	34,4
	60	22,6	38,4	34,1
60% етанол	24	14,5	29,8	31,8
	36	16,4	35,8	35,9
	48	17,7	38,6	38,1
	60	17,5	38,4	37,9

У результаті дослідження процесу вилучення екстрактивних речовин з досліджуваної ЛРС різними розчинниками встановлено, що екстрактивні речовини повністю екстрагуються водно-спиртовими сумішами при співвідношенні сировина/екстрагент 1:20 протягом 48 год. Вибір оптимального екстрагенту потребував подальших досліджень, оскільки для різної сировини максимальна кількість екстрактивних речовин вилучалась різними екстрагентами.

4. Нижче наведено результати опрацювання критичних технологічних параметрів обраного методу отримання витягів – перколяції для обраних ЛРС (табл. 4.6) в лабораторних умовах.

Таблиця 4.6

Критичні технологічні параметри перколяції ЛРС

Параметр	Значення
Ступінь подрібнення сировини	СИТО 3000
Насипний об'єм	Череди трава – 19 г/100 мл, нагідок квітки – 22 г/100 мл, глоду листя та квітки – 33 г/100 мл
Температура	20-22 °С
Спосіб екстракції	Перколяція протягом 48 год
Фільтрація	Самопливом через фільтрувальний папір

У результаті проведеної роботи розроблено технологічні підходи щодо екстракції ч. трироздільної трави, нагідок квіток та глоду листя та квіток і проведено відпрацювання критичних технологічних параметрів екстракції обраних рослин в лабораторних умовах [146].

4.2.2 Вивчення динаміки вилучення БАР вибраних видів ЛРС в залежності від концентрації екстрагенту та антиоксидантної активності отриманих екстрактів

Череди трава. Аналіз літератури і власні дослідження показали, що хімічний склад череди трави досить різноманітний і виділити ту чи іншу сполуку або навіть якийсь певний клас природних сполук в якості характерного маркера не представляється можливим. Даний вид ЛРС має широкий спектр фармакологічної активності і за дію препаратів череди відповідає не одна конкретна речовина (можливо і домінуюча серед інших), а сумарний комплекс БАР. Враховуючи це, для стандартизації якості можливих препаратів на основі ЛРС важливим є вивчення процесу екстрагування саме суми БАР (полісахаридів, флавоноїдів, поліфенолів) із трави череди водно-спиртовими сумішами різної концентрації, вивчення їх компонентного складу та оцінка антиоксидантної активності отриманих при цьому витягів.

Три однакові наважки об'єднаної подрібненої (3000) трави череди поміщали в екстрактори і заливали приготовленими водно-спиртовими сумішами (25%, 40% і 60% етанол відповідно) до «дзеркала». Залишали відстоюватися протягом 48, а потім повільно перколювали, отримуючи 1-й перколят із DSR 1:10 (співвідношення сировина/розчинник), 2-й перколят із DSR 1:15 і 3-й перколят із DSR 1:20 для кожного екстрагенту. Критеріями оцінки ступеня екстракції БАР в отриманих екстрактах були вміст екстрактивних речовин, флавоноїдів, полісахаридів і поліфенолів. Результати наведені в табл. 4.7. Із наведених даних видно, що екстрактивні речовини, флавоноїди та полісахариди максимально екстрагуються в 1-му перколяті з DSR 1:10. Аналізуючи динаміку вилучення речовин можна зробити висновок, що в першому перколяті

витагується близько 80 % (79-83 %) екстрактивних речовин для всіх екстрагентів, від 10 до 19 % у другому перколяті, й від 2 до 8% у третьому. Майже подібні результати отримані при вивченні динаміки екстрагування флавоноїдів і полісахаридів: у першому перколяті флавоноїди вилучаються від 71 до 80 % залежно від концентрації водно-спиртового екстрагенту, а полісахариди – не менше 80 %.

Таблиця 4.7

**Результати визначення вмісту БАР при вивченні динаміки екстрагування з
череди трави спиртовими розчинами різної концентрації**

DSR	Вміст, % *								
	Флавоноїдів			Полісахаридів			Екстрактивних речовин		
	25 %	40 %	60 %	25 %	40 %	60 %	25 %	40 %	60 %
1:10	0,16 (71 %)	0,39 (74 %)	0,58 (80 %)	3,0 (82 %)	2,39 (83 %)	1,04 (84 %)	20,1 (79 %)	19,0 (83 %)	14,53 (82 %)
1:15	0,06 (26 %)	0,10 (19 %)	0,11 (15 %)	0,6 (16 %)	0,46 (16 %)	0,19 (15 %)	4,8 (19 %)	2,57 (11 %)	1,88 (10 %)
1:20	0,005 (3 %)	0,04 (7 %)	0,03 (4 %)	0,07 (2 %)	0,02 (1 %)	0,01 (0.5 %)	0,56 (2 %)	1,28 (6 %)	1,36 (8 %)
Σ	0,23	0,50	0,72	3,67	2,87	1,24	25,46	22,85	17,77

Примітка. * в перерахунку на сировину, в дужках – відносні % вмісту окремих БАР по відношенню один до одного в різних екстрагентах.

Враховуючи отримані результати для екстрактів DSR 1:10 додатково проаналізовано вміст поліфенольних сполук, а також визначено їх антиоксидантну активність методом Райс-Еванса [147]. У табл. 4.8 наведено результати визначення вмісту БАР в отриманих екстрактах, а також результати визначення їх антиоксидантної активності. Як видно з наведених результатів, зі збільшенням концентрації етанолу в екстракційній суміші прогнозовано зростає вміст речовин фенольного характеру, а саме поліфенолів і флавоноїдів, а також зростає значення антиоксидантної активності відповідних екстрактів. З іншого боку, при переході від 40% до 60% етанолу кількість екстрагованих полісахаридів значно зменшується (майже вдвічі).

На рис. 4.2 наведено графіки залежності зміни вмісту цих БАР і величин ТЕАС (у відносних відсотках) від концентрації екстрагенту. Як видно з рис. 4.2, точкою перетину всіх чотирьох графіків є концентрація екстрагента – 40% етанол, що у

порівнянні з 2 іншими екстрагентами, насамперед, дозволяє збалансовано вилучити всі досліджувані БАР, які є фармакологічно активними в череді траві, а з іншого боку, забезпечує достатньо високе значення TEAC.

Таблиця 4.8

**Результати визначення вмісту БАР в різних водно-спиртових екстрактах череди
трави та їх антиоксидантна активність**

Екстракти череди трави (DSR 1:10)	Вміст, % *			TEAC (мг/г)
	Поліфенолів	Флавоноїдів	Полісахаридів	
Екстрагент 25 % етанол	0,43 (22 %)	0,16 (14 %)	3,0 (47 %)	0,878 (19,5 %)
Екстрагент 40 % етанол	0,71 (36 %)	0,39 (35 %)	2,39 (37 %)	1,635 (36 %)
Екстрагент 60 % етанол	0,83 (42 %)	0,58 (51 %)	1,04 (16 %)	1,990 (44 %)

Примітка. * - в перерахунку на сировину, в дужках – відносні % вмісту окремих БАР по відношенню один до одного в різних екстрагентах.

Що стосується результатів дослідження антиоксидантної активності отриманих екстрактів, виявлено сильну позитивну та статистично значущу кореляцію між вмістом поліфенолів в отриманих екстрактах та їх антиоксидантною активністю (коефіцієнт кореляції Пірсона, $r = 0,999$), дещо слабшу для флавоноїдів. ($r = 0,988$), а також обернену кореляцію між вмістом полісахаридів і значенням TEAC (табл. 4.9).

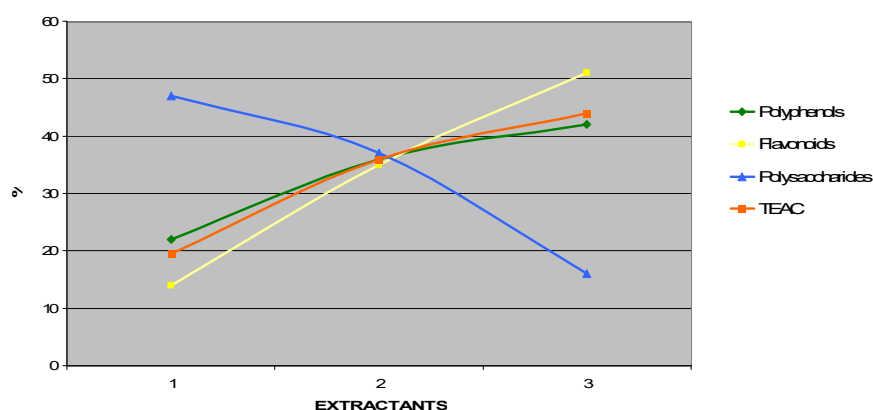


Рис. 4.2 Залежність вмісту БАР і значень антиоксидантної активності (у відносних %) від концентрації використаного екстрагенту (екстрагент 1 – 25% етанол, екстрагент 2 – 40% етанол, екстрагент 3 – 60% етанол)

Результати вивчення кореляції між вмістом компонентів і антиоксидантною активністю

Групи БАР	Поліфеноли	Флавоноїди	Полісахариди
ТЕАС	$r_s = 0,999^*$	$r_s = 0,988$	$r_s = - 0,953$

Примітка. * Кореляція значуща при $r \geq 0.997$, $P=95\%$ [149].

Таким чином, у результаті вивчення екстрагування БАР із трави череди різними розчинниками встановлено, що екстрактивні речовини, полісахариди та флавоноїди вичерпно екстрагуються водно-спиртовими сумішами у співвідношенні сировина/екстрагент 1:20, і з обраними критеріями оцінки встановлено, що 40% етанол є оптимальним з точки зору збалансованої екстракції флавоноїдів, полісахаридів і поліфенолів. Встановлена сильна пряма і статистично значуща кореляція між результатами вмісту поліфенолів і значенням ТЕАС водно-спиртових екстрактів череди трави [149].

Додатково нами проведені дослідження антиоксидантної активності витягів череди трави з використанням більш широкого діапазона екстрагентів за допомогою неокупроїнового метода [150]. Для проведення випробування використовувалися різні розчинники: дистильована вода, метанол 20%, метанол 30%, метанол 40%, метанол 50%, метанол 60% і метанол 80%. До наважки подрібненої (3000) сировини порційно додавали відповідні розчинники і далі готували розчини як описано в Розділі 2. Паралельно готували розчину стандарту – Тролокса. Значення ТЕАС розраховували в ммол ТЕ/г (the mmol 'trolox equivalent' (TE) антиоксидантної активності у грамі ЛРС), а також в г/мл отриманих витягів у перерахунку на стандарт Тролоксу. Отримані результати наведено в табл. 4.10. Як видно з табл. 4.10, при переході від води як екстрагента до водно-спиртових сумішей, значення ТЕАС очікувано підвищуються, проте починаючи з 50% розчину метанолу значення ТЕАС витягів значуще не підвищуються і для витягів, отриманих за допомогою 50%: 60% і 80 % метанолу значення ТЕАС практично однакові. Таким чином, ці результати також узгоджуються з

тим, що підвищення концентрації спирту у водно-спиртовому екстрагенті для даного виду сировини не раціонально в тому числі і для збільшення антиоксидантної активності витягів.

Таблиця 4.10

**Результати визначення антиоксидантної активності витягів череди трави
неокупроїновим методом**

Екстрагент	TEAC, ммол TE/г*	TEAC, г/мл
Вода	0,280±0,014*	0,0701±0,028
Метанол 20%	0,306±0,012	0,0765±0,033
Метанол 30%	0,329±0,015	0,0825±0,037
Метанол 40%	0,376±0,015	0,0941±0,035
Метанол 50%	0,416±0,017	0,1041±0,040
Метанол 60%	0,417±0,016	0,1043±0,044
Метанол 80%	0,417±0,018	0,1044±0,041

Примітка. *середня величина ± SD

Нагідок квітки. Аналогічні випробування, наведені для череди трави, при вивченні динаміки вилучення БАР, проведені для сировини нагідок квіток. В табл. 4.11 наведено отримані при цьому результати. З табл. 4.11 видно, що полісахариди, флавоноїди, екстрактивні речовини максимально витягуються в 1-му перколяті із DSR 1:10. Аналізуючи динаміку вилучення речовин, можна зробити висновок, що близько 80% екстрактивних речовин потрапляють в перший перколят при всіх концентраціях екстрагента, від 11 до 16 % речовин – у 2-й перколят і від 4 до 7 % у третій. Практично аналогічні результати отримані при вивченні динаміки вилучення 2-х інших класів речовин – флавоноїдів і полісахаридів: флавоноїди витягуються в першому перколяті від 87 до 89 % в залежності від концентрації водно-спиртового екстрагента, полісахариди – не менше 87 - 91%.

В табл. 4.12 наведені результати визначення вмісту поліфенолів, флавоноїдів і полісахаридів в отриманих витягах, а також результати визначення їх антиоксидантної активності методом Райс-Еванса [147]. Результати виражаються як Тролокс-еквівалент антиоксидантної активності (TEAC) в мг в 1 г екстракту. Як видно із наведених

результатів екстрагент 40 % етанол є оптимальним з огляду кількості екстрагованих речовин. При переході від 25 % до 40 % етанолу значно збільшується кількість екстрагованих флавоноїдів (на 28 %), кількість полісахаридів та поліфенолів змінюється незначно (на 4 %), з іншого боку при переході від 40 % до 60 % значно (на 16 %) зменшується кількість екстрагованих полісахаридів.

Таблиця 4.11

**Результати визначення вмісту БАР при вивченні динаміки їх екстрагування з
нагідок квіток**

DSR	Вміст, у %*								
	Флавоноїди			Полісахариди			Екстрактивні речовини		
	25 %	40 %	60%	25 %	40 %	60 %	25 %	40 %	60 %
	0,08 (87 %)	0,245 (89 %)	0,25 (88%)	3,97 (91 %)	3,5 (87 %)	2,25 (90 %)	30,46 (85%)	28,6 (79 %)	29,8 (78 %)
1:10	0,08 (87 %)	0,245 (89 %)	0,25 (88%)	3,97 (91 %)	3,5 (87 %)	2,25 (90 %)	30,46 (85%)	28,6 (79 %)	29,8 (78 %)
1:15	0,01 (11 %)	0,02 (7%)	0,025 (9 %)	0,37 (8 %)	0,47 (12 %)	0,24 (9 %)	3,84 (11%)	6,09 (16 %)	6,07 (15 %)
1:20	0,002 (2 %)	0,01 (4 %)	0,01 (3 %)	0,03 (1 %)	0,04 (1 %)	0,01 (1 %)	1,34 (4%)	1,94 (5 %)	2,71 (7 %)
Σ	0,092	0,275	0,285	4,37	4,01	2,50	35,64	36,63	38,58

Примітка. * в перерахунку на сировину, в дужках – відносні % вмісту окремих БАР по відношенню один до одного в різних екстрагентах.

Таблиця 4.12

**Результати визначення вмісту БАР в різних водно-спиртових екстрактах нагідок
квіток та їх антиоксидантна активність**

Екстракти нагідок квіток (1:10)	Вміст, у %*			ТЕАС (мг/г)
	Поліфенолів	Флавоноїдів	Полісахаридів	
25 % етанол	0,49 (30 %)	0,08 (14 %)	3,97 (41 %)	1,266 (31 %)
40 % етанол	0,57 (34 %)	0,24 (42 %)	3,50 (37 %)	1,327 (32 %)
60 % етанол	0,58 (36 %)	0,25 (44 %)	2,25 (21 %)	1,501 (37 %)

Примітка. * в перерахунку на сировину, в дужках – відносні % вмісту окремих БАР по відношенню один до одного в різних екстрагентах.

Відносно антиоксидантної активності отриманих екстрактів, спостерігається пряма кореляція між результатами вмісту поліфенолів та флавоноїдів (більш значима для поліфенолів, ніж для флавоноїдів) та зворотна кореляція – між результатами вмісту

полісахаридів та значенням ТЕАС. В результаті дослідження процесу екстрагування БАР з сировини нагідок квіток з точки зору збалансованої екстракції флавоноїдів, полісахаридів і поліфенолів оптимальним є: співвідношення сировина/екстрагент – 1:20, екстрагент – 40% етанол. Встановлено пряму кореляцію між результатами вмісту поліфенолів та флавоноїдів та значенням ТЕАС водно-спиртових витягів нагідок та зворотну кореляцію – між результатами вмісту полісахаридів та значенням ТЕАС [151].

Глоду листя та квітки. Одержані аналогічно екстрактам череди трави та нагідок квіток екстракти глоду листя та квіток аналізували на вміст флавоноїдів і полісахаридів, а також екстрактивних речовин. Отримані результати наведені в табл.4.13. З наведених даних видно, що полісахариди, флавоноїди, екстрактивні речовини максимально витягуються в 1-му перколяті з DSR 1:10. Близько 84-90% екстрактивних речовин потрапляють в 1-й перколят при всіх концентраціях екстрагенту, від 7 до 11% речовин - у 2-й перколят і від 3 до 6% в третій. Флавоноїди витягуються в першому перколяті від 84 до 89% в залежності від концентрації водно-спиртового екстрагента, полісахариди – не менше 96-97 %. Таким чином, в 1-й перколят екстрагуються не менше 84 % всіх аналізованих БАР.

Таблиця 4.13

Результати визначення вмісту БАР глоду при вивченні динаміки їх вилучення різними водно-спиртовими сумішами

DSR	Вміст, у %*								
	Флавоноїди			Полісахариди			Екстрактивні речовини		
	25 %	40 %	60%	25 %	40 %	60 %	25 %	40 %	60 %
1:10	0,64 (84 %)	1,06 (89 %)	1,46 (86%)	3,21 (97 %)	2,46 (97 %)	1,63 (96 %)	28,7 (86%)	31,0 (90 %)	31,9 (84 %)
1:15	0,10 (13 %)	0,09 (8%)	0,19 (11%)	0,10 (3 %)	0,06 (2 %)	0,05 (3 %)	3,56 (11%)	2,44 (7 %)	3,98 (10 %)
1:20	0,02 (3 %)	0,04 (3 %)	0,05 (3 %)	0,01 (0%)	0,01 (0,4%)	0,01 (0,6 %)	1,24 (3%)	0,92 (3 %)	2,14 (6 %)
Σ	0,76	1,19	1,70	3,32	2,53	1,69	33,50	34,56	38,02

Примітка. * в перерахунку на сировину, в дужках – відносні % вмісту окремих БАР по відношенню один до одного в різних екстрагентах

В табл. 4.14 наведені результати визначення вмісту поліфенолів, флавоноїдів і полісахаридів в отриманих екстрактах, а також результати визначення їх антиоксидантної активності. Як видно із наведених результатів 40 % етанол є оптимальним екстрагентом з огляду кількості екстрагованих речовин. При переході від 25 % до 40 % етанолу збільшується як кількість екстрагованих флавоноїдів (на 13 %) так і кількість поліфенолів (на 9 %), з іншого боку при переході від 40 % до 60 % значно (на 12 %) зменшується кількість екстрагованих полісахаридів.

Таблиця 4.14

Результати визначення вмісту БАР в різних водно - спиртових екстрактах глоду та їх антиоксидантної активності

Екстракти глоду листя та квіток DSR 1:10	Вміст, %*			ТЕАС (мг/г)
	Поліфеноли	Флавоноїди	Полісахариди	
25 % етанол	1,06 (26%)	0,64 (20%)	3,21 (44%)	2,42 (25%)
40 % етанол	1,45 (35%)	1,06 (33%)	2,46 (34%)	3,19 (33%)
60 % етанол	1,62 (40%)	1,46 (47%)	1,63 (22%)	3,95 (41%)

Примітка. * в перерахунку на сировину, в дужках – відносні % вмісту окремих БАР по відношенню один до одного в різних екстрагентах.

Відносно антиоксидантної активності отриманих екстрактів, спостерігається пряма кореляція між результатами вмісту поліфенолів та флавоноїдів (більш значима для поліфенолів, ніж для флавоноїдів) та зворотна кореляція – між результатами вмісту полісахаридів та значенням ТЕАС [152].

Таким чином, в результаті дослідження процесу екстрагування різних фармакологічно активних класів БАР, а саме поліфенолів, флавоноїдів, полісахаридів із всіх 3-х досліджених видів ЛРС, які є складовими майбутнього комбінованого ЛРП, з'ясовано що оптимальним співвідношенням для всіх видів ЛРС є співвідношення сировина/екстрагент 1:20 і 40% етанол в якості екстрагенту є оптимальним. Встановлено пряму кореляцію між результатами вмісту поліфенолів та флавоноїдів та значенням ТЕАС водно-спиртових витягів для всіх видів ЛРС.

4.2.3 Технологія одержання комбінованого рослинного засобу в різних лікарських формах

Порошок подрібненої сировини для виробництва рослинного чаю або рослинного збору. У результаті проведеного попереднього дизайну рослинного засобу, а також відпрацювання різних технологічних етапів його розробки розроблена технологія одержання комбінованого рослинного засобу і відпрацьована в лабораторних умовах, яка складається з наступних етапів:

На терезах в окремій тарі відважують ЛРС у такому співвідношенні компонентів у перерахунку на вихідну сировину, мас.% *:

Череди трава	60
Нагідок квітки	30
Глоду листя та квітки	10

*З урахуванням втрат 2-2,6%.

Наважку сировини подрібнюють, просіюють крізь сито 3000 (ДФУ, 2.9.12) у паперовий мішок. Частки подрібненої сировини більше за 3000 повертають на повторне подрібнення. Отриманий порошок подрібненої сировини можна використовувати для виробництва рослинного чаю у пакетах для одноразового використання («Асенсефіт чай»), рослинного збору (чаю “in bulk”) у картонних коробках.

Рідкий екстракт DER 1:1. У екстрактор завантажують відважену і подрібнену суміш ЛРС, заливають 40% етанолом у співвідношенні сировина:екстрагент 1:6, настоюють 12 годин, збирають витяг в збірник у кількості, що відповідає співвідношенню сировина:витяг 1:4. Екстракцію проводять ще трьома порціями екстрагенту у кількості, що відповідає співвідношенню сировина:екстрагент 1:4, а останній 5-й раз у кількості, що відповідає співвідношенню сировина:екстрагент 1:2 при настоюванні 12 годин кожного разу. Тобто всього екстрагенту використано у кількості, що відповідає співвідношенню сировина:екстрагент 1:20 (DSR). Витяги збирають в збірник у кількості, що відповідає співвідношенню сировина:готовий

продукт 1:18. Залишок витягу зі шроту видаляють самопливом або під тиском за допомогою води (стадія рекуперації екстрагенту) і отримують додатково витяг у кількості, що відповідає співвідношенню сировина:витяг 1:20. Об'єднаний витяг відстоюють 2 доби за температури 8 °C і фільтрують від можливих домішок. Водно-спиртовий витяг (у співвідношенні сировина:готовий продукт 1:20) поміщають у реактор та видаляють екстрагент шляхом упарювання за температури 60-80 °C за залишкового тиску (під вакуумом, за зниженим тиском) до співвідношення сировина:рідкий екстракт 1:1, що є самостійним ЛРП або його використовують для виробництва густого екстракту, сухого екстракту, таблеток, капсул, гранул.

Густий екстракт DER 2,8-4:1. Одержаний рідкий екстракт (DER 1:1) упарюють за температури 60-80 °C за залишкового тиску (під вакуумом, за зниженим тиском) до співвідношення сировина:густий екстракт 1:0,25-0,35 або до співвідношення DER 2,8-4:1 (згідно ДФУ співвідношення кількості рослинної сировини, використаної у виробництві екстракту до кількості отриманого натурального екстракту), який використовують для виробництва сухого екстракту, таблеток, капсул, гранул, суспензії або сиропу.

Сухий екстракт. Одержаний густий екстракт (DER 2,8-4:1) упарюють за температури 60-80 °C за залишкового тиску (під вакуумом, за зниженим тиском) до остаточної кількості вологи не більше 5% і до співвідношення сировина:сухий екстракт DER 4-5,5:1, який використовують для виробництва таблеток, капсул, гранул, суспензії або сиропу (Асенсефіт екстракт сухий»).

Таким чином, розроблений комбінований засіб можливо застосовувати для виробництва рослинного чаю у пакетах для одноразового використання, рослинного збору (чаю “in bulk”) у картонних коробках, у формі рідкого екстракту або густого екстракту, або сухого екстракту, або таблеток, або капсул, або гранул, або суспензії, або сиропу. Випуск препарату у формі гранул (саше тощо), суспензії або сиропу для перорального застосування робить його застосування привабливим і зручним для пацієнтів, у яких через ті або інші причини прийом таблеток, капсул утруднений. Але

при цьому виникають труднощі технологічного порядку, що може призвести до значного дорожчання одиниці продукції. Тому для досягнення необхідного ефекту нами запропоновано застосування засобу, що розробляється для різних груп пацієнтів [153, 154].

Дозована форма комбінованого рослинного засобу

До одержаного густого екстракту (DER 2,8-4:1) додають 50% від загальної маси екстракту мікрокристалічної целюлози (МКЦ-200, с. D105190377, виробник Індія), ретельно перемішують і видаляють вологу до остаточної її кількості не більше 5% (капсульна маса). Зразки капсул були отримані на ручній капсульній машинці (виробництво КНР). Капсульну масу поміщали у тверду желатинову капсулу, розміру №0, циліндричної форми з кришечкою синього кольору та корпусом білого кольору («Асенсефіт капсули»).

Фармако-технологічні дослідження капсульної маси

Одним з найважливіших критеріїв вибору допоміжних речовин при розробці твердих желатинових капсул, які надають фармако-технологічні властивості лікарській формі – це фізико-хімічні властивості субстанції. Значення втрати в масі при висушуванні отриманої капсульної маси становила $4.89 \pm 0.24\%$. Після додавання МКЦ у вибраному співвідношенні рослинний екстракт став менш гігроскопічним, що забезпечувало задовільну текучість капсульної маси та її незмінність в процесі зберігання. В табл. 4.15 наведено результати дослідження технологічних характеристик отриманої капсульної маси.

Таблиця 4.15

Результати дослідження технологічних характеристик капсульної маси

Показники	Вимоги ДФУ 2.9.16, 2.9.34, 2.9.36	Отриманий результат n=3
Насипна густина, г/см ³	-	$0,571 \pm 0,015$
Густина після усадки, г/см ³	-	$0,714 \pm 0,022$
Ступінь стисливості (Індекс Карра, %)	16–20 відпов. текучості «задовільна»	$20 \pm 0,35$
Коефіцієнт Гауснера	1,19–1,25 відпов. текучості «задовільна»	$1,25 \pm 0,03$
Текучість г/с	-	$11,111 \pm 0,004$

Фракційний склад капсульної маси комбінованого рослинного засобу методом лазерної дифракції

Дослідження фракційного складу субстанцій-порошків, які є діючими речовинами нового комбінованого лікарського засобу антиалергічної дії у формі капсул, мають першорядне значення під час розробки технології отримання капсульної маси і тому є актуальними [155]. На рис. 4.3 наведено мікрофотографію капсульної маси, одержану в описаних в Розділі 2 умовах, на рис. 4.4 – криву розподілу частинок за розміром в субстанції МКЦ і в капсульній масі.

В табл. 4.16 та 4.17 наведено параметри розподілу частинок в різних фракціях для субстанції МКЦ і для капсульної маси, відповідно.

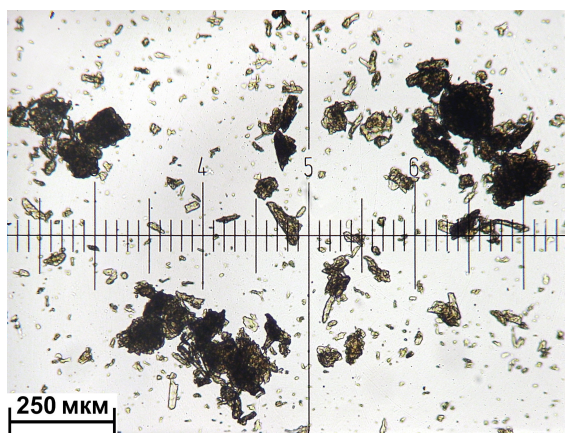


Рис. 4.3 Мікрофотографія капсульної маси у вазеліновому маслі; збільшення $\times 60$

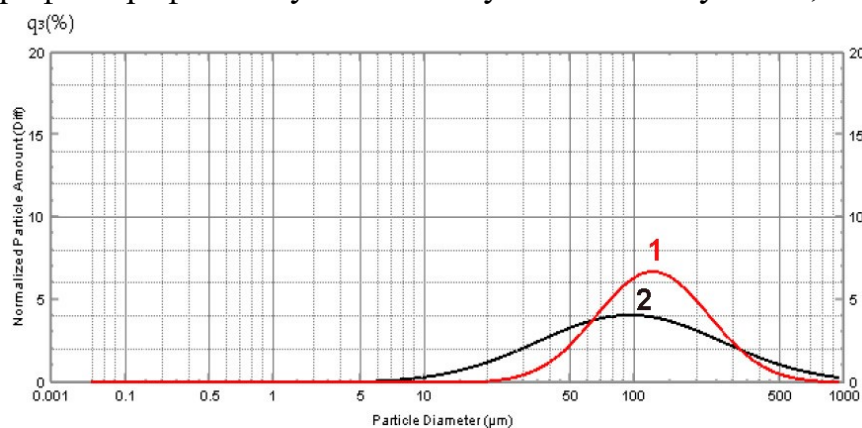


Рис. 4.4 Розподіл частинок за розмірами в субстанції МКЦ (1) і КЗ (2)

Згідно із вимогами ДФУ 2.9.31, важливими для оцінки є результати фракцій d_{10} , d_{50} та d_{90} . Аналіз рис. 4.4 та даних табл. 4.16, 4.17 засвідчив, що незважаючи на більш

широкий розподіл частинок для капсульної маси порівняно з «чистою» МКЦ, у разі фракційного аналізу видно, що для МКЦ фракція d_{10} має середній розмір частинок – 54 мкм, в той час для капсульної маси фракція d_{10} має середній розмір частинок – 28 мкм, що може вплинути на покращення плинності субстанції. Крім того, середній медіанний розмір частинок (d_{50}) субстанції МКЦ становить 119 мкм, а середній медіанний розмір частинок капсульної маси з МКЦ становить 99.6 мкм, що також є позитивним результатом, оскільки узгоджується з дослідженнями [156], у яких рекомендований середній розмір частинок не має перевищувати 100 мкм.

Таблиця 4.16

Максимальний розмір частинок (d) МКЦ, в різних фракціях, що містять від 10 % до 90 % частинок від їх загальної кількості в зразку субстанції

n	d (мкм) у фракціях, що складають частку від загальної кількості частинок:								
	10 %	20 %	30 %	40 %	50 %	60 %	70 %	80 %	90 %
Середнє (n=6)	53,918	70,639	86,000	101,806	118,755	138,954	163,817	198,499	260,331

Таблиця 4.17

Максимальний розмір частинок (d) капсульної маси в різних фракціях, що містять від 10 % до 90 % частинок від їх загальної кількості в зразку субстанції

n	d (мкм) у фракціях, що складають частку від загальної кількості частинок:								
	10 %	20 %	30 %	40 %	50 %	60 %	70 %	80 %	90 %
Середнє (n=6)	27,986	43,288	59,292	77,579	99,645	127,969	167,442	229,452	354,911

Дослідження показало, що випробовувана субстанція – капсульна маса має задовільний фракційний склад, що дає змогу її використання у якості маси для заповнення твердої дозованої форми – капсули [157].

4.3. Фітохімічні дослідження комбінованого рослинного засобу

Враховуючи що ЛРЗ, що розробляється, може бути у вигляді подрібненого збору ЛРС для виготовлення таблетованих і капсульних форм, збору лікарських рослин у пачках (пакетах, фільтр пакетах), екстракту сухого для виготовлення таблетованих і капсульних форм, попередні фітохімічні дослідження проводили для різних об'єктів.

Вивчення складу водних витягів комбінованого рослинного збору

У народній та офіциналній медицині при різних захворювань широко використовуються лікарські рослинні збори, що пов'язано з простотою їх виробництва, наявністю діючих речовин у вихідній ЛРС, доступністю сировинної бази тощо. Відповідно до ДФУ збір є сумішшю кількох видів подрібненої, рідше цілої ЛРС з морфологічними ознаками, характерними для компонентів, що входять до складу зборів. Збори для орального застосування аналогічні лікарським рослинним чаям, які можуть бути розфасовані у фільтр-пакети. Дана лікарська форма зручна у повсякденному використанні, має чітке дозування, розділена на велику кількість прийомів.

Вода як екстрагент, є зручною при екстемпоральному приготуванні рослинного засобу і при правильному розрахунку дозування можливо виходити на лікувальній або профілактичний ефект. Наприклад, якщо доза, сухого екстракту складає 100 мг (у таблетці, капсулі, гранулах) де міститься 3 мг (3%) флавоноїдів, 5 мг (5%) поліфенолів, то настій треба готувати наступним чином: 1,7 г збору сировини (1 пакет для одноразового використання) заливають 100 мл гарячої води і настоюють впродовж 15 хв. Цей витяг буде містити відповідно 3 мг флавоноїдів, 5 мг поліфенолів.

1,7 г порошку подрібненої сировини, виготовленого відповідно до Розд. 4.2. поміщали у фільтр-пакети (Асенсефіт, чай). 1 фільтр – пакет заливали 100 мл гарячої води, настоювали 15 хв та після охолодження водні витяги аналізували на вміст екстрактивних речовин, полісахаридів, флавоноїдів і поліфенолів. Для простежуваності результатів паралельно такі ж випробування робили з окремими наважками

подрібненої (3000) сировини - череди трави, нагідок квіток і глоду листя та квіток, які використовувались для одержання збору. В табл. 4.20 наведено отримані результати.

Таблиця 4.18

Вміст БАР у комбінованому рослинному зборі та його компонентах, у %

Об'єкт	Вміст, у %			
	Екстрактивні речовини	Флавоноїди	Поліфеноли	Полісахариди
Череди трава	25,0 $\pm$ 0,5	0,16 $\pm$ 0,02	0,32 $\pm$ 0,024	4,5 $\pm$ 0,1
Нагідок квітки	38,0 $\pm$ 0,8	0,1 $\pm$ 0,02	0,45 $\pm$ 0,014	5,5 $\pm$ 0,15
Глоду листя та квітки	26,0 $\pm$ 0,5	0,6 $\pm$ 0,08	1,10 $\pm$ 0,034	4,0 $\pm$ 0,12
Комбінований рослинний збір	29,0 $\pm$ 0,6 (101,0 $\pm$ 1 %)*	0,18 $\pm$ 0,12 або 3 мг в 1 фільтр пакеті (97 $\pm$ 2 %)*	0,32 $\pm$ 0,03 або 5,4 мг в 1 фільтр пакеті (95 $\pm$ 2 %)*	4,5 $\pm$ 0,1 або 76 мг в 1 фільтр пакеті (96 $\pm$ 3 %)*

Примітка. * % від теоретичного з врахуванням частки кожної із ЛРС у зборі

Отримані результати комплексного дослідження водних екстрактів вихідних компонентів та комбінованого рослинного збору на вміст екстрактивних речовин, полісахаридів, флавоноїдів та поліфенольних сполук можна використовувати для стандартизації запропонованого комбінованого рослинного засобу [158].

Фітохімічний аналіз основних БАР сухих екстрактів череди, нагідок, глоду та комбінованого екстракту

За технологією, описаною в розд. 4.2.3 були отримані 3 сухі екстракти (череди трави, календули квіток і глоду листя та квіток) і 1 комбінований екстракт у співвідношенні вихідної сировини череди трави-нагідок квітки-глоду листя та квітки (6:3:1). Для детального аналізу вмісту флавоноїдних сполук, гідроксикоричних кислот зразки були проаналізовані методом ВЕРХ в умовах, описаних в розд.2. На рис. 4.5 наведено вид хроматограм, отриманих при цьому, а в табл. А.4 Додатку А – результати ВЕРХ для кожного зразка. Компоненти ідентифікували шляхом порівняння їхнього часу утримування та УФ-спектрів із аналогічними стандартами в ідентичних умовах аналізу та опублікованих даних УФ-спектрів [159, 160].

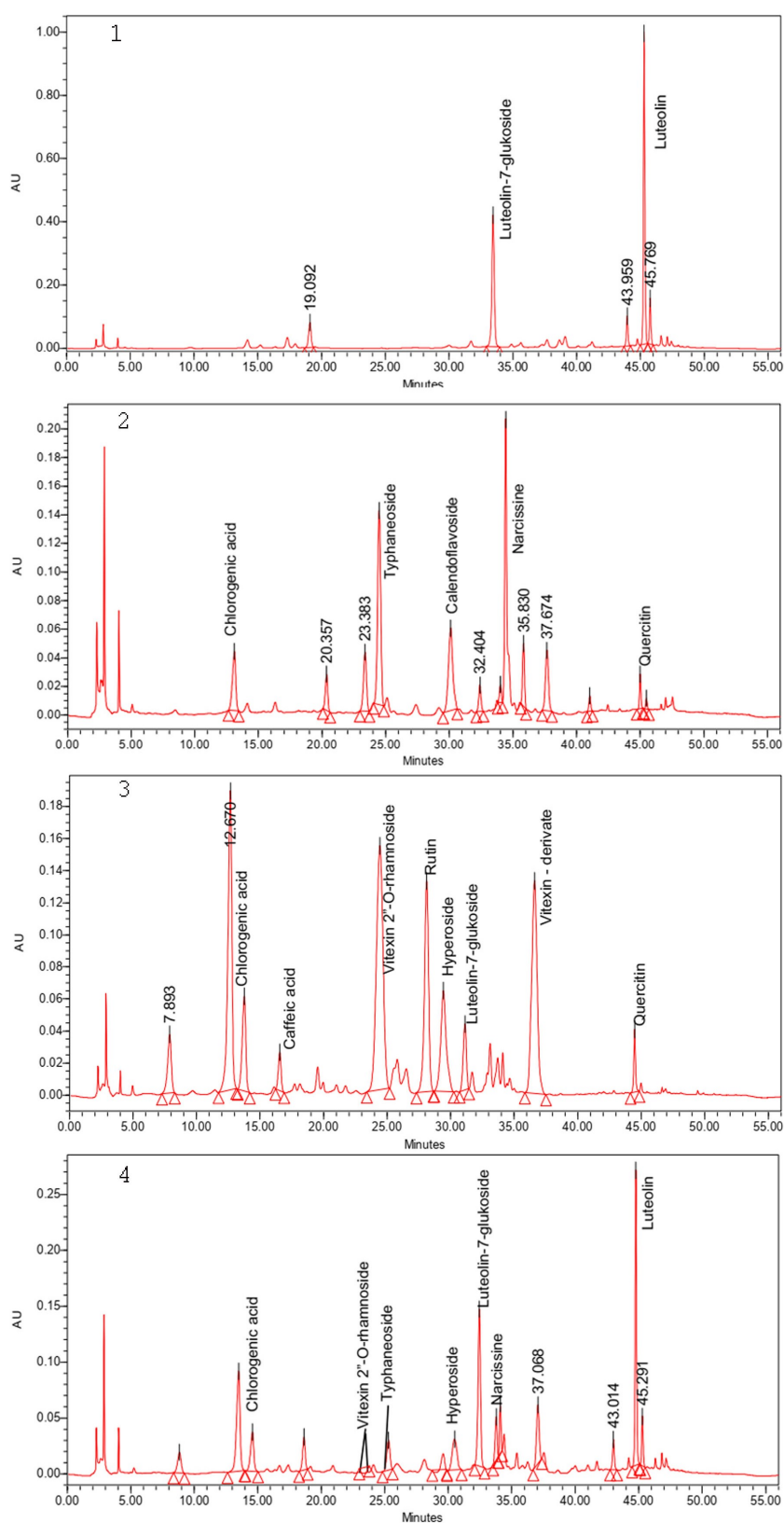


Рис. 4.5. Хроматографічний профіль зразків: 1 – череди сухий екстракт, 2 – нагідок сухий екстракт, 3 – глоду сухий екстракт, 4 – комбінований екстракт

Аналізуючи дані табл. А.4, встановлено по-перше, що череди екстракт, який є основним компонентом комбінованого засобу містить в основному флавоноїди, а саме лютеолін і лютеолін-7 глюкозид (більше 90% всіх виявлених піків), що відповідає концентрації 1,95 % в перерахунку на сухий екстракт. В календулі екстракті переважно ідентифіковані похідні ізо-рамнетину (майже 70%), що відповідає концентрації 1,5 %. Для глоду екстракту з'ясовано, що він містить в значних кількостях гідроксикоричні кислоти (2,24 % в перерахунку на хлорогенову кислоту і сухий екстракт), а також похідні вітексину (майже 42 % всіх виявлених піків), що співпадає з літературними даними [160]. Загальний вміст флавоноїдних сполук в екстракті складав 3.3 %. Що стосується комбінованого екстракту, то на його хроматограмі ідентифіковані усі основні компоненти, які виявлені для окремих екстрактів. Вміст гідроксикоричних кислот становив 1 %, а вміст флавоноїдних сполук – 1.93 %, що відповідає теоретичному вмісту (98 %) з урахуванням співвідношення ЛРС в комбінованому екстракті.

Враховуючи, що використана для отримання екстрактів ЛРС містить в значних кількостях терпеноїдні сполуки, які також вносять внесок в фармакологічну активність розробляемого комбінованого засобу, додатково були проведені випробування з визначення вмісту терпеноїдів денситометричним методом. Використовували методику наведену в [161].

На рис. 4.5 наведено вид ВЕТШХ-хроматограми, отриманої в умовах методики визначення вмісту терпеноїдних сполук в перерахунку на олеанолову кислоту, на рис. 4.6 наведено вид отриманої денситограми для розчину календули екстракту, розчину СЗ олеанолової кислоти та розчину комбінованого екстракту.

На рис. 4.7 наведено графік залежності концентрації олеанолової кислоти, нанесеної на хроматографічну пластинку від площі піка олеанолової кислоти на денситограмі.

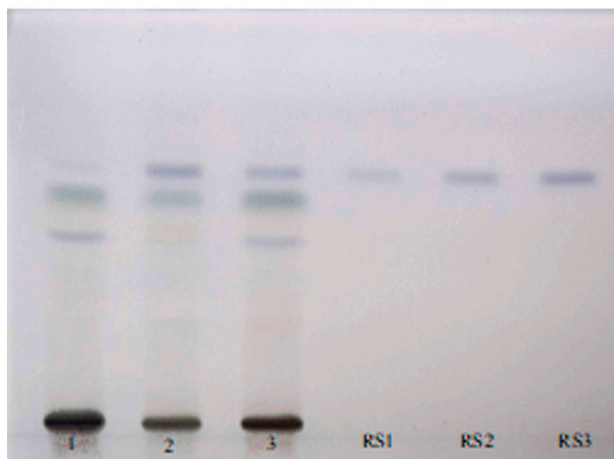


Рис.4.5 Хроматограма, одержана в умовах методики визначення терпеноїдів методом денситометрії: 1– розчин глоду екстракту, 2 – розчин нагідок екстракту, 3 – розчин комбінованого екстракту, RS1-RS3 – розчини олеанолової кислоти

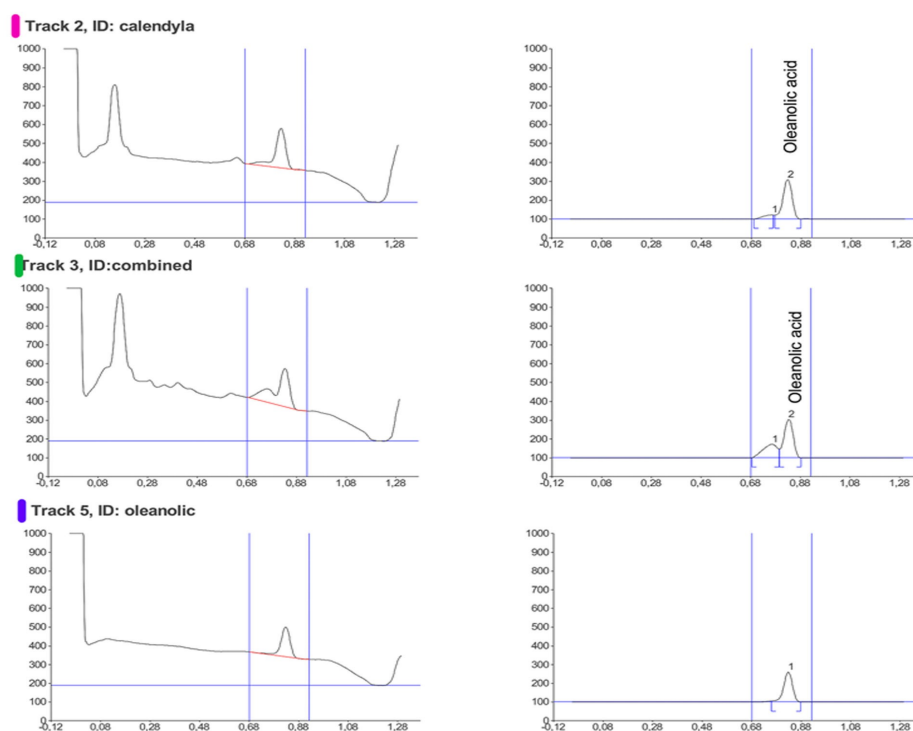


Рис. 4.6 Денситограми, отримані при визначенні вмісту терпеноїдів у перерахунку на олеанолову кислоту: розчину календули екстракту, розчину комбінованого екстракту та розчину СЗ олеанолової кислоти

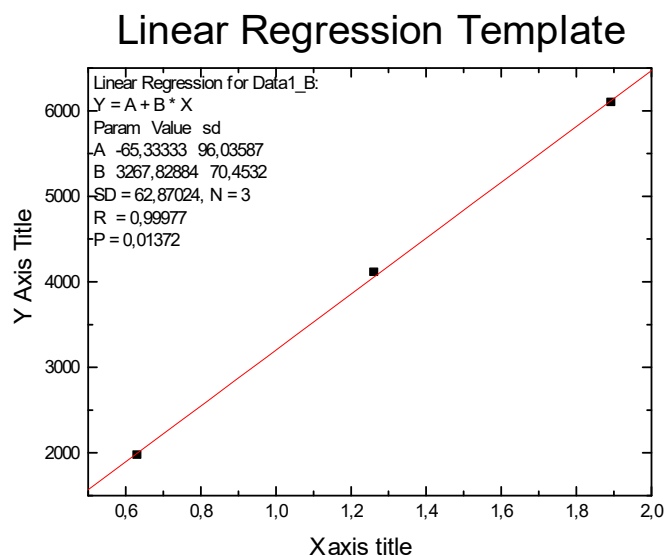


Рис. 4.7 Графік залежності концентрації олеанолової кислоти, нанесеної на хроматографічну пластинку від площі піка олеанолової кислоти на денситограмі

При хроматографуванні отриманих в результаті кислотного гідролізу розчинів випробовуваних екстрактів з'ясовано, що для екстрактів череди трави та глоду листя та квіток умови визначення не дозволяють проводити кількісне визначення із-за недостатньої концентрації олеанолової кислоти в зразках, а підвищення концентрації, що наносять на пластинку не приводить до бажаного результату із-за отриманого при цьому перевантаження. Отже, подальше кількісне визначення вмісту олеанолової кислоти проводили в зразках календули екстракту та комбінованому екстракті, результати наведено в табл.4.19. Таким чином, в комбінованому екстракті знайдено 0,44 % терпеноїдів у перерахунку на олеанолову кислоту, що відповідало 105 % від теоретичного вмісту з урахуванням співвідношення календули в комбінованому екстракті.

Враховуючи ВЕРХ-результати, які продемонстрували наявність флавоноїдних сполук в усіх об'єктах в достатній кількості, причому в комбінованому екстракті (як і в екстракті череди) домінантними були похідні лютеоліну, додатково були проведені визначення вмісту флавоноїдів і поліфенолів спектрофотометричним методом. В табл.

4.20 наведено загальні результати визначення вмісту різних БАР в усіх випробовуваних екстрактах.

Таблиця 4.19

Вміст терпеноїдів в перерахунку на олеанолову кислоту визначений методом денситометрії

n	Вміст терпеноїдів у перерахунку на олеанолову кислоту, у %	
	Комбінований екстракт	Нагідок екстракт
1	0,46	1,10
2	0,46	0,91
3	0,37	1,14
4	0,44	0,99
5	0,46	1,05
Середнє	0,438	1,04
SD	0,038987	0,089166
RSD	8,901182	8,58598

Таблиця 4.20

Результати визначення вмісту БАР сухих екстрактів череди, нагідок, глоду і комбінованого екстракту

Екстракт	Вміст, у %		
	Флавоноїди	Поліфеноли	Терпеноїди
Череди трави	3,99 ± 0,03	5,51 ± 0,05	-
Нагідок квіток	2,12 ± 0,08	3,42 ± 0,09	1,04 ± 0,09
Глоду листя та квіток	5,43 ± 0,12	7,22 ± 0,11	-
Комбінований екстракт	3,13 ± 0,09	5,03 ± 0,10	0,44 ± 0,04

В результаті хроматографічного вивчення профілю флавоноїдних і гідроксикоричних сполук, а також визначення вмісту терпеноїдних сполук в аналізованих екстрактах був зроблений висновок о доцільності вибору суми флавоноїдів, поліфенолів, терпеноїдних сполук в якості об'єктів стандартизації комбінованого рослинного засобу [162].

Висновки до Розділу 4

1 Отримані результати фітохімічного і фітофармакологічного дизайну, а також дослідження кореляційної залежності «дія-сума БАР» за допомогою розрахунку

коефіцієнта рангової кореляції Спірмена, продемонстрували перспективність комбінованого ЛРП, що розробляється, в комплексній терапії алергічних захворювань, що супроводжуються зниженням резистентності організму та імуностатусу. Для вибраних комбінацій ЛРС, які входять до складу передбачуваного комбінованого ЛРП виявлена сильна, пряма і статистично значуща кореляційна залежність між вмістом оксикоричних кислот, поліфенолів, тритерпенів, білків /амінокислот, полісахаридів і такими фармакологічними діями, як капілярозміцнювальна, протизапальна, імуностимулююча, жовчогінна, гепатопротекторна, що поліпшує обмін речовин, сечогінна, гіпотензивна, седативна, загальнозміцнювальна, десенсибілізуюча, протисвербіжна, репаративна і потогінна.

2 Розроблено технологічні підходи щодо екстракції ч. трироздільної трави, нагідок квіток та глоду листя та квіток і проведено відпрацювання критичних технологічних параметрів екстракції обраних рослин в лабораторних умовах.

3 В результаті дослідження процесу екстрагування різних фармакологічно активних класів БАР, а саме поліфенолів, флавоноїдів, полісахаридів із всіх 3-х досліджених видів ЛРС, які є складовими майбутнього комбінованого ЛРП, з'ясовано що оптимальним співвідношенням для всіх видів ЛРС є співвідношення сировина/екстрагент 1:20 і 40% етанол в якості екстрагенту є оптимальним з точки зору збалансованої екстракції флавоноїдів, полісахаридів і поліфенолів. Встановлено пряму кореляцію між результатами вмісту поліфенолів та флавоноїдів та значенням ТЕАС водно-спиртових витягів для всіх видів ЛРС.

4 В результаті дослідження різних технологічних етапів розроблена і відпрацьована в лабораторних умовах технологія одержання комбінованого рослинного засобу, яка передбачає одержання засобу в різних формах, а саме у формі подрібненої сировини (для виробництва рослинного чаю у пакетах), рідкого екстракту, густого екстракту, сухого екстракту, а також в дозованій формі у вигляді капсул. Для капсульної маси комбінованого рослинного засобу вивчені фармако-технологічні характеристики, зокрема фракційний склад методом лазерної дифракції.

5 Проведено фітохімічний аналіз комбінованого рослинного збору, що передбачається в якості рослинного чаю у фільтр-пакетах, в результаті встановлено, що 1 фільтр-пакет містить $3 \pm 0,3$ мг флавоноїдів, $5,4 \pm 0,5$ мг поліфенолів, $76 \pm 6,5$ мг полісахаридів. В результаті детального фітохімічного аналізу сухого комбінованого екстракту та окремих його складових з використанням методів ВЕРХ, СФ, денситометрії з'ясовано що він містить $3,13 \pm 0,09$ % флавоноїдів в перерахунку на лютеолін-7-глюкозид, $5,03 \pm 0,10$ % поліфенолів в перерахунку на пірогалол і $0,44 \pm 0,04$ % терпеноїдів у перерахунку на олеанолову кислоту, що дало змогу зробити висновок про доцільність стандартизації комбінованого рослинного засобу за вмістом даних БАР.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Kotov S., Kotova E., Bezruk I., Gontova T., Kotov A. A Research of the component content of hawthorn leaves/flowers alcoholic extracts and their antioxidant activity. Danish Scientific Journal. 2020. №38 (1). С. 55-60.

2. Kotov S.A, Kotova E.E., Bezruk I. V., Gontova T.N., Kotov A.G. Study of the dynamics extraction of biologically active substances from the bur-marigold herb and antioxidant activity of the obtained extracts. *EUREKA: Health Sciences*. 2020. № 6. С. 95-101.

3. Котов С.А., Котова Е.Е., Безрук І. В., Гонтова Т.М., Котов А.Г. Визначення вмісту біологічно активних речовин та антиоксидантної активності спиртових витягів нагідків лікарських. *Сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження*: матеріали наук.-практ. дистанційної між нар. конфер., 19-20 травня 2020 р., м. Івано-Франківськ. Івано-Франківськ: ІФНМУ, 2020. С. 164-166.

4. Котов С.А., Гонтова Т.М., Котов А.Г. Технологічні аспекти екстракції череди трави, нагідок квіток і глоду листя та квіток. *Planta+. Наука, практика та освіта*: матеріали Міжнар. наук.-практ. конф., м. Київ, 19 лют. 2021 р. Київ : Паливода А. В., 2021. С. 226–230.

5. Котов С. А., Гонтова Т. М., Котов А. Г.. Аспекти проектування комбінованого засобу поліфункціональної дії на основі лікарської рослинної сировини. *Фармацевтичний журнал*. 2021. Т. 76 (5). С. 57-67. doi.org/10.32352/0367-3057.5.21.06.

6. Котов С.А., Гонтова Т.М. Вивчення антиоксидантної активності череди трави неокупрайновим методом. *Topical issues of new medicines development: матеріали XXVIII міжнар. наук.-практ. Конф. Молодих вчених та студ., присвяч. 150-річчю з дня народження М.О. Валяшка*, м. Харків, 18-19 березня 2021 р. Харків: НФаУ, 2021 С. 77-79.

7. Kotov Semen. Study of the water extracts composition from the combined herbal tea with antiallergic activity. *Современная медицина и фармацевтика: новые подходы и актуальные исследования: материалы 75-ой междунар. научно-практ. конфер студентов-медиков и молодых учёных*. г. Самарканд, 18 мая 2021 г. *Журнал гепато-гастроэнтерологических исследований*. 2021. № 2 (1). С. 135–136.

8. Котов С.А., Котов А.Г., Гонтова Т.М., Кононенко Н.М., Чернявські Е.С., Рубан О.А. Спосіб одержання комбінованого рослинного засобу антиалергічної дії: пат. на корисну модель 149399 України: МПК А61К36/60, А61К127/00, А61К133/00. № u 2020 08228; заяв. 22.12.2020; опубл. 17.11.2021, Бюл. № 46.

9. Котов С. А., Котов А.Г., Гонтова Т.М., Кононенко Н.М., Чернявські Е.С., Рубан О.А. Фармацевтична композиція на основі лікарської рослинної сировини із антиалергічною дією. Пат. на винахід № 126141 України. № ua 2020 08229; Заяв. 22.12.2020; Опубл. 17.08.2022, Бюл. № 33.

10. Котов С.А., Гонтова Т.М. Фракційний склад капсульної маси комбінованого рослинного засобу антиалергічної дії методом лазерної дифракції. *Міждисциплінарні дослідження: гуманітарні та природничі науки* матеріали наук.-практич. конференції «» м. Одеса, 22-23 липня 2022 р.. – Одеса: Видавництво «Молодий вчений», 2022. – С. 106-110.

11. Kotov S., Gontova T., Kononenko N., Chernyavski E., Chikitkina V. Phytochemical analysis and anti-allergic activity of a combined herbal medicine based on bur-marigold, calendula and hawthorn. *Pharmacia*. 2022. 69 (1). P. 237-247.

РОЗДІЛ 5

СТАНДАРТИЗАЦІЯ ТА ВИВЧЕННЯ АНТИАЛЕРГІЧНОЇ ДІЇ КОМБІНОВАНОГО РОСЛИННОГО ЗАСОБУ

Наступним етапом фармацевтичної розробки ЛЗ була розробка методик контролю якості, що будуть уніфікованими для постадійного контролю якості виробництва будь якої лікарської форми.

Враховуючи що ЛЗ що розробляється може бути у виді екстракту сухого для виготовлення таблетованих і капсульних форм, подрібненого збору ЛРС для виготовлення таблетованих і капсульних форм, збору лікарських рослин у пачках (пакетах, фільтр пакетах), методики контролю якості розробляються з урахуванням конкретної лікарської форми.

5.1 Розробка методик контролю якості комбінованого рослинного засобу

5.1.1 Критерії стандартизації комбінованого рослинного збору

Вивчення можливості ідентифікації індивідуальних рослин в комбінованому рослинному зборі

Для введення в медичну практику нових лікарських засобів, в тому числі чаїв, необхідне проведення досліджень з фармацевтичної розробки, зокрема критеріїв ідентифікації зборів, які гарантують ефективність, безпеку, відтворюваність дії, і на основі отриманих результатів, проектів нормативної документації. Тому актуальною була розробка методів ідентифікації комбінованого рослинного збору (лікарського рослинного чаю в фільтр-пакетах) за характерними макро- і мікроскопічними ознаками, вивчення хроматографічного профілю вихідної сировини і порівняння її з профілем збору на предмет виявлення характерних зон за допомогою методу ТШХ.

Виконання роботи включало три етапи: на 1-му етапі проводився макроскопічний аналіз суміші лікарської рослинної сировини, на 2-му етапі -

мікроскопічний аналіз, а 3-му – проведення ТШХ аналізу вихідної сировини і передбачуваного збору з подальшим детектуванням характерних зон.

Всі види ідентифікації проводили згідно з уніфікованими методиками, що описані в методичних рекомендаціях [143], а також згідно монографій Державної Фармакопеї України (ДФУ) – «Череди трава^N» [122], «Глоду листя та квітки^N» [84], «Нагідок квітки^N» [84]. Макроскопічний аналіз проводили оглядом складових компонентів аналітичної проби збору візуально і за допомогою бінокулярного мікроскопа звертаючи увагу на структуру рослинної суміші, колір, запах. У зв'язку з тим, що розроблений збір є багатоконпонентним, було ідентифіковано компоненти збору за належністю до певної морфологічної групи. З кожної морфологічної групи виділяли окремі рослинні компоненти і визначали їх діагностичні ознаки, необхідні для встановлення автентичності.

При проведенні мікроскопічного аналізу, за допомогою світлового мікроскопа вивчали діагностично значимі ознаки окремих рослинних компонентів і збору. Ідентифікацію методом ТШХ здійснювали на пластинках зі шаром силікагелю 60 F₂₅₄ (Merck, Germany). В якості стандартів використовувалися наступні ФСЗ ДФУ: кофейна кислота, гіперозид, хлорогенова кислота, рутин, календулозиди.

При проведенні макроскопічного аналізу, виявлені такі діагностичні ознаки для кожного рослинного компоненту в зборі (рис. 5.1). Для компонентів збору діагностичними макроскопічними є наступні ознаки:

- 1) череди трава – плівчасті ланцетні приквітки; фрагменти плодів сім'янок з 2 або 3 остюками, вкритими щетинками, спрямованими донизу; частини листків буро-зеленого кольору;
- 2) нагідок квітки – трубчасті серединні квітки з п'ятизубчастим віночком жовтаво-коричневого кольору, фрагменти крайових квіток яскраво-жовтого кольору, фрагменти обгортки із лінійних сіро-зелених, загострених опушених листочків;

3) глоду листя і квітки – фрагменти пелюсток віночка квітки жовтувато-білого кольору; фрагменти листків зверху яскраво зеленого кольору, знизу світліші, деколи із восковою поволокою або сіро-зелені; фрагменти кори пагона коричневого кольору.

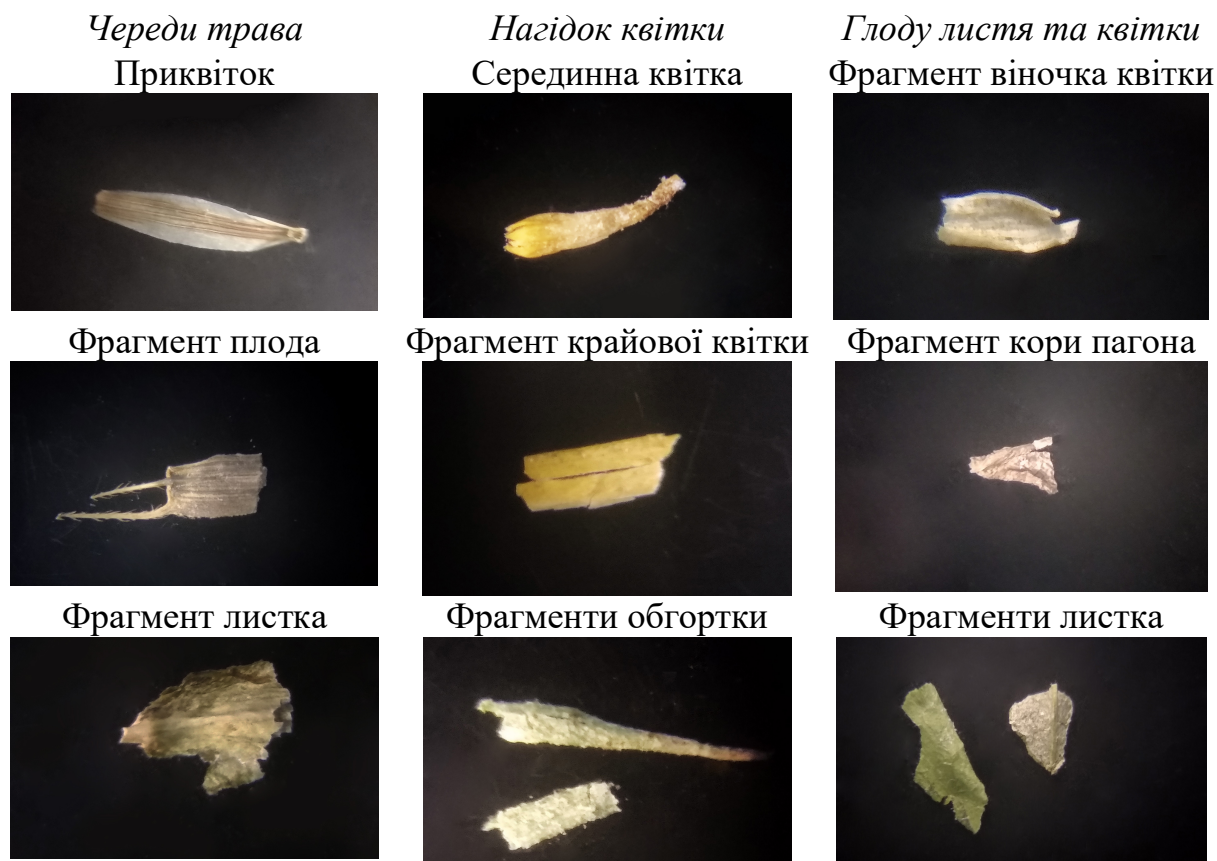


Рис 5.1 Діагностичні макроскопічні ознаки череди трави, нагідок квіток, глоду листя і квіток, виявлені в зборі

Для визначення діагностичних мікроскопічних ознак компонентів збору проведено попередній аналіз вимог ДФУ до сировини череди трава, нагідок квітки і глоду листя та квітки. В результаті аналізу виявлено наступне:

– клітини епідерми листка череди на обох поверхнях мають звивисті оболонки, нижня епідерма листків глоду також вкрита звивистостінними клітинами, а верхня епідерма листка глоду складається з багатокутних клітин з прямими потовщеними оболонками, таким чином, тип клітин епідерми листків є діагностичною ознакою сировини глоду в присутності сировини нагідок і череди;

– епідерма листочків обгортки нагідок складається з видовжених клітин з прямими потовщеними оболонками, як і епідерма стебла череди, тому ця ознака не може бути діагностичною для нагідок, але через клітини епідерми внутрішніх листочків обгортки череди видимі членисті секреторні ефіроолійні канали, що є діагностичною ознакою сировини череди в присутності суцвіття нагідок;

– тип продихового апарату не може бути діагностичною ознакою для даного збору, оскільки органи всіх компонентів збору мають аномоцитний тип продихового апарату;

– епідерма пелюсток квіток всіх компонентів збору складається з багатокутних клітини з округлими сосочкоподібними виростами, але тільки клітини віночка нагідок містять жовто-оранжеві хромопласти, тому ця ознака є діагностичною для нагідок в присутності череди і глоду;

– препарат порошку збору містить цілі або фрагментовані покривні волоски, які можуть бути діагностичною ознакою: однорядні багатоклітинні волоски череди і нагідок дуже схожі, але на відміну від нагідок череда має волоски з поздовжньою складчастою кутикулою, в той час нагідки мають специфічні дворядні багатоклітинні покривні волоски, які навіть у фрагментованому стані можуть бути діагностичною ознакою нагідок у присутності череди і глоду; сировина глоду містить одноклітинні товстостінні покривні волоски, які дозволяють діагностувати глід у присутності череди і нагідок;

– сировина нагідок має на відміну від інших компонентів однорядні багатоклітинні залозисті волоски з голівкою із 2 або 4 клітин;

– форма і характер екзини пилкових зерен в досліджуваному зборі є специфічною ознакою тільки у сировини глоду, оскільки пилок глоду має округло-трикутну форму і гладеньку або дрібнозернисту екзину, в той час як пилок нагідок і череди округлий і з шипуватою екзиною, що характерно для представників родини айстрових;

– діагностичною ознакою сировини череди є фрагменти тканин насіння, а саме гіподерма насінної шкірки з пігментованих темно-коричневих клітин й прилеглим нижнім шаром жовтуватих склереїд, яка не характерна для інших компонентів збору, оскільки для квіток глоду і нагідок не характерно дозрівання до стану плодів.

Таким чином, для компонентів досліджуваного збору виявлені наступні ознаки, які є діагностичними в присутності інших компонентів (рис. 5.2):

1) череди трава – епідерма листочків обгортки з видовжених прямокутних тонкостінних клітин і членистих секреторних каналів; цілі або фрагментовані багатоклітинні однорядні покривні волоски зі складчастою кутикулою; гіподерма насінної шкірки з пігментованих темно-коричневих клітин і прилеглим нижнім шаром жовтуватих склереїд;



Рис 5.2 Діагностичні мікроскопічні ознаки череди трави, нагідок квіток, глоду листя і квіток, виявлені в зборі

2) нагідок квітки – епідерма крайових або серединних квіток з видовжених клітин, вкритих складчастою кутикулою, із жовтими хромопластами; фрагменти багатоклітинних дворядних покривних волосків; фрагменти багатоклітинних залозистих волосків з голівкою із 2 або 4 клітин.

3) глоду листя і квітки – верхня епідерма листа з багатокутних клітин з потовщеними оболонками; одноклітинні покривні товстостінні волоски, округлі пилкові зерна з гладенькою або дрібнозернистою екзиною.

При проведенні випробування методом ТШХ в умовах методики національної монографії «Череди трава^N» для виявлення зон флавоноїдів і гідроксикоричних кислот (рис. 5.3), на хроматограмі рослинного чаю (№5) виявлені характерні зони, властиві череді, нагідкам і глоду (№1, №2 і №4 відповідно), а саме:

- 2 зеленуваті флуоресціюючі зони в нижній третині хроматограми (нагідки);
- жовта флуоресціююча зона на рівні зони рутину (нагідки, глід);
- інтенсивна жовта флуоресціююча зона в середній частині хроматограми (череда і глід);
- 2 коричнювато-червоні зони, розташовані вище та нижче за неї (череда);
- 2 інтенсивні блакитні флуоресціюючі зони у верхній третині хроматограми (череда, нагідки, глід);
- 2 червоні флуоресціюючі зони, розташовані близько до фронту розчинника (череда, глід).

Враховуючи, що в національній монографії «Нагідок квітки^N» сировину додатково ідентифікують за наявністю календулозидів, додатково провели випробування для ідентифікації цих сполук в чаї в умовах методики Ідентифікації D цієї монографії. Отримані при цьому хроматограми наведені на рис. 5.4. Як видно із рис. 5.4, на хроматограмі розчину збору (№3) в нижній половині хроматограми виявлено 2 фіолетові зони, так само як на хроматограмі розчину нагідок квіток (№1), які співпадали за кольором і розташуванням із відповідними зонами на хроматограмі розчину СЗ календулозидів (№2).

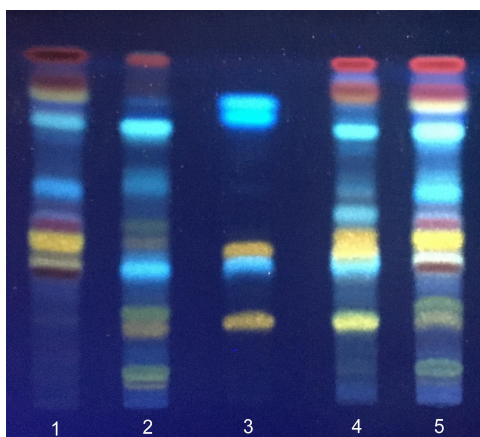


Рис 5.3 Хроматограма, отримана при проведенні випробування в умовах методики національної монографії «Череди трава^N»: 1 – череди трава, 2 – нагідок квітки, 3 – рутин + хлорогенова кислота + гіперозид + кофейна кислота (в порядку збільшення значення R_f , 4 – глоду листя і квітки, 5 – збір

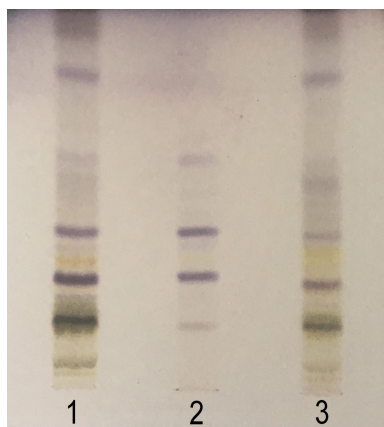


Рис 5.4 Хроматограма, отримана при проведенні випробування в умовах методики ідентифікації D національної монографії «Нагідок квітки^N»: 1 – нагідок квітки, 2 – ФСЗ ДФУ календулозиди, 3 – збір

Використовуючи ТШХ-методику монографій ДФУ «Череди трава^N» і «Нагідок квітки^N» в багатокомпонентному рослинному зборі ідентифіковано зони, які є діагностичними для кожного із його компонентів. Таким чином, розроблені методи ідентифікації комбінованого рослинного засобу – чаю череди трави, нагідок квіток, глоду листя та квіток в фільтр-пакетах за розділами, які є обов'язковими при вивченні якості рослинних лікарських засобів: ідентифікація А – макроскопія, ідентифікація В – мікроскопія, ідентифікація С – ТШХ і доведена можливість розпізнання всіх його рослинних компонентів при їх спільній присутності [163].

Проект МКЯ «Асенсефіт чай» у фільтр-пакетах

Враховуючи попередні фітохімічні дослідження наведені в Розд. 4.3, із врахуванням вимог, що наведено в загальних монографіях ДФУ «Лікарські рослинні збори» та «Лікарські рослинні чаї» [122] стандартизацію вирішено проводити за показниками наведеними в табл. А5 Додатку А.

5.1.2 Критерії стандартизації комбінованого рослинного сухого екстракту

Вивчення хроматографічного профілю комбінованого рослинного екстракту

Для створення якісного лікарського рослинного засобу важливо розробити належні ідентифікаційні випробування для контролю якості багатокомпонентного складу, щоб максимізувати потенційну користь готової лікарської форми і мінімізувати випадкову або навмисну фальсифікацію. Ідентифікаційні тести повинні бути специфічними для кожного компоненту, що міститься в готовому продукті, і повинні дозволяти розрізняти близькоспоріднені види [164]. В зв'язку з цим актуальним було вивчення хроматографічного профілю комбінованого рослинного сухого екстракту з метою виявлення характерних зон кожного компоненту (череда трави, нагідок квіток, глоду листя та квіток) за допомогою методу ТШХ.

Ідентифікацію методом ТШХ проводили згідно монографій Державної Фармакопеї України (ДФУ) – «Череди трава^N», «Нагідок квітки^N» [84,122], на пластинках зі шаром силікагелю 60 F₂₅₄ (Merck, Germany), рухома фаза мурашина кислота – вода – етилацетат (10:10:80). В якості стандартів використовувалися наступні ФСЗ ДФУ: кофейна кислота, гіперозид, хлорогенова кислота, рутин, календулозиди, лютеолін лютеолін-7- глюкозид та календулозиди.

При проведенні випробування методом ТШХ в умовах методики національної монографії «Череди трава^N» для виявлення зон флавоноїдів і гідроксикоричних кислот, на хроматограмі комбінованого екстракту виявлені характерні зони, властиві екстрактам череди, нагідок і глоду (рис.5.5).

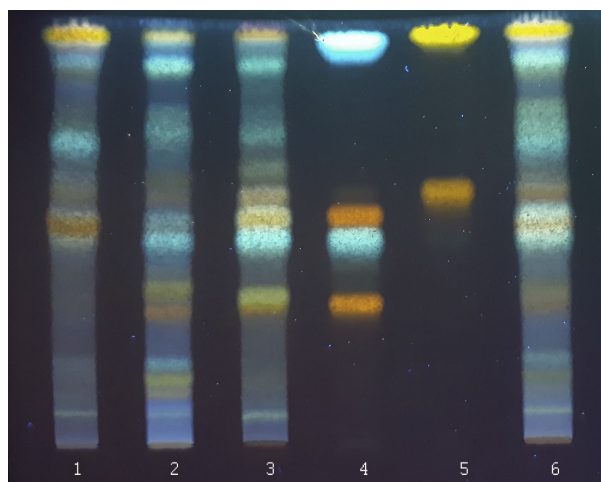


Рис.5.5 Хроматограма, отримана при проведенні випробування в умовах методики національної монографії «Череди трава^N»: 1 – череди екстракт, 2 – нагідок екстракт, 3 – глоду екстракт, 4 – рутин + хлорогенова кислота + гіперозид + кофейна кислота (в порядку збільшення значення R_f), 5 – лютеолін-7-глікозид + лютеолін (в порядку збільшення значення R_f), 6 – комбінований екстракт

Враховуючи, що в національній монографії «Нагідок квітки^N» сировину також ідентифікують за наявністю в ній календулозидів, додатково проводили випробування для ідентифікації цих сполук в комбінованому екстракті в умовах методики Ідентифікації D цієї монографії. Отримані при цьому хроматограми наведені на рис.5.6.

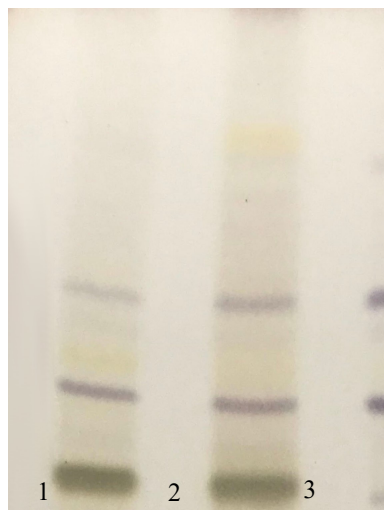


Рис. 5.6 Хроматограма, отримана при проведенні випробування в умовах методики ідентифікації D національної монографії «Нагідок квітки^N»: 1 – нагідок екстракт, 2 – комбінований екстракт, 3 – ФСЗДФУ календулозиди

Як видно, на хроматограмі розчину комбінованого екстракту (№2) в нижній половині хроматограми виявлено 2 фіолетові зони, так само як на хроматограмі екстракту нагідок (№1), які співпадали за кольором і розташуванням із відповідними зонами на хроматограмі розчину ФСЗДФУ календулозидів.

Таким чином, в результаті вивчення хроматографічного профілю комбінованого рослинного екстракту методом ТШХ з використанням уніфікованих методикДФУ виявлено всі основні зони, які є характерними для усіх видів ЛРС, що входить до його складу, що дозволяє проводити його достовірну ідентифікацію [165].

Кількісне визначення основних БАР комбінованого рослинного сухого екстракту

Попереднє вивчення якісного та кількісного вмісту фенольних сполук методом ВЕРХ для з'ясування критеріїв стандартизації комбінованого рослинного засобу дало змогу зробити висновок о доцільності його стандартизації за вмістом суми флавоноїдів в перерахунку на лютеолін-7-глюкозид та поліфенолів в перерахунку на пірогалол.

Сума флавоноїдів. Одними із основних БАР, що відповідають за фармакологічну активність череди трави яка є домінантною складовою комбінованого засобу, є флавоноїди, тому комбінований екстракт запропоновано стандартизувати за кількісним вмістом суми флавоноїдів в перерахунку на лютеолін-7-глюкозид. При розробці методики кількісного визначення БАР в екстракті була використана методика що описана в монографії «Череди трава» [121].

Вміст суми флавоноїдів обчислювали у перерахунку на лютеолін-7-глюкозид (г/100 г екстракту) і це цілком обгрунтовано, враховуючи попередні дослідження хроматографічного профілю комбінованого екстракту методом ВЕРХ, де показано, що лютеолін-7-глюкозид та його аглікони є домінантними складовими серед флавоноїдної фракції екстракту. Згідно методики в якості стандарту використовували ФСЗДФУ лютеолін, оскільки він є доступним, а при розрахунках використовували коефіцієнт перерахунку на лютеолін-7-глюкозид. На рис. 5.7 представлено спектри поглинання СЗ лютеоліна, лютеолін-7-глюкозида і випробовуваного розчину комбінованого екстракту,

як видно спектри мають однакові максимуми поглинання за довжини хвилі 410 ± 2 нм, що дозволяє стверджувати про специфічність даної методики для визначення флавоноїдів у комбінованому екстракті.

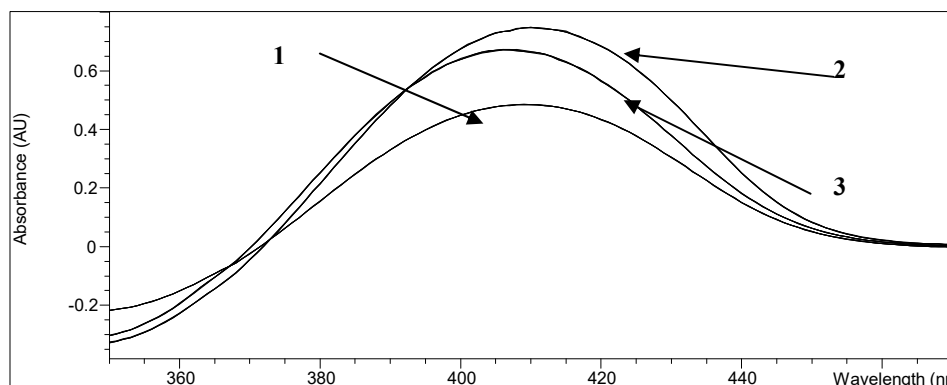
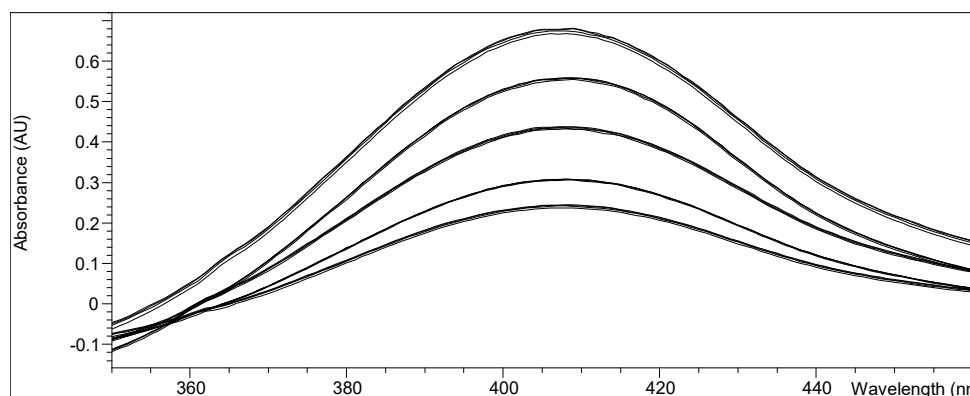


Рис. 5.7. Спектри поглинання розчинів: 1 – лютеолін-7-глюкозида, 2 – лютеоліна, 3 – випробовуваного розчину комбінованого екстракту, отримані в умовах розробленої методики

Враховуючи, що розроблена методика базується на валідованій методиці, при проведенні валідаційних досліджень були перевірені лише наступні метрологічні характеристики: діапазон застосування, лінійність та прецизійність. Для перевірки лінійності методики проводили наступний експеримент: брали різні наважки екстракту для одержання водно-спиртових розчинів різної концентрації, а саме 0,1 г, 0,15 г, 0,20 г, 0,25 г та 0,3 г (при використуванні за методикою наважкою 0,2 г), тобто в межах від - 50 до +150% від номінальної концентрації і в даних розчинах за методикою проводили визначення суми флавоноїдів (спектри одержаних розчинів наведені на рис. 5.8).

Залежність оптичної густини (Y) від наважки екстракту (X) приведена на рис. 5.9 і виражається рівнянням: $Y=A + B \cdot X$, де $A=-0,0387$, $B=4,45472$, коефіцієнт кореляції $R=0,99868$.

Перевірено прецизійність результатів визначення вмісту суми флавоноїдів у комбінованому екстракті однієї серії паралельно із 5 наважок. Метрологічні характеристики наведено у табл. 5.1.



"#"	"Name"	"Abs<410nm>"
1	"Екстракт"	
2	"0,1115 г "	0.250348
3	"0,1503 г"	0.314054
4	"0,2112 г"	0.43067
5	"0,2510 г"	0.516552
6	"0,3168 г"	0.621368

Рис. 5.8 Спектри поглинання та значення оптичної густини випробовуваних розчинів комбінованого екстракту, отримані при визначенні лінійності методики визначення вмісту флавоноїдів

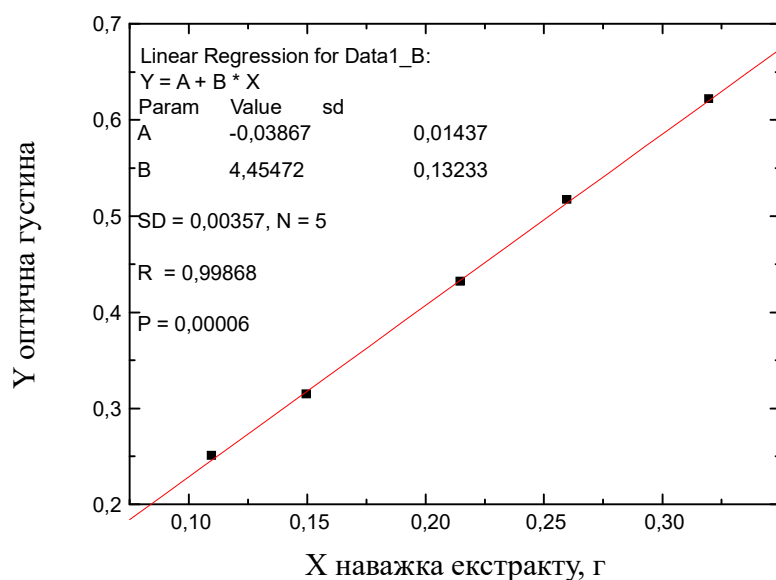


Рис.5.9 Графік залежності оптичної густини випробовуваних розчинів екстракту від його наважки

Таблиця 5.1

**Метрологічні характеристики методики кількісного визначення суми флавоноїдів
в комбінованому екстракті, в перерахунку на лютеолін-7-глюкозид**

$X, \%$	$\bar{X}$	f	S	S_x	$P, \%$	$t(P, f)$	Δ_x	$\varepsilon, \%$
3,53 3,37 3,44 3,30 3,51	3,430	4	0,0962	0,0430	95	2.776	0,1194	3,481

На підставі одержаних даних встановлено, що в межах вимірюваних концентрацій (1,6 г – 4,8 г суми флавоноїдів в 100 г екстракту) залежність оптичної густини від концентрації носить лінійний характер, т.ч. дана методика лінійна в діапазоні від - 50% до + 150% від знайденого вмісту флавоноїдів. Вміст суми флавоноїдів в екстракті, в перерахунку на лютеолін-7-глюкозид має бути не менше 3 % (регламентація встановлена відповідно експериментальним даним, які одержані при аналізі 3 дослідних серій екстракту ($X_{(c.101020)}=3.13\%$, $X_{(c.221019)}=3.25\%$, $X_{(c.310819)}=3.43\%$)).

Сума поліфенолів. При розробці методики кількісного визначення суми поліфенолів за основу брали методику ДФУ, описану в розділі 2.8.14 «Методи фармакогнозії». Методика заснована на кольоровій реакції поліфенольних сполук, які входять до складу рослинних препаратів, з фосфорномолібденово-вольфрамовим реактивом і вимірюванні оптичної густини отриманого розчину за довжини хвилі 760 нм. Вміст суми поліфенолів визначали в перерахунку на пірогалол.

В першу чергу при розробці методику перевіряли на відповідність спектрів поглинання випробовуваного розчину дослідженого екстракту, одержаного в умовах методики і спектру поглинання розчину пірогалолу. Спектр поглинання випробовуваного розчину в області від 600 до 850 нм мав чітко виражений максимум за довжини хвилі 760 нм $\pm$ 2 нм, що практично співпадало із максимумом поглинання спектру пірогалолу (рис.5.10). Таким чином, отримані дані дало змогу зробити

висновок про можливість визначення вмісту загальних поліфенолів екстракту в перерахунку на пірогалол.

Алгоритм та результати валідаційних досліджень методики кількісного визначення суми поліфенолів детально наведений в Розд. 5.1.3. На підставі одержаних даних встановлено, що дана методика лінійна в діапазоні від - 50% до + 150% від знайденого вмісту поліфенолів тобто в межах 2,5 г – 7,5 г суми поліфенолів в 100 г екстракту.

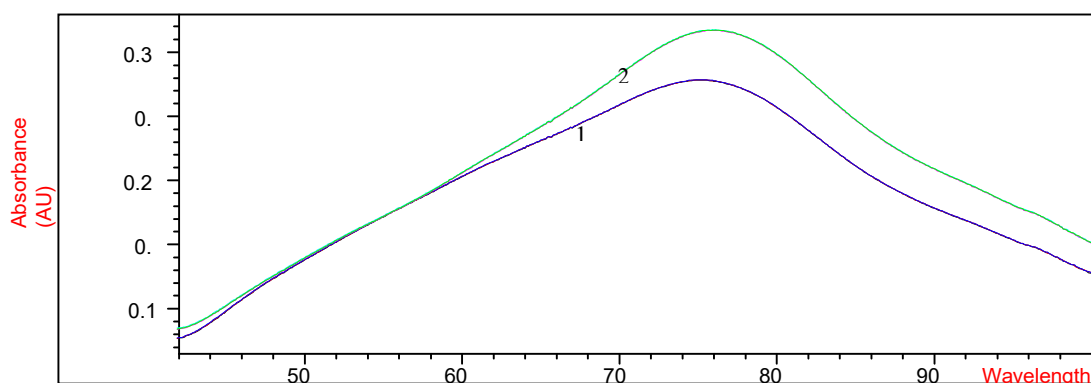


Рис. 5.10 Спектри поглинання розчинів екстракту (1) і С3 пірогалолу (2), отримані при визначенні вмісту суми поліфенолів.

Перевірено прецизійність результатів визначення вмісту поліфенолів у комбінованому екстракті однієї серії паралельно із 5 наважок. Метрологічні характеристики наведено у табл.5.2.

Таблиця 5.2

Метрологічні характеристики методики кількісного визначення суми поліфенолів в комбінованому екстракті, в перерахунку на пірогалол

$X, \%$	$\bar{X}$	f	S	S_x	$P, \%$	$t(P, f)$	$\Delta_{\bar{X}}$	$\varepsilon, \%$
5,17 4,95 4,92 5,12 4,82	5,040	4	0,1365	0,0788	95	2.776	0,1695	3,362

Вміст суми поліфенолів в екстракті, в перерахунку на пірогалол має бути не менше 5 % (регламентація встановлена відповідно експериментальним даним, які

одержані при аналізі 3 дослідних серій екстракту ($X_{(c.101020)}=5.04\%$, $X_{(c.221019)}=5.10\%$, $X_{(c.310819)}=5.25\%$).

В табл. В1 Додатку В наведено показники якості комбінованого рослинного сухого екстракту відповідно до проекту розроблених МКЯ та результати аналізу 3 х напрацьованих серій комбінованого рослинного екстракту.

5.1.3 Критерії стандартизації дозованої форми комбінованого рослинного екстракту

З капсульної маси, отриманої як описано в Розд.4.2.3) були виготовлені капсули на ручній капсульній машинці (виробництво КНР). Капсульну масу поміщали у тверду желатинову капсулу, розміру №0, циліндричної форми з кришечкою синього кольору та корпусом білого кольору (Асенсефіт, капсули).

Відповідно до вимог загальної монографії ДФУ 2.3 «Фармацевтичні препарати» [166], а також монографії на дозовані форми «Капсули» [167], обов'язковими тестами для даного виду дозованої лікарської форми є наступні тести: «Опис», «Ідентифікація», «Однорідність дозованих одиниць», «Однорідність вмісту», «Однорідність маси однодозових препаратів», «Розчинення», «Кількісне визначення». Для твердих капсул також вимагається випробування «Розпадання», але у разі виконання випробування за показником розчинення, випробування на розпадання не є обов'язковим. Тест «Однорідність дозованих одиниць» не поширюється на ЛРС і ЛРП в дозованій формі, якими і є дослідні капсули. Стосовно однорідності вмісту, в загальній монографії зазначено, що даний тест мають витримувати капсули із вмістом діючої речовини менше 2 мг, або менше 2 % від маси вмісту. Враховуючи що, в капсулі міститься в середньому 12 мг поліфенолів і це відповідає 2.4% від маси вмісту капсул, дане випробування також не є обов'язковим.

Ідентифікація. Ідентифікацію капсул проводили методом ТШХ, використовуючи для цього капсульну масу, отриману при визначенні середньої маси вмісту капсул. Використовували уніфіковані ТШХ- методики [134], що описані у попередніх роботах

[165]. При проведенні випробування методом ТШХ в умовах методики національної монографії «Череди трава^N» для виявлення зон флавоноїдів і гідроксикоричних кислот, на хроматограмі капсульної маси були виявлені характерні зони, властиві екстрактам череди, нагідок і глоду (рис.5.11). Додатково були проведені випробування для ідентифікації тритерпенових сполук в капсульній масі в умовах методики Ідентифікації D національної монографії «Нагідок квітки^N».

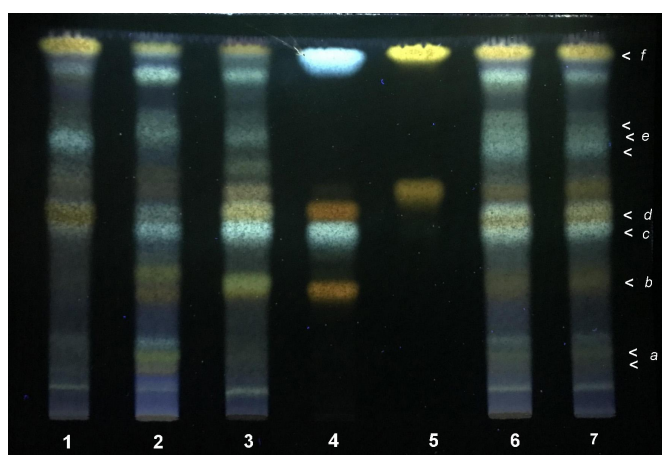


Рис. 5.11. Хроматограма, отримана при проведенні випробування в умовах методики монографії «Череди трава^N»: 1 – череди екстракт, 2 – нагідок екстракт, 3 – глоду екстракт, 4 – рутин + хлорогенова кислота + гіперозид + кофейна кислота (в порядку збільшення значення Rf), 5 – лютеолін-7-глікозид + лютеолін, 6 – комбінований екстракт «чистий», 7 – капсульна маса

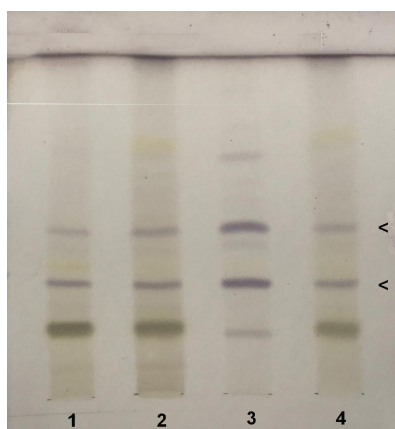


Рис. 5.12 Хроматограма, отримана при проведенні випробування в умовах методики ідентифікації D монографії «Нагідок квітки^N»: 1 – нагідок екстракт, 2 – комбінований екстракт «чистий», 3 – ФСЗ ДФУ календулозиди, 4 – капсульна маса

Як видно (рис. 5.12), на хроматограмі розчину капсульної маси, комбінованого екстракту та екстракту нагідок виявлено 2 фіолетові зони, які співпадали за кольором і розташуванням із відповідними зонами на хроматограмі розчину ФСЗ ДФУ календулозидів.

Однорідність маси. Дане випробування проводили відповідно до вимог ДФУ 2.4, 2.9.5. Для капсул з масою вмісту 300 мг і більше припустимим відхиленням маси вмісту окремої капсули від середньої маси є 7.5%. В результаті аналізу 20 капсул було встановлено, що середня маса вмісту капсул складає $0,4994973 \pm 0,0100$ г, відхилення від середньої маси знаходиться в межах від 0,18% до 2,75 %, максимальне відхилення при аналізі випробовуваних капсул було 2,75%, що відповідає вимогам ДФУ.

Тест розчинення. Дане випробування проводили відповідно до вимог ДФУ 2.0, 2.9.3 «Тест «Розчинення» для твердих дозованих одиниць». Визначення проводили на приладі з кошиком, швидкість обертання кошика – 100 об/хв, використовували 500 мл води Р в якості середовища розчинення, температура середовища ($37 \pm 0,5$) °С. 6 капсул поміщали до приладу, через 45 хв відбирали 10 мл розчину з кожної посудини, фільтрували, відкидаючи перші 5 мл. 2.0 мл фільтрату використовували для приготування випробовуваного розчину. Паралельно проводили визначення вмісту поліфенолів в наважці капсульної маси у перерахунку на пірогалол. Розрахунок для капсул проводили, використовуючи знайдену середню масу вмісту 20 капсул (результати наведено в табл.5.3).

Таблиця 5.3

Результати визначення розчинення випробовуваних капсул

Об'єкт	Вміст поліфенолів , у %	Відсоток вивільнення %
Капсульна маса	$2,577 \pm 0,012$	
1 капсула	$2,435 \pm 0,009$	94,496
2 капсула	$2,487 \pm 0,014$	96,494
3 капсула	$2,528 \pm 0,017$	98,0792
4 капсула	$2,407 \pm 0,007$	93,394
5 капсула	$2,510 \pm 0,014$	97,389
6 капсула	$2,551 \pm 0,011$	99,003
	Середній відсоток	96,476

Як видно, кількість діючої речовини, що вивільнилася в середовище розчинення протягом 45 хв при швидкості обертання кошика 100 об/хв, склало не менше 93 % (середнє для 6 капсул – 96.5%), що відповідає вимогам ДФУ.

Кількісне визначення. Загальні поліфеноли. Визначення проводили спектрофотометричним методом (ДФУ, 1 вид., 2.2.25). Розробку і валідаційні випробування проводили на капсульній масі, отриманій при визначенні вмісту 20 капсул для отримання середньої маси вмісту капсул. При розробці методики кількісного визначення суми поліфенолів за основу була взята методика, що описана в розділі ДФУ 2.0, 2.8.14 «Визначення танінів в лікарській рослинній сировині». При проведенні валідаційних досліджень методики кількісного визначення загальних поліфенолів перевіряли наступні метрологічні характеристики: специфічність, лінійність, правильність, прецизійність та внутрішньолабораторна прецизійність. Для оцінки результатів валідації, невизначеність результатів аналізу виражали як одnobічний відносний довірчий інтервал для рівня надійної ймовірності 95 %. У відповідності з рекомендаціями ДФУ, враховуючи одnobічне нормування «не менше» було прийнято, що максимально припустима невизначеність результатів кількісного визначення поліфенолів не повинна перевищувати 6,4% (Δ_{As}).

Вивчення специфічності. Специфічність методики була досліджена на розчині плацебо (який готували із використанням мікрокристалічної целюлози, у тій кількості, що входить до складу капсульної маси) та на випробовуваному розчині, які готували відповідно за методикою (табл. 5.4).

Таблиця 5.4

Результати перевірки впливу плацебо на визначення вмісту поліфенолів

Найменування розчину	Оптична густина, A			
	A_1	A_2	A_3	$A_{\text{середнє}}$
Розчин плацебо	0,007206	0,007848	0,007323	0,007459
Випробовуваний розчин	0,381352	0,382472	0,383101	0,38231
Δ_{placebo} , %	1,95 %			
Вимоги	$\max \Delta_{\text{placebo}} \leq 2,04$ %			

Вивчення лінійності

Розрахунки проводили в системі нормалізованих координат.

Готували 5 модельних розчинів, у яких досліджуваний вміст суми поліфенолів рівномірно розподілене у діапазоні методики (50 % – 150 %): 50 %, 75 %, 100 %, 125 %, 150 % від номінальної концентрації у випробовуваному розчині згідно методики, у якому вміст суми поліфенолів близький до регламентованого значення.

Для приготування модельних розчинів, аліквоти вихідного розчину (приготованого відповідно за методикою) 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 і 3.0 мл відповідно, що відповідають необхідній концентрації поліфенолів в модельному розчині (МР), поміщали у мірну колбу об'ємом 25 мл, додавали об'єм розчинника, який зменшували відповідно до росту об'єму аліквоти, додавали 1 мл *фосформолібденово-вольфрамового реактиву Р*, доводили об'єм розчином *натрію карбонату Р* до позначки і перемішували. Реєстрували УФ-спектри поглинання модельних розчинів та розчину порівняння за довжини хвилі 760 нм в умовах аналізу (рис.5.13).

За оптичною густиною модельних розчинів будували лінійну залежність A_{it} від C_{it} в нормалізованих координатах (табл. 5.5, рис. 5.14).

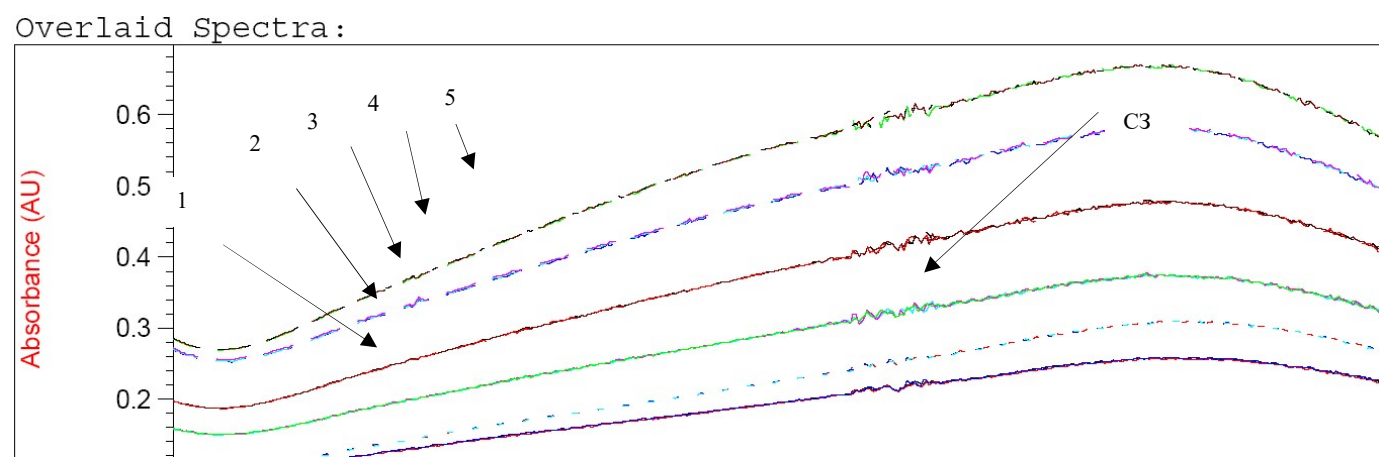


Рис. 5.13 Спектри: модельних розчинів (1-5) та розчину порівняння С3 пірогалолу, одержані при вивченні лінійності методики

Таблиця 5.5

Приведені значення модельних розчинів (МР) для побудови графіка залежності

МР	Вміст поліфенолів від регламентованого, %	Концентрація поліфенолів у МР у перерахунку на пірогалол, C_i , мг/мл	Знайдено/ Y_i	Введено/ X_i	$Z_i, \%$
1	50%	0,001036	51,315	51,806	99,052
2	75%	0,001554	78,487	77,710	101,001
3	100%	0,002072	101,975	103,613	98,419
4	125%	0,00259	125,020	129,516	96,529
5	150%	0,003108	149,929	155,419	96,467

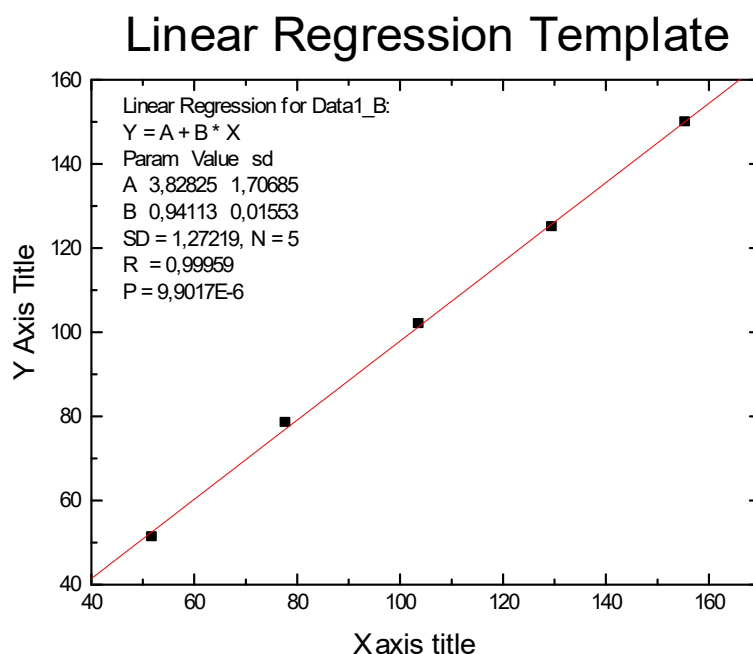


Рис. 5.14 Графік залежності для приведених значень $Y_i = a + b \times X_i$ для суми поліфенолів

Розраховували параметри лінійної залежності. Критерії прийнятності були встановлені відповідно до вимог загальної статті ДФУ 2.4, 5.3.N.2 “Валідація аналітичних методик і випробувань” та до наукових рекомендацій, щодо валідації аналітичних методик [167] (табл. 5.6).

Таблиця 5.6

Критерії лінійності і розраховані параметри лінійної залежності

Параметри	Значення	Вимоги	Оцінка результатів
b	0,9411	-	
s _b	553	-	
a	3,83	$a \leq 4.0$	витримуються
s _a	1,70685	-	
RSD ₀	1,27219	≤ 3.4	витримуються
r	0,9996	$\geq 0.99512 $	витримуються
Δ_{sample}	$\leq 6,4$	$\Delta_{\text{sample}} = 6.4\%$	витримуються

Правильність і прецизійність методики. Правильність методики оцінювали на модельних сумішах капсульної маси з додаванням СЗ пірогалолу 100, 150 % і 200%, до вихідної концентрації поліфенолів у перерахунку на пірогалол у випробовуваному розчині (результати в табл. 5.7). Показано, що відсоток відновлення знаходиться в межах від 95,11 до 100,03% і має середнє значення 96,9%. Практична незначущість систематичної похибки виконується, так само як і вимоги до прийнятної прецизійності (табл. 5.7).

Таблиця 5.7

**Результати, отримані під час вивчення правильності та прецизійності
методики**

Маса наважки	C _{iz} мг/г	C _{iv} мг/г	C _{iz} /C _{iv} , %	Критерії
1	2	3	4	5
Пірогалол 0,0252 г	-	-	-	
Капсульна маса 0,0251 г	25,7714	-	-	
Капсульна маса + пірогалол 0,0252 мг	50,8213	50,8711	99,90	
Капсульна маса + пірогалол 0,0252 мг	50,8855	50,8711	100,03	
Капсульна маса + пірогалол 0,0252 мг	50,0425	50,8711	98,37	
Капсульна маса + пірогалол 0,0502 мг	73,2415	75,7715	96,66	
Капсульна маса + пірогалол 0,0502 мг	72,0684	75,7715	95,11	
Капсульна маса + пірогалол 0,0502 мг	72,6282	75,7715	95,85	
Капсульна маса + пірогалол 0,0756 мг	96,2071	101,0703	95,19	
Капсульна маса + пірогалол 0,0756 мг	96,3685	101,0703	95,35	
Капсульна маса + пірогалол 0,0756 мг	96,4141	101,0703	95,39	

Продовження табл. 5.7

1	2	3	4	5
Середнє			96,87	
SD			2,028	
RSD			2,094	
Δ_{sample}			3.773	<6.4
Статистична незначущість			3.127	>2.05
Практична незначущість			3.127	< 6.4

Внутрішньолaborаторна прецизійність

Випробовуваний розчин капсульної маси аналізували в різні дні. Дослідження проводили різні аналітики (табл. 5.8). Різниця між знайденим значенням вмісту поліфенолів у випробовуваних розчинах (Δ_{intra}), не повинна перевищувати наступного значення:

$$\Delta_{\text{intra}} \leq 0.26 B,$$

$$\Delta_{\text{intra}} \leq 5.2\%.$$

Таблиця 5.8

Результати, отримані під час вивчення внутрішньолaborаторної прецизійності

1 День			2 день		
Маса наважки	Аср	Поліфеноли, %	Маса наважки	Аср	Поліфеноли, %
СЗ 0,0252 г	0,4011		СЗ 0,0252 г	0,4006	
0,04245 г	0,3291	2,599	0,04256 г	0,3253	2,569
0,04243 г	0,3236	2,558	0,04245 г	0,3276	2,596
0,04260 г	0,3258	2,573	0,04238 г	0,3269	2,590
	Csample (1)	2,577		Csample (2)	2,585
Δ_{intra}				0.65	$\leq 5.2\%$

Таким чином методика кількісного визначення поліфенолів за такими валідаційними характеристиками як специфічність, лінійність, правильність, прецизійність та внутрішньолaborаторна прецизійність відповідає вимогам ДФУ 2.4, 5.3.N.2.

Вміст загальних поліфенолів в препараті, в перерахунку на пірогалол має бути не менше 12 мг в одній капсулі (регламентація встановлена відповідно експериментальним даним, які одержані при аналізі 3 дослідних серій препарату ($X_{(c.110520)}=12,9$, $X_{(c.200419)}=12,6$, $X_{(c.311120)}=12,8$). Вона також корелює із вмістом поліфенолів у капсульній масі: враховуючи що у капсульній масі знаходиться не менше 2,5 % поліфенолів, а середня маса вмісту капсул дорівнює 0,4995 г, отримуємо $2,5 \cdot 0,4995/100=0,0125$ г [168].

В табл. В2 Додатку В наведено показники якості капсул відповідно до проекту розроблених МКЯ та результати аналізу 3-х напрацьованих серій капсул.

5.2. Дослідження антиоксидантної активності комбінованого рослинного засобу в умовах *in vitro*

У пошуках кількісного вимірювання синергії запропоновані численні математичні моделі, визначення яких, як правило, здійснюється точним математичним методом, що використовується для його демонстрації. Wagner і Steinke [169] успішно застосували метод ізобол для оцінки синергії між різними сумішами гінкголіду А і В (складових гінкго білоба), виміряної за допомогою агрегації тромбоцитів. Однак той же Вагнер у роботі [170] зауважує, що, хоча цей метод може бути придатним для досліджень залежності від дози з двокомпонентними сумішами, він не є правдоподібним методом для застосування до сумішей рослинних екстрактів, які потребують детальних порівняльних досліджень *in vitro* або *in vivo* з окремими компонентами або сумішами та фракціями екстракту або цілими екстрактами.

Багато моделей, аналогічних цим вимогам, були розроблені, як згаданий вище метод ізобол, але на сьогоднішній день не виявлено жодної для надійної інтерпретації реакцій між складними багатоконпонентними рослинними сумішами. В роботі запропоновано як попередник більш складних досліджень, аналіз з використанням непараметричного статистичного тесту, який принаймні вказує, взаємодіють два або

більше екстракти рослин, просто на основі спостережуваних ефектів [171]. Враховуючи це, перспективним уявлялося з'ясування можливих синергетичних взаємодій в комбінованому рослинному екстракті шляхом вивчення кореляції між вмістом БАР у різних комбінаціях рослинних екстрактів та їх антиоксидантною активністю.

Використовували як індивідуальні екстракти кожної із рослин що входять до складу, так і цільовий комбінований екстракт зі співвідношенням вихідної сировини (6:3:1). Двох і трьох компонентні композиції екстрактів одержували змішуванням індивідуальних екстрактів у відповідних співвідношеннях, які були в діапазоні їх можливого вмісту в композиції багатокomпонентного рослинного засобу.

Вибір БАР для вивчення кореляції між їх вмістом та антиоксидантною активністю багатокomпонентного рослинного засобу антиалергічної дії

В численних дослідках показано, що споживання антиоксидантних продуктів, таких як поліфенольні сполуки, асоціюється зі зниженою ймовірністю астми та симптомів свистячого дихання [172]. Наявність поліфенолів у щоденному раціоні надає їм профіль безпеки та обґрунтовує їх визнання як протиалергічних засобів. Відомо, що поліфеноли можуть утворювати нерозчинні комплекси з алергенними білками, змінюючи їх структуру або знижуючи її біодоступність. Ці ефекти можуть призвести до неефективної презентації антигену спеціалізованими клітинами, такими як дендритні клітини, і пригнічувати проліферацію Т-клітин і вироблення цитокінів. Таким чином, ці сполуки можуть модулювати різні фази алергії, пригнічувати запалення дихальних шляхів і еозинофілію тканин, запобігати харчовій алергії та контролювати стафілококову інфекцію при атопічній екземі [173].

Зважаючи на відому антиалергічну дію поліфенолів і виходячи з того, що поліфеноли, які присутні в усіх вибраних рослинах, мають антиоксидантну активність, отримані відповідні сухі екстракти, а також їх 2 та 3- компонентні суміші були проаналізовані на вміст поліфенолів (результати наведені в табл. 5.9).

Таблиця 5.9

Результати визначення вмісту поліфенолів у випробовуваних екстрактах

Екстракти та їх комбінації	Поліфеноли, %	
	Знайдено*	%, від теоретично розрахованого
1	2	3
Екстракт череди (Ч)	5,51 ± 0,09	-
Екстракт нагідок (Н)	3,42 ± 0,04	-
Екстракт глоду (Г)	7,04 ± 0,07	-
Екстракт Ч+Н 1:0,5/67:33	4,54 ± 0,06	94,3%
Екстракт Ч+Н 1:1/50:50	4,25 ± 0,08	95,2%
Екстракт Ч+Г 1:0,1/91:9	5,47 ± 0,09	96,6%
Екстракт Ч+Г 1:0,5/67:33	5,71 ± 0,11	94,1%
Екстракт Н+Г 1:0,1/91:9	3,73 ± 0,05	99,1%
Екстракт Н+Г 1:0,5/67:33	4,54 ± 0,08	98,3%
Екстракт Ч+Н+Г(6:3:1 частин сировини) 1:0,8:0,25/49:39:12**	5,03 ± 0,10	102,8%
Екстракт Ч+Н+Г(6:2:2 частин сировини) 1:0,5:0,5/50:25:25	5,36 ± 0,08	99,1%
Екстракт Ч+Н+Г/7:2,5:0,5 частин сировини) 1:0,5:0,1/63:31:6	5,06 ± 0,09	101,9%
Екстракт Ч+Н+Г/6:3,5:0,5 частин сировини) 1:1:0,1/48:48:4	4,48 ± 0,07	96,9%
Екстракт Ч+Н+Г (5:3,5:1,5 частин сировини) 1:1:0,5/40:40:20	4,99 ± 0,08	99,7%

Примітки. *n=3, ±SD,

**X:Y:Z/X1:Y1:Z1 – співвідношення екстрактів в комбінованому екстракті/співвідношення частин екстрактів у даній комбінації, у % (необхідне для розрахунку теоретично розрахованих значень)

Як видно із табл. 5.9, максимальна кількість поліфенолів визначена в екстракті глоду (7,04 %), далі йде екстракт череди (5,51 %) і далі – екстракт нагідок – 3,42 %, що корелює із вмістом флавоноїдів у сировині: у глоді листя ті квіток – не менше 2 % суми флавоноїдів, у череді траві – не менше 1,0 %, а у нагідок квіток – не менше 0,4 %. Також як видно із табл. 5.9, знайдений вміст поліфенолів в комбінаціях екстрактів добре співпадає із теоретичним вмістом, розрахованим із врахуванням конкретних співвідношень екстрактів у комбінації.

Після фітохімічного аналізу випробовувани екстракти, а також різні їх комбінації оцінювали *in vitro* на антиоксидантну активність, використовуючи неокупроїновий метод [174], результати наведено у табл. 5.10. Із отриманих результатів визначення антиоксидантної активності чистих екстрактів та їх різних комбінацій неокупроїновим методом можна зробити такі висновки: при додаванні до екстракту череди екстракту нагідок антиоксидантна активність очікувано зменшується (чим більше додано, тим більше зменшується), оскільки екстракт календули показує в 2.5 рази меншу активність ніж екстракт череди, тобто спостерігається адитивний ефект. При додаванні до екстракту череди екстракту глоду антиоксидантна активність збільшується у разі співвідношення 1:0,5 (120 % по відношенню до екстракту череди), а також для даного співвідношення спостерігається збільшення (110,6%) порівняно із очікуваним (теоретично розрахованим), що може бути приводом для припущення синергізму для такої комбінації.

Таблиця 5.10

**Антиоксидантна активність випробовуваних екстрактів визначена
неокупроїновим методом**

Екстракти та їх комбінації	ТАС, ммолТЕ/г	ТАС, г/мл	Знайдено, у % від очікуваного*	Змінення активності при змінненні співвідношення компонентів, у %
1	2	3	5	5
Екстракт череди (Ч)	0,973 ± 0,032*	0,244 ± 0,008	-	-
Екстракт нагідок (Н)	0,491 ± 0,025	0,115 ± 0,006	-	-

Продовження табл. 5.10

1	2	3	4	5
Екстракт глоду (Г)	$1,238 \pm 0,044$	$0,309 \pm 0,011$	-	-
Екстракт Ч+Н 1:0,5/67:33	$0,769 \pm 0,029$	$0,193 \pm 0,007$	95,68	79,1 по відношенню до Ч
Екстракт Ч+Н 1:1/50:50	$0,699 \pm 0,026$	$0,175 \pm 0,006$	97,54	71,9 по відношенню до Ч
Екстракт Ч+Г 1:0,1/91:9	$1,002 \pm 0,039$	$0,251 \pm 0,010$	100,64	103,0 по відношенню до Ч
Екстракт Ч+Г 1:0,5/67:33	$1,173 \pm 0,045$	$0,294 \pm 0,012$	110,61	120,5 по відношенню до Ч
Екстракт Н+Г 1:0,1/91:9	$0,485 \pm 0,022$	$0,121 \pm 0,006$	95,54	105,3 по відношенню до Н
Екстракт Н+Г 1:0,5/67:33	$0,668 \pm 0,029$	$0,167 \pm 0,007$	96,03	130,3 по відношенню до Н
Екстракт Ч+Н+Г(6:3:1 частин сировини) 1:0,8:0,25/49:39:12**	$0,790 \pm 0,032$	$0,201 \pm 0,008$	100,30	-
Екстракт Ч+Н+Г(6:2:2 частин сировини) 1:0,5:0,5/50:25:25	$0,901 \pm 0,035$	$0,226 \pm 0,009$	98,86	112,1 по відношенню до Ч+Н+Г (6:3:1)
Екстракт Ч+Н+Г (7:2,5:0,5 частин сировини) 1:0,5:0,1/63:31:6	$0,801 \pm 0,033$	$0,204 \pm 0,008$	98,77	101,4 по відношенню до Ч+Н+Г (6:3:1))
Екстракт Ч+Н+Г (6:3,5:0,5 частин сировини) 1:1:0,1/48:48:4	$0,698 \pm 0,028$	$0,185 \pm 0,007$	98,71	91,8 по відношенню до Ч+Н+Г (6:3:1)
Екстракт Ч+Н+Г (5:3,5:1,5 частин сировини) 1:1:0,5/40:40:20	$0,792 \pm 0,034$	$0,198 \pm 0,009$	96,50	98,5 по відношенню до Ч+Н+Г (6:3:1)

Примітка. *n=3, $\pm$ SD,

**X:Y:Z/X1:Y1:Z1 – співвідношення екстрактів в комбінованому екстракті/співвідношення частин екстрактів у даній комбінації, у % (необхідне для розрахунку очікуваних значень)

У комбінації нагідки-глід очікувано спостерігається збільшення антиоксидантної активності (співвідношення 1:0,5 показує збільшення на 130 % порівняно із активністю

чистого екстракту нагідок), що також пояснюється тим, що екстракт глоду проявляє майже в 3 рази більшу активність ніж екстракт нагідок.

Стосовно 3-х компонентних комбінацій виявлено, що тільки комбінація Ч+Н+Г (1:0,5:0,5) показує більшу активність (112 %) ніж цільовий екстракт Ч+Н+Г (1:0,8:0,25), всі інші комбінації проявляють дещо меншу або таку саму антиоксидантну активність. В цілому можна зробити висновок, що усі аналізовані 3-компонентні композиції, які охоплюють діапазон можливих варіацій компонентів в багатоконпонентному рослинному засобі, що розробляється, проявляють антиоксидантну активність в межах цих можливих варіацій ($\pm 10\%$). Для з'ясування достовірних синергетичних взаємодій всіх компонентів необхідні додаткові детальні дослідження *in vivo* як з окремими екстрактами, так і різними їх сумішами.

Одержані результати були статистично оброблені, а саме вивчена лінійна залежність (рис. 5.15), рівняння $Y=1,7599+15,3787X$, $R=0,95968$, де Y – вміст поліфенолів, %; X – антиоксидантна активність ТАС, г/мл), а також проведено розрахунок кореляційної залежності між вмістом поліфенолів у досліджуваних комбінаціях і знайденою антиоксидантною активністю, використовуючи коефіцієнт Пірсона.

Виявлена сильна позитивна кореляція між даними характеристиками (коефіцієнт кореляції Пірсона, $r = 0,956365$, $t_r=11,33886$, $t_{\text{крит}}=3,055$ при $p<0.01$, $t_r > t_{\text{крит}}$, відповідно залежність є статистично значущою; де r - коефіцієнт рангової кореляції Пірсона, t_r - значимість коефіцієнта).

Таким чином, у 2-х компонентних комбінаціях екстрактів череди/нагідок, глоду/нагідок виявлено адитивний ефект при визначенні їх антиоксидантної активності, і тільки для комбінації екстракт череди/екстракт глоду 1:0,5 зроблена припущенність про наявність синергетичного ефекту. Усі аналізовані 3-компонентні композиції, які охоплювали діапазон можливих варіацій компонентів у багатоконпонентному рослинному засобі, проявляли антиоксидантну активність в межах цих можливих варіацій ($\pm 10\%$) [175].

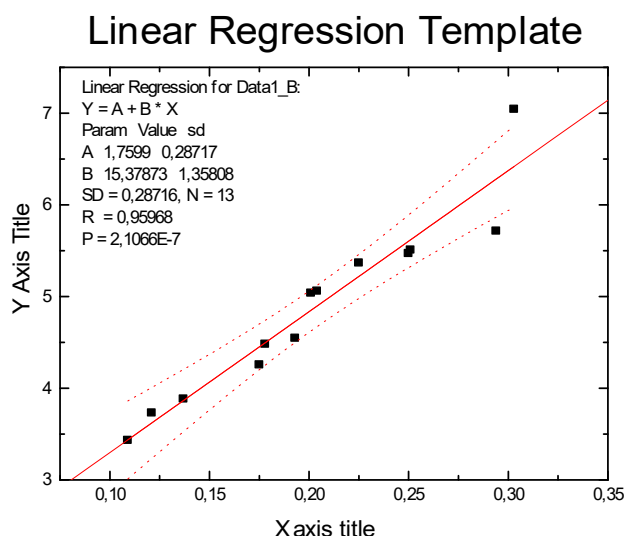


Рис. 5.15 Графік залежності антиоксидантної активності екстрактів від вмісту поліфенолів

5.3. Вивчення антиалергійною активності комбінованого рослинного сухого екстракту

Дослідження біологічної дії отриманого комбінованого рослинного сухого екстракту проводили на базі кафедри нормальної та патологічної фізіології Національного фармацевтичного університету під керівництвом д. мед. н., проф. Кононенко Н.М.

Модель анафілактичного шоку у мурчаків

Через 8-10 хвилин після введення розв'язувальної дози НКС у тварин групи контрольної патології спостерігали прояви анафілактичного шоку, які характеризувалися вираженим занепокоєнням, пілоерекцією, тремором, інтенсивним почухуванням мордочки, скуйовдженістю шерстного покриву. До 20-ї хвилини у тварин даної групи розвивався тяжкий анафілактичний шок, який проявлявся судомами, боковим положенням, диханням Чейна-Стокса, асфіксією та загибеллю усіх

мурчаків протягом 30-ти хвилин. При цьому ступінь вираженості анафілактичного шоку у тварин групи контрольної патології дорівнювала 4,00 бали (табл. 5.11).

Таблиця 5.11

**Антиалергічна активність комбінованого екстракту на моделі
анафілактичного шоку у мурчаків, n = 6**

Групи тварин	Показники		
	Виживаність тварин, %	Вираженість анафілактичного шоку, бали	Антиалергічна активність, %
Інтактний контроль	100	0	-
Контрольна патологія (сенсibilізація)	0	4,00 (4÷4)	-
Комбінований екстракт, 30 мг/кг + сенсibilізація	100	2,50 (2÷3)*	38
Таблетки “Діазолін”, 12 мг/кг + сенсibilізація	100	3,50 (3÷4)*	25
Дезлоратидин, 0.5 мг/г + сенсibilізація	100	2,00 (2÷2)*	50
Тесалін, 1 мг/кг + сенсibilізація	100	2,50 (2÷3)*	38

Примітки:

n – кількість тварин у групі;

* – достовірне відхилення по відношенню до групи контрольної патології, $p < 0.05$.

Під впливом досліджуваних засобів виживаність тварин зростала до 100 %, однак вираженість проявів у групі мурчаків, які отримували комбінований екстракт була на рівні рослинного препарату Тесалін. Вивчений комбінований екстракт за фармакологічною дією становив на 13% вище, ніж препарат порівняння діазолін, який показав найменшу і лише на 12 % поступався потужному протиалергічному препарату дезлоратадину (табл. 5.11). Таким чином, комбінований екстракт дозою 30 мг/кг попереджав розвиток анафілактичного шоку, викликаного сенсibilізацією та не поступався за антиалергічною активністю Тесаліну і перевищував активність Діазоліну.

Модель активної кожної анафілаксії на мурчаках.

На моделі активної кожної анафілаксії на 21-у добу сенсibilізації у тварин групи контрольної патології спостерігали достовірне підвищення кількості лейкоцитів в крові (табл. 5.12).

Таблиця 5.12

Результати вивчення антиалергічної дії комбінованого екстракту на моделі активної кожної анафілаксії у мурчаків, n=6

Група тварин	Площа забарвленої плями, мм ²	Кількість лейкоцитів, 10 ⁹ /л	ЦК, од.опт.густини
Інтактний контроль	8.16±1.45	7.20±0.65	0.346±0,038
Контрольна патологія (сенсibilізація)	194.88±9.53*	13.81±1.06*	0,541±0,049*
Комбінований екстракт, 30 мг/кг + сенсibilізація	79.07±6.34*/**/**	9.15±0.94**	0,191±0,020**/**
Діазолін, 12 мг/кг + сенсibilізація	105.62±8.51*/**	10.62±0.82**	0,174±0,014**
Дезлоратидин, 0.5 мг/кг + сенсibilізація	35.22±4.39*/**/**	11.35±1,16*/**	0,256±0.038**/**
Тесалін, 1 мг/кг + сенсibilізація	84.51±6.15*/**/**/d	11.05±0,93*/**	0,203±0.031**/**

Примітки:

* – достовірне відхилення по відношенню до групи інтактного контролю, $p < 0.05$;

** – достовірне відхилення по відношенню до групи контрольної патології, $p < 0.05$;

*** – достовірне відхилення по відношенню до групи препарату порівняння таблеток діазоліну, $p < 0.05$

d – достовірне відхилення по відношенню до групи препарату порівняння дезлоратидину, $p < 0.05$.

Оскільки лейкоцити одні з перших з'являються в місці запалення та є першою лінією клітинного захисту, то вже в період сенсibilізації ці клітини накопичуються в крові [176]. Лейкоцити беруть участь у фагоцитозі імунних комплексів, які утворюються при взаємодії антигену з антитілом. Утворені імунні комплекси сприяють інактивації та елімінації антигенів. Достовірне збільшення ЦК в крові в період сенсibilізації (табл. 5.12) в групі контрольної патології характеризує фізіологічну

відповідь організму на надлишкове надходження антигену. Накопичення ЦІК в період сенсibilізації призводить після введення розв'язувальної дози антигену до вивільнення хемокінів, і, як результат – до розвитку симптомів алергічної реакції [177].

Профілактичне введення в період сенсibilізації комбінованого екстракту та препаратів порівняння сприяло достовірному зниженню кількості лейкоцитів в крові та рівня ЦІК (табл. 5.12), що дозволяє зробити висновок про здатність досліджуваних засобів уповільнювати рівень сенсibilізації тварин і, як наслідок – попереджати розвиток алергічної реакції.

Під впливом комбінованого екстракту відбувалося достовірне зменшення площі зафарбованих плям у місці внутрішньошкірного введення яєчного білку в 2,46 рази порівняно з контрольною патологією. За здатністю зменшувати проникність стінок капілярів шкіри рослинний засіб не відрізнявся від Тесаліну і достовірно перевищував діазолін в 1,33 раза. Тим не менш комбінований рослинний екстракт, як і Тесалін, поступався за протиалергічною дією у 2,2 та 2,4 рази відповідно до дезлортадину, тоді як діазолін – у 3,0 рази нижче. Отже, комбінований екстракт при профілактичному введенні під час сенсibilізації на моделі активної кожної анафілаксії проявляє виражену антиалергічну дію на рівні Тесаліну, що свідчить про його терапевтичну ефективність при алергічних реакціях негайного типу.

Визначення впливу комбінованого екстракту на дегрануляцію опасистих клітин у щурів.

В алергічних реакціях "негайного" типу клітинами-мішенями є опасисті клітини сполучної тканини. Їх дегрануляція під дією комплексу "антиген-антитіло" призводить до інтенсивного вивільнення біологічно активних речовин, які обумовлюють прояви алергії [178]. З метою дослідження впливу комбінованого екстракту на виділення медіаторів алергії було проведено дослідження *in vitro* на опасистих клітинах перитонеального ексудату щурів. Наведені в табл. 5.13 дані свідчать про те, що комбінований екстракт потужно пригнічував дегрануляцію опасистих клітин та в 2,2 та 1,49 рази відповідно перевищував Діазолін та Тесалін за здатністю перешкоджати

вивільненню медіаторів алергійних реакцій "негайного" типу. Істотних відмінностей між кількістю дегранульованих клітин в групі комбінованого екстракту та групі дезлоратадину не виявлено, що вказує на їх можливу здатність пригнічувати прозапальні цитокіни.

Таблиця 5.13

Результати вивчення антиалергічної дії комбінованого екстракту на моделі дегрануляції опасистих клітин, n=6

Група тварин	Кількість дегранульованих клітин, %
Інтактний контроль	6.19±1.22
Контрольна патологія (сенсibilізація)	25.43±3.91*
Комбінований екстракт, 30 мг/кг + сенсibilізація	8.54±1.36**/***/t
Діазолін, 12 мг/кг + сенсibilізація	18.75±3.05*
Дезлоратидин, 0.5 мг/кг + сенсibilізація	6.87±1.48**/***/t
Тесалін, 1 мг/кг + сенсibilізація	13.72±1.64**/d

Примітки:

* – достовірне відхилення по відношенню до групи інтактного контролю, $p < 0.05$;

** – достовірне відхилення по відношенню до групи контрольної патології, $p < 0.05$;

*** – достовірне відхилення по відношенню до групи препарату порівняння таблеток діазоліну, $p < 0.05$

d – достовірне відхилення по відношенню до групи препарату порівняння дезлоратидину, $p < 0.05$;

t – достовірне відхилення по відношенню до групи препарату порівняння Тесаліну, $p < 0.05$.

Враховуючи, що досліджуваний рослинний засіб містить антиоксиданти природного походження та співставляючи отримані результати усіх експериментів можна зробити висновок про те, що механізм антіалергічної дії комбінованого засобу, імовірно, пов'язаний не тільки з антигістамінними властивостями, а й зі здатністю стабілізувати клітинні мембрани, що узгоджується з даними літератури [179].

Висновки до Розділу 5

1 Враховуючи що ЛЗ що розробляється може бути у виді екстракту сухого для виготовлення таблетованих і капсульних форм, подрібненого збору ЛРС для виготовлення таблетованих і капсульних форм, збору лікарських рослин у пачках (пакетах, фільтр пакетах), розроблено методики контролю якості з урахуванням конкретної лікарської форми.

2 Розроблено проект МКЯ «Асенсефіт, чай» на комбінований рослинний збір/рослинний чай у фільтр-пакетах з методами ідентифікації за показниками, які є обов'язковими при вивченні якості рослинних лікарських засобів: ідентифікація А - макроскопія, ідентифікація В - мікроскопія, ідентифікація С – ТШХ та доведена можливість розпізнання всіх його рослинних компонентів при їх спільній присутності. Дану лікарську форму запропоновано стандартизувати за кількісним вмістом полісахаридів – не менше 70 мг/в 1 фільтр-пакеті та за вмістом поліфенолів – не менш 5 мг/в 1 фільтр-пакеті.

3 Розроблено проект МКЯ «Асенсефіт, екстракт сухий» на комбінований рослинний сухий екстракт, для якого серед іншого розроблено ТШХ-методику ідентифікації та 2 спектрофотометричні методики кількісного визначення. Субстанцію запропоновано стандартизувати за кількісним вмістом суми флавоноїдів у перерахунку на лютеолін-7-глюкозид – не менше 3% та за вмістом суми поліфенолів – не менше 5 %.

4 Розроблено параметри стандартизації капсул комбінованого рослинного засобу відповідно до вимог ДФУ до даної дозованої форми. Розроблено комплекс фізико-хімічних методик аналізу, що дозволяє провести систематичне забезпечення фармацевтичної розробки капсул комбінованого рослинного засобу. Вивчено валідаційні характеристики методики кількісного визначення поліфенолів в капсулах відповідно до вимог ДФУ, згідно якої регламентовано не менш 12 мг полі фенолів в одній капсулі.

5 З метою попереднього вивчення фармакологічної активності досліджено кореляцію між вмістом БАР у різних комбінаціях рослинних екстрактів, які є складовими комбінованого засобу та їх антиоксидантною активністю. У 2-х компонентних комбінаціях екстрактів череди/нагідок, нагідок/глоду виявлено адитивний ефект при визначенні їх антиоксидантної активності, і тільки для комбінації екстракт череди/екстракт глоду 1:0,5 зроблена припущенність про наявність синергетичного ефекту. Усі аналізовані 3-компонентні композиції, які охоплювали діапазон можливих варіацій компонентів у багатокомпонентному рослинному засобі, проявляли антиоксидантну активність в межах цих можливих варіацій ($\pm 10\%$). Виявлена сильна позитивна кореляція між вмістом поліфенолів у досліджуваних комбінаціях і знайденою їх активністю, використовуючи коефіцієнт Пірсона.

6 При дослідженні протиалергічних властивостей розробленого комбінованого рослинного сухого екстракту на моделі анафілактичного шоку і на моделі активної кожної анафілаксії з'ясовано, що він виявляє протиалергічну активність на рівні рослинного протиалергічного препарату Тесаліну і значно перевищує Діазолін. В тесті непрямой дегрануляції опасистих клітин комбінований екстракт не відрізнявся за мембраностабілізуючими властивостями від дії Дезлоратадину і значно перевищував препарати порівняння Діазолін і Тесалін.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Котов С. А., Гонтова Т. М., Соколова О. О. Вивчення можливості ідентифікації індивідуальних рослин у багатокомпонентному лікарському рослинному засобі. *Фармацевтичний часопис*. 2021. № 3. С.22-28.

2. Котов С., Гонтова Т., Котова Е. Вивчення хроматографічного профілю комбінованого лікарського рослинного екстракту. *Державна Фармакопея України — європейська якість вітчизняних лікарських засобів: матеріали наук.-практ. дистанц. конфер., м. Харків, 25-26 листопада 2021 р. Фармаком*. 2021. С. 65-69.

3. Котов С.А., Гонтова Т.М. Стандартизація дозованої форми комбінованого рослинного засобу антиалергічної дії. *Annals of Mechnikov's Institute*. 2022. № 4. С. 42–51.

4. Котов С.А., Гонтова Т.М. Вивчення залежності між вмістом поліфенолів в різних комбінаціях рослинних екстрактів та їх антиоксидантною активністю багатокомпонентного рослинного засобу антиалергічної дії. *Фармацевтичний журнал*. 2022, Т. 77 (5). С.65-73.

5. Kotov S., Gontova T., Kononenko N., Chernyavski E., Chikitkina V. Phytochemical analysis and anti-allergic activity of a combined herbal medicine based on bur-marigold, calendula and hawthorn. *Pharmacia*. 2022. 69 (1). P. 237-247.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено результати теоретичного узагальнення і практичного вирішення поставленого завдання, що полягає в аналітичному забезпеченні розробки комбінованого рослинного засобу з передбачуваними антиалергічними властивостями, відпрацюванні технології його виготовлення, визначенні критичних параметрів виробництва, розробці методик контролю якості як вхідної сировини у разі відсутності фармакопейної монографії, так і проміжних продуктів і кінцевого засобу в різних лікарських формах; вивченні фармакологічної активності отриманого комбінованого рослинного засобу.

1. Проаналізовано наукові першоджерела стосовно проблеми алергічних захворювань у світі, показана актуальність розробки для застосування при лікуванні алергій препаратів на основі лікарської рослинної сировини, дана ботанічна, хімічна, фармакологічна оцінка сировини череди трава, нагідок квітки, глоду листя та квітки, їх сучасна стандартизація.

2. В ході попереднього аналізу вхідної сировини, що входить до складу комбінованого засобу з'ясовано необхідність розробки сучасних методик контролю якості череди трави. Для проектів національної монографії «Череди трава» для ДФУ 2.2 та ДФУ 2.5 розроблено:

- розділи Ідентифікація А та Ідентифікація В (макро і мікроскопічні ознаки);
- ТШХ - методики ідентифікації череди трави і контролю домішок інших видів череди в фармакопейному виді, де в якості стандартів запропоновано використання ФСЗ ДФУ лютеоліна, гіперозида та вперше ФСЗ ДФУ череди пониклої;
- уніфікована спектрофотометрична методика визначення суми флавоноїдів у перерахунку на лютеолін-7-глюкозид з регламентацією не менш 1%;
- методика визначення вмісту суми полісахаридів з регламентацією не менш 4%.

Вперше методами ТШХ і ВЕРХ виділено та ідентифіковано кверцитрин, речовину, яка є діагностичною для ч. пониклої, домішки якої можна контролювати за допомогою описаних методів у фармакопейному виді.

3. Розроблено технологічні підходи щодо екстракції череди трави, нагідок квіток та глоду листя та квіток. В результаті дослідження процесу екстрагування поліфенолів, флавоноїдів, полісахаридів, з'ясовано що оптимальним співвідношенням для всіх видів ЛРС є співвідношення сировина/екстрагент 1:20 і 40% етанол в якості екстрагенту є оптимальним з точки зору збалансованої екстракції флавоноїдів, полісахаридів і поліфенолів.

4. Розроблена і відпрацьована в лабораторних умовах технологія одержання комбінованого рослинного засобу, яка передбачає одержання засобу в різних формах, а саме у формі подрібненої сировини (для виробництва рослинного чаю у пакетах), рідкого екстракту, густого екстракту, сухого екстракту, а також в дозованій формі у вигляді капсул, для капсульної маси вивчені фармако-технологічні характеристики, зокрема фракційний склад методом лазерної дифракції. Новизна досліджень підтверджена патентом України на корисну модель № 149399 від 17.11.2021 і патентом України на винахід № 126141 від 17.08.2022.

5. В результаті детального фітохімічного аналізу сухого комбінованого екстракту та окремих його складових, з'ясовано що він містить $1,0 \pm 0,08$ % гідроксикоричних кислоти, $3,13 \pm 0,09$ % флавоноїдів в перерахунку на лютеолін-7-глюкозид, $5,03 \pm 0,10$ % поліфенолів в перерахунку на пірогалол і $0,44 \pm 0,04$ % терпеноїдів у перерахунку на олеанолову кислоту.

6. Розроблено проект МКЯ «Асенсефіт чай» на комбінований рослинний чай у фільтр-пакетах з методами ідентифікації за показниками, які є обов'язковими при вивченні якості рослинних лікарських засобів: ідентифікація А - макроскопія, ідентифікація В - мікроскопія, ідентифікація С – ТШХ Дану лікарську форму запропоновано стандартизувати за кількісним вмістом полісахаридів – не менше 70 мг/1 фільтр-пакеті та за вмістом поліфенолів – не менш 5 мг/1 фільтр-пакеті.

Розроблено проект МКЯ «Асенсефіт екстракт сухий», для якого розроблено ТШХ-методику ідентифікації та 2 спектрофотометричні методики кількісного визначення. Субстанцію запропоновано стандартизувати за кількісним вмістом суми флавоноїдів у перерахунку на лютеолін-7-глюкозид – не менше 3% та за вмістом суми поліфенолів – не менше 5 %.

Розроблено проект МКЯ «Асенсефіт капсули», які містять всі необхідні показники відповідно до вимог ДФУ до даної дозованої форми. Вивчено валідаційні характеристики методики кількісного визначення поліфенолів в капсулах, згідно якої регламентовано не менш 12 мг поліфенолів в одній капсулі.

7. Досліджено кореляцію між вмістом поліфенолів у різних комбінаціях рослинних екстрактів, які є складовими комбінованого засобу та їх антиоксидантною активністю. У 2-х компонентних комбінаціях екстрактів череди/нагідок, глоду/нагідок виявлено адитивний ефект при визначенні їх антиоксидантної активності, і тільки для комбінації екстракт череди/екстракт глоду 1:0,5 зроблена припущенність про наявність синергетичного ефекту. Усі аналізовані 3-компонентні композиції, які охоплювали діапазон можливих варіацій компонентів у багатокомпонентному рослинному засобі, проявляли антиоксидантну активність в межах цих можливих варіацій ($\pm 10\%$).

8. Вперше при дослідженні протиалергічних властивостей розробленого комбінованого рослинного сухого екстракту на моделі анафілактичного шоку і на моделі активної кожної анафілаксії з'ясовано, що він виявляє протиалергічну активність на рівні рослинного протиалергічного препарату Тесаліну і значно перевищує Діазолін. В тесті непрямой дегрануляції тучних клітин комбінований екстракт не відрізнявся за мембраностабілізуючими властивостями від дії Дезлоратадину і значно перевищував препарати порівняння Діазолін і Тесалін.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Эрназарова Х. Х., Адылова З. У. Распространенность аллергических заболеваний в мире. *International scientific review*. 2017. Vol. 2, № 33. P. 111–113.
2. World Health Organization. *White Book on Allergy 2011–2012. Executive Summary* / by ed. R. Pawankar et al. Wisconsin : WAO, 2013. 20 p.
3. The European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI). 2016. URL: <https://www.narf.org.uk/the-allergy-explosion> (Date of access: 31.01.2023).
4. Антигістамінні препарати: проблема вибору. *Еженедельник АПТЕКА*. 2001. № 32 (303). URL: <https://www.apteka.ua/article/11984> (дата звернення: 22.02.2023).
5. Трофимов М. Н. Современные антигистаминные средства: три ступени к победе над аллергией. *Провизор*. 2004. № 9. URL: https://www.provisor.com.ua/archive/2004/N9/art_30.php (дата обращения: 22.02.2023).
6. Компендиум. Лекарственные препараты. Антигистаминные средства для системного применения. URL: <https://compendium.com.ua/atc/R06> (дата обращения: 22.02.2023).
7. Estelle F., Simon R., Simons K. J. Antihistamines: Current Status and Future Directions. *World Allergy Organ J*. 2008. Vol. 1, № 9. P. 145–155.
8. Schoffro Cook M. *Allergy–Proof Your Life: Natural Remedies for Allergies That Work!*, New York : Humanix Books, 2017. 256 p.
9. Cota B. B., Bertollo C. M., de Oliveira D. M. Anti–Allergic Potential of Herbs and Herbal Natural Products. *Activities and Patents Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery*. 2013, Vol. 7, № 1. P. 26–56.
10. Alternative medicine in allergies–prevalence, patterns of use, and costs / T. Schäfer et al. *Allergy*. 2002. Vol. 57, № 8. P. 694–700.
11. Hoang M. P., Chitsuthipakorn W., Snidvongs K. Herbal Medicines for Allergic Rhinitis: a Systematic Review and Meta–analysis. *Curr. Allergy Asthma Rep*. 2021. Vol. 21, № 25. P. 22–25.
12. Caesar L. K., Cech N. B. Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1 + 1 does not equal 2. *Natural Product Reports*, 2019. Vol. 36. P. 869–888.

13. Williamson E. M. Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine*, 2001. Vol. 5. P. 401–409.
14. The rediscovery of ancient Chinese herbal formulas / W. Jia et al. *Phytother. Res.* 2004. Vol. 18, № 8. P. 681–686.
15. Zhou X., Seto S. W., Chang D. A Synergistic Effects of Chinese Herbal Medicine: A Comprehensive Review of Methodology and Current Research. *Front. Pharmacol.* 2016. Vol. 7. 201 p.
16. Лікарські рослини: енциклопедичний довідник / відп. ред. Гродзінський А. М. Київ: УРЕ, 1992. 543 с.
17. Монографии ВОЗ о лекарственных растениях, широко используемых в новых независимых государствах (ННГ). Женева : Всемирная организация здравоохранения, 2010. 453 с.
18. Gruenwald J., Brendler T., Jaenicke C. PDR for herbal medicines. Montvale : Medical Eco. Co. 2000. 858 p.
19. Barnes J., Phillipson J. D., Anderson A. Herbal Medicines. Third ed. London : Pharmaceutical Press, 2007. 721 p.
20. Kotov S. Precondition to the development of the herbal medicinal product with desensitizing activity. *Український часопис*. 2019. Т. 2, № 6 (134) : Science and Modern Pharmaceutical Manufacturing : materials of VII Scientific and Practical Conference of Farmak's School of Young Scientists with International involvement. Kyiv, November 21 st, 2019. P. 12–13.
21. Определитель высших растений Украины / М. И. Котов и др. Киев : Фитосоциоцентр, 1999. 548 с.
22. Мосякін С.Л. Рід *Bidens* L. (Asteraceae) у флорі УРСР. *Укр. ботан. журн.* 1988. № 45 (6). С.63–64.
23. Корожан Н.В., Бузук Г.Н. Сравнительное изучение морфологических и анатомодиагностических признаков травы видов череды. *Вестник фармации*, 2013. № 1 (59). С. 12–19.

24. До питання макроскопічної ідентифікації лікарської сировини череди трироздільної трави / О. Г. Вовк та ін. *Фармаком.* 2017. № 1. С. 17–23.
25. Растительные ресурсы СССР. Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейства ASTERACEAE / отв. ред. П. Д. Соколов. Санкт–Петербург : Наука, 1993. С. 76–79.
26. Kotova E. E., Kotov S. A., Kotov A. G. Study of chromatographic fingerprint of flavonoid compounds of the bur–marigold herb. *Scientific Study & Research – Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry.* 2021. Vol. XXII, № 1. P. 65–79.
27. Antioxidant activity of extracts and flavonoids from *Bidens tripartite* / M. Wolniak et al. *Acta Poloniae Pharmaceutica.* 2007. Vol. 64, № 5. P. 441–447.
28. Christensen L. P., Lam J., Thomasen T. A chalcones and other constituents of *Bidens tripartitus*. *Phytochem.* 1990. Vol. 29. P. 3155–3156.
29. Lv J.–L., Zhang L.–B. Flavonoids and polyacetylenes from the aerial parts of *Bidens tripartita*. *Biochem. Syst. Ecol.* 2013. Vol. 48. P. 42–44.
30. Composition of biologically active compounds, biological and pharmacological activity of the three-part beggarticks (*Bidens tripartita* L.) / M.N. Rodin et al. *Nat. Volatiles & Essent. Oils.* 2021. Vol. 8(5). P. 11039-11053.
31. Tomczykowa M., Gudej J., Majda T., Góra J. Essential oils of *Bidens tripartita*. *J Essent Oil Res.* 2005. Vol. 17, № 6. P.632–635.
32. Сербин А. Г. Химическое исследование фенольных соединений череды трехраздельной : автореф. дис. ... канд. фарм. наук: 15.00.02. Харьков, 1972. 22 с.
33. Исакова Т. И. Химическое и фармакологическое исследование флавоноидов и полисахаридов растений рода череда : автореф. дис. ... канд. фарм. наук: 15.00.02/ ХФИ. Харьков, 1980. 20 с.
34. Flavonoids and essential oil of *Bidens cernua* of Polish origin and *in vitro* antimicrobial activity of the oil / M. Tomczykowa et al. *Rec. Nat. Prod.* 2017. Vol. 11, № 5. P. 468–473.
35. Зузук Б.М., Куцик Р.В. Череда трироздільна — *Bidens tripartita* L. Аналітичний огляд. *Провізор.* 2006. № 22. С. 39–45; № 23. С. 27-30.

36. Al-Snafi A. E. Chemical constituents and pharmacological importance of *Bidens Tripartita*. *Indian Journal of Pharmaceutical Science & Research*. 2015. Vol. 5, № 4. P. 257–263.
37. Кароматов И. Дж, Абдувохидов А. Т. Известное лекарственное растение Череда трехраздельная. *Биология и интегративная медицина*. 2017. № 9. С. 12–22.
38. Bioactive polyacetylenes from *Bidens pilosa* / L. Alvarez et al. *Planta Med*. 1996. Vol. 62. P. 355–357.
39. Structures and antihistamine activity of chalcones & aurones compounds from *Bidens parviflora* Willd / J. Wang et al. *Journal of Traditional Medicines*. 2007. № 2. P. 23–29.
40. Anti-hyperglycaemic and antioxidant effects of *Bidens tripartite* and quantitative analysis on its active principles / N. Orhan et al. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2016. Vol. 19. P. 1114–1124.
41. Study of membrane-stabilizing and anti-inflammatory activity of tincture from herba *Bidens Tripartita* L./ T. Oproshanska et al. *PharmacologyOnLine*. 2021. № 3. P. 1863–1869.
42. The research of the regenerating activity of gels based on *Bidens Tripartita* herb extracts on mice and rats / D. A. Galkina et al. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*, 2012. Vol. 10, № 2. P. 54.
43. Каражан Н. В., Бузук Г. Н. Антианафилактическая активность настоев травы череды череды и противоаллергического сбора. *Вестник фармации*. 2015. № 2 (68). С. 57–61.
44. Каражан Н. В., Янчанка В. В., Бузук Г. Н. Влияние флавоноидов и полисахаридов череды на стабилизацию тучных клеток *in vitro*. *Вестник фармации*. 2014. № 3 (65). С. 100–104.
45. Суяров А. А., Комарин А. С. Влияние фракции флавоноидов, выделенной из череды трехраздельной в разных дозах на содержание гистамина при экспериментальной аллергии. *Журнал теоретической и клинической медицины*. 2016. № 1. С. 27–29.
46. Seelinger G., Merfort I., Schempp C. M. Anti-Oxidant, Anti-Inflammatory and Anti-Allergic Activities of Luteolin. *Planta Med*. 2008. Vol. 74. P. 1667–1677.

47. Luteolin Attenuates Allergic Nasal Inflammation via Inhibition of Interleukin-4 in an Allergic Rhinitis Mouse Model and Peripheral Blood From Human Subjects With Allergic Rhinitis / K. L. Liang et al. *Frontiers in Pharmacology*. 2020. Vol. 11. P. 1–14.
48. Изучение действия на лимфоидные органы и иммунологические показатели суммы полисахаридов череды трехраздельной по сравнению с иммуналом в эксперименте / А. А. Суяров и др. *Физиология и патология иммунной системы*. 2015. Т. 19, № 11. С. 28–32.
49. Суяров А. А., Джапаров А. К., Алимова М. Т. Изучение антиаллергического и иммуномодулирующего свойств экстракта череды трехраздельной. *Физиология и патология иммунной системы*. 2011. Т. 15, № 11. С. 29–33.
50. Anti-inflammatory activity of a HPLC-fingerprinted aqueous infusion of aerial part of *Bidens tripartita* L. / O. N. Pozharitskaya et al. *Phytomedicine*. 2010. Vol. 17, № 6. P. 463–468.
51. Novel in vitro and in silico insights of the multi-biological activities and chemical composition of *Bidens tripartita* L. / S. Uysal et al. *Food and Chemical Toxicology*. 2018. Vol. 111. P. 525–536.
52. Календула лекарственная (*Calendula officinalis* L.). Аналитический обзор/ Б.М. Зузук и др. *Химия растительного сырья*. 2001. № 4,5. С. 105-110.
53. Williamson E., Driver S., Baxter K. Stockley's herbal medicines interactions. London : Pharmaceutical Press, 2009. 432 p.
54. Review on Pharmacological Update: *Calendula officinalis* Linn. Inventi Impact / D. Mehta et al. *Planta Activa*, 2012. Vol. 4. P. 195–202.
55. Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae)/ A. Review et al. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2009. Vol. 8 (5). P. 455–465.
56. Растительные лекарственные средства / под ред. Н. Н. Максютинной, Н.Ф. Коммисаренко. Киев : Здоровье, 1985. 278 с.

57. Wichtl Max. Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals: A Handbook for Practice on a Scientific Basis. Berlin : Medpharm GmbH Scientific Publishers, 2004. 554 p.
58. Деркач А. И. Флавоноиды и терпениоды некоторых видов чистеца и календулы лекарственной : автореф. дис. ...канд. фармац. наук: 15.00.02/ВНИИХТЛС. Харьков, 1989. 24 с.
59. Olennikov D. N., Kashchenko N. I. Calendosides I–IV, new quercetin and isorhamnetin rhamnoglucosides from *Calendula officinalis*. *Chem. Nat. Compd.* 2014. Vol. 50. P. 633–637.
60. Riffat J., Nelofer J. *Calendula Officinalis*—An Important Medicinal Plant with Potential Biological Properties. *Proc Indian Natn Sci Acad.* 2017. Vol. 83, № 4. P. 769–787.
61. Zaki A. A., Ashour A. A., Qiu L. New sesquiterpene glycoside ester with antiprotozoal activity from the flowers of *Calendula officinalis* L. *Nat. Prod. Res.* 2021. Vol. 35. P. 5250–5254.
62. Rodrigues D. B. Mercadante A. Z. Mariutti L. R. B. Marigold carotenoids: much more than lutein esters. *Food Res. Int.* 2018. Vol. 119. P. 653–664.
63. Raal A., Kirsipuu K. Total flavonoid content in varieties of *Calendula officinalis* L. originating from different countries and cultivated in Estonia. *Nat Prod Res.* 2011. Vol. 25(6). P. 658–62.
64. Wagner H., Bladt S. Plant Drug Analysis: a thin layer chromatography atlas. Berlin : Springer–Verlag, 2009. 384 p.
65. Pietta P. Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.* 2000. Vol. 63. P.1035–1042.
66. Characterization of calendula flower, milk thistle fruit and passion flower tinctures by HPLC–DAD and HPLC–MS / A. R. Bilia et al. *Chromatographia.* 2000. Vol. 53. P.210–215.
67. Гудзенко А. В. Розробка підходів до стандартизації квіток нагідок лікарських у багатокомпонентних лікарських сумішах. *Фітотерапія. Часопис.* 2011. № 1. С. 80–83.
68. Varljen J., Lipták A., Wagner H. Structural analysis of a rhamnoarabinogalactan and arabinogalactans with immuno–stimulating activity from *Calendula officinalis*. *Phytochemistry.* 1989. Vol. 28. P. 2379–2383.

69. Composition of water-soluble polysaccharides from *Calendula officinalis* L. flowers / A. P. Korzh et al. *Pharm Chem J*. 2012. Vol. 46. P. 219–221.
70. Evaluation of antibacterial properties of marigold flowers (*Calendula officinalis* L.) and mother homeopathic tinctures of *Calendula officinalis* L, and *Calendula arvensis* L. / G. Dumenil et al. *Ann. Pharm, Fr*. 1980. Vol. 38, № 6. P. 493–499.
71. Structure and in vitro antiviral activity of sesquiterpene glycosides from *Calendula arvensis* / N. D. De Tomasi et al. *Jornal Natural Products*. 1990. Vol. 53, № 4. P. 830–835.
72. Blumenthal M., Goldberg A., Brinckmann J. Herbal medicine: Expanded commission E monographs. Newton, MA : Integrative Medicine Communications. 2000. 519 p.
73. Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid esters from Marigold (*Calendula officinalis* L.) / M. Hamburger et al. *Fitoterapia*. 2003. Vol. 74, № 4. P. 328–338.
74. Antioxidative activity of quercetin and quercetin monoglucosides in solution and phospholipid bilayers / K. Ioku et al. *Biochimica and Biophysica Acta*. 1995. № 1. P. 99–104.
75. Anand D. A. V., Arulmole R., Parasuraman S. Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid. *Pharmacogn Rev*. 2016. Vol. 10, № 20. P. 84–89.
76. Quercetin and Its Anti-Allergic Immune Response / J. Mlcek et al. *Molecules*. 2016. Vol. 21. 623 p.
77. Куцык Р. В., Зузук Б. М., Куровец Л. М. Лекарственные растения и перспективы антиаллергической терапии (обзор литературы). *Провизор*. 1998. № 8. С. 22.
78. Inhibitory activity of isorhamnetin glycosides from *Calendula officinalis* L. on the activity of lipoxygenase/ L. Bezákova et al. *Pharmazie*. 1996. Vol. 51, № 2. P. 126–127.
79. The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers / R. Della Loggia et al. *Planta Medica*. 1994. Vol. 60. P. 516–520.
80. Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid esters from Marigold (*Calendula officinalis*) / M. Hamburger et al. *Fitoterapia* 2003. Vol. 74, № 4. P. 328–338.
81. Schneider F., Reichembach Danski M. T., Vayego S. A. Usage of *Calendula officinalis* in the prevention and treatment of radiodermatitis: a randomized double-blind controlled clinical trial. *Journal of School Nursing USP*. 2015. Vol. 49, № 2. P. 220–226.

82. Anti-oedematous activities of the main triterpendiol esters of marigold (*Calendula officinalis* L.) / K. Zitterl-Eglseer et al. *J Ethnopharmacol.* 1997. Vol. 57. P. 139–144.
83. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейства Hydrangeaceae. – Haloragaceae. Ленинград : Наука, 1987. С. 34–42.
84. Державна Фармакопея України / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-ге вид. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. Т. 3. 732 с.
85. Chevallier A. Herbal remedies. New York : DK Publishing, 2007. 290 p.
86. American Herbal Pharmacopoeia: Hawthorn leaf with flower, *Crataegus* spp.: analytical, quality control, and therapeutic monograph / ed. R. Upton. Santa : Cruz, CA, 1999. 29 с.
87. Characterization of antioxidants present in Hawthorn fruits / Z. S. Zhahg et al. *Journal of Nutritional Biochemisrty.* 2001. Vol. 12, № 3. P.144–152.
88. Djumlja L. C. *Crataegus oxycantha*. *Australian Journal Medical Herbalism.* 1994. Vol. 6, № 2. P. 37–42.
89. Rehwald A., Meier B., Sticher O. Qualitative and quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography of flavonoids in *Crataegus* leaves and flowers. *Journal of Chromatography.* 1994. Vol. 677. P. 25–33.
90. Comparison and Validation of Bioactive flavonoids by Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography in *Crataegus* Species Related to Pharmaceutical *Crataegus* Product / N. Agiel et al. *Indian J Pharm Sci.* 2022. Vol. 84, № 2. P. 444–452.
91. Isolation and identification of oligomeric procyanidins from *Crataegus* leaves and flowers / U. Svedstrom et al. *Phytochemistry.* 2002. Vol. 60, № 8. P. 821–825.
92. High performance liquid chromatographic determination of oligomeric procyanidins from dimmers up to hexamer in hawthorn / U. Svedstrom et al. *J. Chromatography.* 2002. Vol. 968, № 1–2. P. 53–60.

93. Pittler M. N., Schmidt K., Ernst E. Hawthorn extract for treating chronic heart failure: meta-analysis of randomized trials. *American Journal Medicine*. 2003. Vol. 114, № 8. P. 665–674.
94. Eaton L. J., Kinkade S. Hawthorn extract improves chronic heart failure. *Journal of Family Practice*. 2003. Vol. 52, № 10. P. 753–754.
95. Adverse-event profile of Crataegus Spp. A systematic review / C. Daniele et al. *Drug Safety*, 2006. Vol. 29. P. 523–535.
96. Ngoc P. C. Water-Based Extraction of Bioactive Principles from Hawthorn, Blackcurrant Leaves and Chrysanthellum Americanum: from Experimental Laboratory Research to Homemade Preparations. Analytical chemistry. Montpellier, 2020. 328 p.
97. Schussler M., Holzl J., Fricke U. Myocardial effects of flavonoids from Crataegus species. *Arzneimittel forschung*. 1995. Vol. 45, № 8. P. 842–845.
98. Veveris M., Koch E., Chatterjee S. Crataegus special extract WS 1442 improves cardiac function and reduces infarct size in a rat model of prolonged coronary ischemia and reperfusion. *Life Sci*. 2004. Vol. 74. P. 1945–1955.
99. Koch E., Malek F. A. Standardized Extracts from Hawthorn Leaves and Flowers in the Treatment of Cardiovascular Disorders – Preclinical and Clinical Studies. *Planta Med*. 2011. Vol. 77, № 11. P. 1123–1128.
100. Государственная фармакопея СССР. Вып.2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. 11-е изд., доп. Москва : Медицина, 1989. 400 с.
101. Государственная фармакопея Республики Беларусь : в 3 т. Молодечо : Типография «Победа», 2016. Т. 2. 472 с.
102. Котов А. Г. Дослідження з розробки та введення монографій на лікарську рослинну до Державної Фармакопеї України. *Фармаком*. 2009. № 1. С. 5–19.
103. Котов С. А., Сербін А. Г., Котова Е. Е. Актуальність розробки сучасних методів стандартизації причепи трави. *Фармація ХХІ століття: тенденція та перспективи* : матеріали VIII нац. з'їзду фармацевтів України. Харків : НФаУ. 2016, Т. 1. С. 100–101.

104. Ringelblumenbluten: DAB 10. Stuttgart : Grundifg, 1996. 2156 p.
105. Czech Pharmacopoeia. Prague : Grada Publishing, 2002. 5567 p.
106. Calendula flower: European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg : European Department for the Quality of Medicines, 2021. P. 4353–4354.
107. Котова Е. Е. Стандартизація препаратів рослинного та тваринного походження, що містять флавоноїди та жирні олії : автореф. дис. ... канд. фармацевт. наук. 15.00.03/ДНЦЛЗ. Харків, 2005. 20 с.
108. Weißdornblätter und blüten: DAB 10. Stuttgart : Grundifg, 1996. 996 p.
109. Hawthorn leaf and flower: European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg : European Department for the Quality of Medicines. 2021. P. 4877–4878.
110. Комбінований лікувально–профілактичний засіб седативно–гіпотензивної дії : пат. на корисну модель 49161 України. № у 200909401 ; заяв.14.09.2009 ; опубл. 26.04.10, Бюл. № 8.
111. Засіб для лікування та профілактики сечокам'яної хвороби : пат. на корисну модель 49160 України. № у 200909393 ; заяв.14.09.2009 ; опубл. 26.04.10, Бюл. № 8.
112. Попова Н. В., Литвиненко В. І., Куцанян А. С. Лікарські рослини світової флори : енциклопед. довід. Харків : Діса плюс, 2016. 540 с.
113. Поліпрагмазія. *Фармацевтична енциклопедія*. URL: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/889/polipragmaziya> (дата звернення: 22.02.2023).
114. Кобзар А. Я., Гриценко О. М., Карпенко Л. М. Вивчення кореляційної залежності між фармакологічною активністю настоїв та відварів та окремих груп біологічно активних сполук з лікарської рослинної сировини. *Фармацевтичний журнал*. 1991. № 2. С. 72–76.
115. Лікарські засоби. Фармацевтична розробка (ICH Q8): Настанова СТ–Н МОЗУ 42–3.0:2011 / розроб. М. Ляпунов та ін. Вид. офіц. Київ : МОЗ України, 2011. 33 с.
116. Лікарські засоби. Фармацевтична розробка : Настанова 42–3.1:2004. Київ : МОРИОН, 2004. 15 с.

117. Шостак Т. А., Калинюк Т. Г., Гудзь Н. І. Особливості фармацевтичної розробки рослинних препаратів. *Фармацевтичний часопис*. 2014. № 4. С.77–82.
118. Сур С. В. Стандартизація підходів до оцінки якості рослинних лікарських засобів в умовах належної лабораторної практики : автореф. дис. ... на здобуття наук. ступеня д-ра фармацевт. наук: 15.00.03/ДНЦЛЗ. Харків, 2005. 37 с.
119. Дарзулі Н. П. Розробка складу, технології та дослідження таблетованих лікарських засобів на основі екстракту грушанки круглолистої : дис. ... канд. фармацевт. наук: 15.00.03. Львів, 2019. 233 с.
120. WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants. Geneva :World Health Organization, 2003. 72 p.
121. Державна фармакопея України. Допов. 5 / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2021. 424 с.
122. Державна фармакопея України: в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2-е вид. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. Т. 1. 1128 с.
123. Рыболовлев Ю. П., Сидляров Д. П., Афонин Н. И. Перерасчет константы биологической активности. Токсикологические аспекты безопасности готовых лекарственных форм. Москва : Мед. книга, 1981. С. 9–10.
124. Компендиум 2001/2002. Лекарственные препараты / за ред. В. М. Коваленко, О. П. Викторова. Київ : Морион, 2001. 1536 с.
125. Иммунологический статус лабораторных животных при моделировании состояний гиперчувствительности немедленного типа / А. А. Ацапкина и др. *Международный вестник ветеринари*. 2014. № 1. С. 91–99.
126. Weigle W. O., Cochrane C. G., Dixon F. J. Anaphylactogenic Properties of Soluble Antigen–Antibody Complexes in the Guinea Pig and Rabbit. *J Immunol*. 1960. Vol. 85. P 469–477.
127. Адо А. Д. Общая аллергология. Москва : Медицина, 1978. 463 с.

128. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общ. ред. чл.–кор. РАМН, проф. Р. У. Хабриева. Москва : ОАО «Издательство «Медицина», 2005. 832 с.
129. Корожан Н.В., Бузук Г.Н. Сравнительное изучение морфологических и анатомо-диагностических признаков травы видов череды. *Вестник фармации*. (Витебск). 2013. № 1 (59). С. 12–19.
130. Визначник рослин України / А. І. Барбарич та ін. Київ : Урожай, 1965. 875 с.
131. Котова Е. Е., Количев І. А., Котов А. Г., Котов С. А. Проблеми достовірної діагностики фармакопейного виду причепи. *Науково–технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів* : матеріали VI наук.–практ. конф. з міжнар. участю. Тернопіль : ТДМУ «Укрмедкнига», 2016. С. 52–53.
132. Державна фармакопея України. Допов. 2 / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2–е вид. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2018. 336 с.
133. Котов С. А., Гонтова Т. М., Соколова О. О. Удосконалення фармакопейної ідентифікації череди трави за макро– і мікроскопічними ознаками. *Вісник фармації*. 2022. № 1 (103). С. 3–9.
134. Котова Е. Е., Котов А. Г. Систематизація фармакопейних вимог до методів контролю якості лікарської рослинної сировини. Уніфіковані ТШХ–методики ідентифікації. *Фармаком*. 2015. № 1. С. 41–47.
135. Разработка ТСХ– методик идентификации и контроля примесей для национальной монографии Государственной Фармакопеи Украины «Череды трава» / Э. Э. Котова и др. *Вестник фармации*. (Витебск). 2017. № 3 (77). С. 62–67.
136. Naujokaitytė G., Maruška A., Ragažinskienė O. Phytochemical analysis of *Bidens tripartita* L. using spectrophotometric and liquid chromatographic methods. *Vital Nature Sign* : 9-th International Scientific Conference, Kaunas, 14–16 May 2015. Kaunas : Vytautas Magnus University, 2015. 135 с.

137. Каражан Н. В., Бузук Г. Н. Сравнительный анализ компонентного состава спиртовых экстрактов видов череды травы методом жидкостной хроматографии. *Вестник Фармации*. 2013. № 4 (62). С. 49–56.
138. Котова Э. Э., Тихоненко Н. И., Котов А. Г. Стандартизация травы душицы по количественному содержанию флавоноидов. *Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики*. 2011. Вип. XXIV, № 3. С. 38–42
139. Котова Э. Э. Стандартизация цветков ромашки по количественному содержанию суммы флавоноидов. *Фармаком*. 2007. № 3. С. 17–22.
140. Розробка методики кількісного визначення фенольних сполук у пижма квітках / М. Ю. Золотайкіна та ін. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2016. № 5 (22). Р. 34–40.
141. Kotov S., Gontova T. Evaluation of the polysaccharide fraction content of the bur-marigold herb by gravimetric and spectrophotometric methods. *Contemporary pharmacy: issues, challenges and expectations* : International e-conference, Kaunas, 23 October 2020. Kaunas : Lithuanian University of Health Sciences, 2020. Р. 38.
142. Котов С., Гонтова Т. Підходи до стандартизації череди трави за вмістом полісахаридів. *Planta+. Наука, практика та освіта* : матеріали Міжнар. наук.–практ. конф., м. Київ, 20 лют. 2023 р. Київ : Паливода А. В., 2023. Т. 2. С. 59–62.
143. Фармакопейні вимоги до методик контролю якості ЛРС: методичні рекомендації / А. Г. Котов та ін. ; НФаУ, Інститут підвищення кваліфікації спеціалістів фармації, ДП «Фармакопейний центр». Харків : НФаУ, 2016. 54 с.
144. Котов С. А., Гонтова Т. М., Котов А. Г. Аспекти проектування комбінованого засобу поліфункціональної дії на основі лікарської рослинної сировини. *Фармацевтичний журнал*. 2021. Т. 76, № 5. С. 57–67.
145. Ляпунов Н. А., Безуглая Е. П. Современная методология фармацевтической разработки лекарственных препаратов. *Фармацевтическая отрасль*. 2013. № 1 (36). 79–86 с.
146. Котов С. А., Гонтова Т. М., Котов А. Г. Технологічні аспекти екстракції череди трави, нагідок квіток і глоду листя та квіток. *Planta+. Наука, практика та освіта* :

матеріали Міжнар. наук.–практ. конф., м. Київ, 19 лют. 2021 р. Київ : Паливода А. В., 2021. С. 226–230.

147. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay / R. Re et al. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999. Vol. 26, № (9–10). P. 1231–1237.

148. Корреляционный анализ. Использование MSExcel для расчета коэффициента корреляции : учеб.–метод. пособие для студентов. Казань : ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет», 2011. 18 с.

149. Study of the dynamics extraction of biologically active substances from the bur-marigold herb and antioxidant activity of the obtained extracts / S.A. Kotov et al. *EUREKA: Health Sciences*. 2020. № 6. С. 95–101.

150. Котов С. А., Гонтова Т. М. Вивчення антиоксидантної активності череди трави неокупрайновим методом. *Topical issues of new medicines development*: матеріали XXVIII міжнар. наук.–практ. конф. молодих вчених та студентів, присвяч. 150-річчю з дня народж. М. О. Валяшка, м. Харків, 18–19 берез. 2021 р. Харків : НФаУ, 2021. С. 77–79.

151. Визначення вмісту біологічно активних речовин та антиоксидантної активності спиртових витягів нагідок лікарських / С. А. Котов та ін. *Сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження* : матеріали наук.–практ. дистанційної міжнар. конф., м. Івано–Франківськ, 19–20 трав. 2020 р. Івано–Франківськ : ІФНМУ, 2020. С.164–166 с.

152. Research of the component content of hawthorn leaves/flowers alcoholic extracts and their antioxidant activity / S. Kotov et al. *Danish Scientific Journal*. 2020. Vol. 38, № 1. P. 55–60.

153. Спосіб одержання комбінованого рослинного засобу антиалергічної дії : пат. на корисну модель 149399 України: № у 202008228 ; заяв. 22.12.2020 ; опубл. 17.11.2021, Бюл. № 46.

154. Фармацевтична композиція на основі лікарської рослинної сировини із антиалергічною дією : пат. на винахід 126141 України. № а 202008229 ; заяв. 22.12.2020 ; опубл. 17.08.2022, Бюл. № 33.
155. Алмакаєв М. С., Бегунова Н. В. Вибір параметрів технологічного процесу отримання капсул багатокомпонентного препарату нейротропної дії. *Фармаком*. 2017. № 4. С. 23–28.
156. Зависимость растворимости фенсукцинала от размера частиц / А. И. Гризодуб и др. *Фармаком*. 2008. № 1. С. 50–67.
157. Котов С. А., Гонтова Т. М. Фракційний склад капсульної маси комбінованого рослинного засобу антиалергічної дії методом лазерної дифракції. *Міждисциплінарні дослідження: гуманітарні та природничі науки* : матеріали наук.–практ. конф., м. Одеса, 22–23 лип. 2022 р. Одеса : Вид-во «Молодий вчений», 2022. С. 106–110.
158. Kotov S. Study of the water extracts composition from the combined herbal tea with antiallergic activity. *Журнал гепато–гастроэнтерологических исследований*. 2021. № 2 (1) : Современная медицина и фармацевтика: новые подходы и актуальные исследования : материалы 75–ой междунар. науч.–практ. конф. студентов–медиков и молодых учёных, г. Самарканд, 18 мая 2021 г. С. 135–136.
159. Isorhamnetin and Quercetin Derivatives as Anti–Acetylcholinesterase Principles of Marigold (*Calendula officinalis*) Flowers and Preparations / D. N. Olennikov et al. *International Journal Molecular Sciences*. 2017. Vol. 18, № 8. P. 1685–1694.
160. Flavonoids profile and antioxidant activity in flowers and leaves of hawthorn species (*Crataegus* spp.) from different regions of Iran / A. Alirezalu et al. *International Journal of Food Properties*. 2018. Vol. 21, № 1. P. 452–470.
161. Anandjiwala S., Kalola J. Y., Rajani M. Quantification of Eugenol, Luteolin, Ursolic Acid, and Oleanolic Acid in Black (Krishna Tulasi) and Green (Sri Tulasi) Varieties of *Ocimum sanctum* Linn. Using High–Performance Thin–Layer Chromatography. *Journal of AOAC Internathional*. 2006. Vol. 89, № 6. P. 1467–1474.

162. Phytochemical analysis and anti-allergic activity of a combined herbal medicine based on bur-marigold, calendula and hawthorn / S. Kotov et al. *Pharmacia*. 2022. Vol. 69, № 1. P. 237–247.
163. Котов С. А., Гонтова Т. М., Соколова О. О. Вивчення можливості ідентифікації індивідуальних рослин у багатокомпонентному лікарському рослинному засобі. *Фармацевтичний часопис*. 2021. № 3. С. 22–28.
164. (2800) Multi-ingredient dietary supplement products – development of quality tests: USP Dietary Supplement. URL: <https://www.uspnf.com/notices/gc-prospectus-2800-multi-ingredient-ds-product-dev-quality-tests> (Date of access: 31.01.2023).
165. Котов С., Гонтова Т., Котова Е. Вивчення хроматографічного профілю комбінованого лікарського рослинного екстракту. *Фармаком*. 2021. № 1/4. : Державна Фармакопея України – європейська якість вітчизняних лікарських засобів : матеріали наук.–практ. дистанц. конф., м. Харків, 25–26 листоп. 2021 р. С. 65–69.
166. Державна фармакопея України. Допов. 3 / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2018. С. 216–216.
167. Державна фармакопея України. Допов. 4 / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2019. С. 123–236.
168. Котов С. А., Гонтова Т. М. Стандартизація дозованої форми комбінованого рослинного засобу-антиалергічної дії. *Annals of Mechnikov's Institute*. 2022. № 4. С.42–51.
169. Wagner H. New approach in phytopharmacological research. *Pure Appl. Chem*. 1999. Vol. 71, № 9. P. 1649–1654.
170. Wagner H. Natural products chemistry and phytomedicine in the 21st century: New developments and challenges. *Pure and Applied Chemistry*. 2005. Vol. 77, № 1. P. 1–6.

171. Pendry Barbara Ann. Analysis of selected medicinal plants as antioxidants with therapeutic potential for treating diseases related to free radical damage: a thesis for the degree of Doctor of Philosophy. Dubai : Middlesex University, 2005. 282 p.
172. Allan K., Devereux G. Diet and asthma: Nutrition implications from prevention to treatment. *J. Am. Diet Assoc.* 2011. Vol. 111. P. 258–268.
173. Singh A., Holvoet S., Mercenier A. Dietary polyphenols in the prevention and treatment of allergic diseases. *Clin Exp Allergy.* 2011. Vol. 41. P. 1346–1359.
174. A comprehensive review of CUPRAC methodology / M. Özyürek et al. *Analytical Methods.* 2011. Vol. 3. P. 2439–2453.
175. Котов С. А., Гонтова Т. М. Вивчення залежності між вмістом поліфенолів в різних комбінаціях рослинних екстрактів та їх антиоксидантною активністю багатокomпонентного рослинного засобу антиалергічної дії. *Фармацевтичний журнал.* 2022. Т. 77, № 5. С. 65–73.
176. Руководство по иммунофармакологии / под ред. М. М. Дейла, Дж. К. Формена. Москва : Медицина, 1998. 332 с.
177. Зайков С. В., Богомолов А. Є. Анафілактичний шок: профілактика та лікування. *Астма та алергія.* 2016. № 1. С. 47–50.
178. Klein O., Sagi–Eisenberg R. Anaphylactic Degranulation of Mast Cells: Focus on Compound Exocytosis. *J Immunol Res.* 2019. Vol. 2019. P. 9542656.
179. Hiemori–Kondo M. Antioxidant compounds of *Petasites japonicus* and their preventive effects in chronic diseases: a review. *J Clin Biochem Nutr.* 2020. Vol. 67, № 1. P.10–18.

Додаток А

Таблиця А1

Морфологічні ознаки видів роду череда (*Bidens* L.) та подібних видів флори України

Органи рослини	Морфологічні ознаки				
	Ч. трироздільна (<i>B. tripartita</i> L.)	Ч. поникла (<i>B. cernua</i> L.)	Ч. променева (<i>B. radiata</i> Thuill.)	Ч. листяна (<i>B. frondosa</i> L.)	Ч. східна (<i>B. orientalis</i> Velen.)
1	2	3	4	5	6
Стебла	Прямостоячі, 15-60 (100) см заввишки, галузяться майже від основи , голі, іноді з рідкими волосками, зелені або зеленувато-фіолетові, несуть 1-4 кошики	Прямостоячі, частіше вгорі розгалужені , 15-100 см заввишки, голі, іноді з рідкими волосками	Прямостоячі, 20-100 см заввишки, у верхній частині більш-менш галузисті , голі або рідко опушені	Прямостоячі, 20-90 (200) см заввишки, майже голі, розгалужені, з довгими верхніми міжвузлями	Прямостоячі, 20-40 см заввишки, майже від основи щиткоподібні розгалужені
Листки	Темно-зелені , супротивні (верхні бувають черговими), знизу без помітно виступаючих жилок; короткочерешкові, черешки зрослі основами, крилаті; верхні листки цілісні, решта 3-5-роздільні та ланцетні, пилчасті вздовж краю долі	Жовтаво-зелені, цілісні , супротивні, сидячі, майже зрослі основами, видовжено-ланцетні, з пилчастозубчастими краями	Жовтаво-зелені , супротивні, довго-черешкові, черешки крилаті , 1.5-2.5 см завдовжки, 3-5-роздільні або розсічені , з ланцетними або яйцеподібно-ромбічними пилчастозубчастими долями, із них кінцева значно перевищує інші	Темно-зелені зверху, світло-зелені знизу, з помітно виступаючими жилками, супротивні, довгочерешкові, черешки не крилаті , серединні листки з 3-5-глибоко розсіченою пластинкою, виїмки між сегментами досягають середньої жилки, сегменти видовжені, із загостреною верхівкою та крупно зубчастим краєм,	Черешкові, нижні листки цілісні , зарубчастопилчасті, верхні трійчаторозчленовані , гострозубчасті
Суцвіття-кошики	Прямостоячі , 0.6-1.5 см у діаметрі, ширина їх	Пониклі , на довгих ніжках, 10-20 мм завширшки,	Прямостоячі , 12-15 мм у діаметрі, їх ширина	Прямостоячі , 10-20 мм у діаметрі, ширина	Прямостоячі , ширина в 2-3 рази

Продовження табл. А1

1	2	3	4	5	6
	майже дорівнює висоті	ширина в 2-3 рази перевищує висоту	вдвічі перевищує висоту	перевищує висоту	перевищує висоту
Зовнішні листочки обгортки	Зелені, листкопо-дібні, в числі 5-8, довгасто-ланцетні, опушені вздовж краю, рівні або вдвічі перевищують кошик	Зелені, в числі 5-9, листкоподібні, довгасто-ланцетні, значно довші внутрішніх, вздовж краю шипувато-війчасті	Жовтаві, листко-подібні, в числі 10-14, лінійно-довгасті, вздовж краю шипувато-війчасті, значно перевищують обгортку, оточуючи її у вигляді променів	Листоподібні, в числі 4-8, розпростерті, до 30 мм завдовжки, деколи опушені біля основи	Зелені, довгасто ланцетні, в числі 10-12
Внутрішні листочки обгортки	Коричнювато-жовті, з численними темно-фіолетовими жилками на спинці, плівчасті вздовж краю, овальні, коротші за зовнішні	Коричнювато-зелені, широко-яйцеподібні, майже однакової довжини з квітками		Чорнуваті, до 10 мм завдовжки, прямі, яйцеподібно-видовжені, голі, шилоподібні	Рижувато-буруваті
Приквітки	Плівчасті, численні, рівні за довжиною квіткам і сім'янкам, ланцетні, з поступово загостреною верхівкою	Плівчасті, довгасто клиноподібні, рівні за довжиною квіткам і сім'янкам	Плівчасті, жовтаві, довші за сім'янки	На верхівці різко загострені	Лінійні або лінійно-довгасті, рівні за довжиною сім'янкам або довші за них
Квітки	Бруднувато-жовті, трубчасті, двостатеві	Крайові несправжньо-язичкові, золотисто-жовті, стерильні, серединні трубчасті, двостатеві	Крайові несправжньо-язичкові, золотисто-жовті, стерильні, серединні трубчасті, двостатеві	Крайові несправжньо-язичкові, золотисто-жовті, стерильні, серединні трубчасті, двостатеві	Трубчасті, жовті

Продовження табл. А1

1	2	3	4	5	6
Плоди – сім'янки	Сплюснуті, клино-подібні, до 8 мм завдовжки, звичайно з 2, рідко 3 остюками замість чашечки, вкриті вздовж бічних ребер і остюків щетинками, верхівки яких спрямовані донизу	Пірамідальні, ребристі, мають 3 спинних і 1 черевне ребро, звичайно з 4 остюками, із них черевний остюк коротший спинних, ребра та остюки вкриті щетинками, верхівки яких спрямовані донизу	Плоскі, з 2-3 остюками, що дорівнюють сім'янці або навіть коротші за неї, голі, але вздовж країв та остюків несуть щетинки, що верхівками спрямовані донизу	Сплюснуті, клино-подібні, 5-8 мм завдовжки, густо вкриті бородавками та притисненими щетинками, верхівки яких спрямовані догори, переважно із 2 остюками, вкритими 2 рядами щетинок, верхівки яких спрямовані донизу	Плоскі, з 2-3 остюками

Таблиця А2

ВЕРХ результати для 8 зразків череди трави

Речовина	Час утримування, хв/тах*	RS 700	RS 707	RS 708	RS 717	RS 1053	RS 1081	RS 1090	RS 1093
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Хлорогенова к-та	9.1-9.4/ 220nm, 245nm, 327nm	3.4**	4.1	5.9	11.4	2.2	3.2	6.7	2.6
Невідома к-та	10.7-11.0/ 217nm, 242nm, 325nm	1.9	1.2	0.7	0.8	1.9	0.9	2.0	1.5
Кофейна к-та	11.1-11.6/ 217nm, 242nm, 326nm	3.4	2.0	1.0	2.1	2.6	2.3	3.9	6.0
Невідома	12.9-13.5/ 215nm, 280nm, 343nm	7.5	3.5	-	-	5.9	5.3	-	-
Рутин	15.1	-	-	-	-	-	-	-	-
Гіперозид	15.5-15.8/ 254nm, 353nm	-	3.3	3.1	2.2	2.9		3.5	-
Лютеолін-7-глюкозид	17.0-17.3/ 254nm, 267nm, 350 nm	47.9	31.6	29.5	16.4	31.7	44.5	43.3	63

Продовження табл. А2

		3	4	5	6	1	2	9	10
Лютеолін глікозид	17.4-17.8/ 253nm, 267nm, 348nm	-	2.5	12.7	-	2.2	2.6	13.0	11.6
Невідома к-та	19.7/242nm, 295nm, 325nm	3.1	2.0	1.7	-	-	-	-	-
Поліацети лени	20.5-20.9/ 230nm, 257nm, 270 nm	1.5	1.1	0.9	-	3.7	1.0	1.1	-
Кверцитри н	20.7-21.0/ 256nm, 347nm	-	-	15.7	29.2	3.4	-	-	2.8
Невідома к-та	21.3-21.4/ 220nm, 245nm, 327nm	-	4.5	-	-	1.9	4.6	6.9	-
Апігенін-7- глюкозид	21.7-22.1	-	-	-	-	2.6	-	-	-
Невідомий халкон	23.0-23.5/ 263nm, 380nm	10.1	9.8	8.7	11.8	1.4	7.6	9.6	8.3
Невідома к-та	25.0-26.7/ 220nm, 327 nm	2.0	3.1	3.5	5.7	3.3	2.8	2.4	-
Невідома	27.7-28.7	2.9	3.3	2.2	1.8	4.3	4.0	-	-
Невідома	30.3-31.2	6.9	3.8	-	-	-	4.7	-	-
Невідома к-та	34.5-35.0/ 242nm, 325nm	6.4	12.4	2.6	-	-	5.3	-	-
Кверцитин	36.3-36.8/ 254nm, 368nm	0.6	1.8	3.4	8.2	-	-	-	-
Лютеолін	37.0-37.5/ 252nm, 267nm, 347nm	1.1	2.2	2.8	-	12.4	5.3	1.5	3.2
Невідома	38.0-38.7 /310nm, 382nm	-	2.1	-	-	4.1	-	2.6	-
Невідома	40.5-41.7	1.9	1.6	2.2	3.0	2.9	3.0	1.1	1.0

Примітки:

* max – максимум УФ- спектра,

** вміст (%) розраховували як відношення площ окремих піків на хроматограмі до загальної площі всіх хроматографічних піків

Продовж. дод. А

Таблиця А3

**Кореляційна залежність між КО фармакологічної активності ЛРС у досліджуваних рослинних
комбінаціях і вмістом БАР в них**

Фармакол огічна дія	БАР	Флавоноїди		Оксикоричні кислоти		Поліфеноли		Тритерпени		Антоціани		Білки/амінок ислоти		Полісахариди	
		p*	Tkp*	p	Tkp	p	Tkp	p	Tkp	p	Tkp	p	Tkp	p	Tkp
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Капіляро- зміцнювальна		0,699	0,77	0,999	0,05	0,982	0,20	0,999	0,05	0,370	1,0	0,999	0,05	0,999	0,05
Протизапальна		0,699	0,77	0,999	0,05	0,982	0,20	0,999	0,05	0,371	1,0	0,999	0,05	0,999	0,05
Імуностимулю юча		0,699	0,77	0,999	0,05	0,982	0,20	0,999	0,05	0,371	1,0	0,999	0,05	0,999	0,05
Жовчогінна		0,699	0,77	0,999	0,05	0,982	0,20	0,999	0,05	0,371	1,0	0,999	0,05	0,999	0,05
Гепатопротек- торна		0,699	0,77	0,999	0,05	0,982	0,20	0,999	0,05	0,371	1,0	0,999	0,05	0,999	0,05
Поліпшує обмін речовин		0,699	0,77	0,999	0,05	0,982	0,20	0,999	0,05	0,370	1,0	0,999	0,05	0,999	0,05
Сечогінна		0,970	0,27	0,820	0,62	0,880	0,50	0,820	0,62	0,820	0,62	0,820	0,62	0,820	0,62
Гіпотензивна		0,650	0,82	0,982	0,2	0,970	0,27	0,982	0,2	0,352	1,01	0,982	0,2	0,982	0,2
Заспокійлива		0,650	0,82	0,982	0,20	0,970	0,27	0,982	0,20	0,349	1,01	0,982	0,20	0,982	0,20

Продовження табл.А3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Загальнозміцнювальна	0,651	0,82	0,982	0,20	0,970	0,27	0,982	0,20	0,349	1,01	0,982	0,20	0,982	0,20
Десенсибілізуюча	0,699	0,77	0,999	0,05	0,982	0,20	0,999	0,05	0,371	1,0	0,999	0,05	0,999	0,05
Протисвербіжна	0,699	0,77	0,999	0,05	0,982	0,20	0,999	0,05	0,371	1,0	0,999	0,05	0,999	0,05
Репаративна	0,394	0,99	0,852	0,56	0,827	0,60	0,852	0,56	0,177	1,0	0,852	0,56	0,852	0,56
Потогінна	0,699	0,77	0,999	0,05	0,982	0,20	0,999	0,05	0,369	1,0	0,999	0,05	0,999	0,05
Спазмолітична	0,651	0,82	0,356	1,0	0,368	1,0	0,356	1,0	0,380	0,99	0,356	1,0	0,356	1,0
Судиннорозширювальна	0,654	0,82	0,356	1,0	0,368	1,0	0,356	1,0	0,380	0,99	0,356	1,0	0,356	1,0
Кардіотонічна	0,029	1,07	0,603	0,86	0,562	0,89	0,603	0,86	0,079	1,07	0,603	0,86	0,603	0,86
Анальгезуюча	0,122	1,07	0,549	0,90	0,482	0,94	0,549	0,90	0,230	1,04	0,549	0,90	0,549	0,90

*р- коефіцієнт рангової кореляції Спірмена, Т_{кр}- значимість коефіцієнта

Таблиця А.4

ВЕРХ результати для сухих екстрактів череди, нагідок, глоду і комбінованого екстракту

Стандарти	Час утримування, хв/макс. УФ- поглинання	Череди екстракт*	Нагідок екстракт	Глоду екстракт	Комбінов аний екстракт
1	2	3	4	5	6
Невідома кислота (у перерахунку на хлорогенову)	7,9-8,2/210, 295, 325нм			2,7±0,10	1,3±0,07
Невідома кислота (у перерахунку на хлорогенову)	12,7-13,0/212, 297, 325 нм			14,6±0,37	6,0±0,14
Хлорогенова кислота	13,4-13,7/215, 295, 325нм		2,7±0,09	4,2±0,12	2,2±0,08
Кофейна кислота	16,7-17,0/218, 298, 325нм			0,9±0,05	
Невідома кислота (у перерахунку на кофейну)	19,0–19,1/215, 295, 325нм	2,4±0,07			1,0±0,07
Похідне ізорамнетину (в перерахунку на тифанеозид)	23,3–23,5/253, 265, 353 нм		1,3±0,10		
Вітексин 2''-О-рамнозид (у перерахунку на вітексин)	24,2–24,4/212, 267, 340 нм			12,9±0,16	1,8±0,11
Тифанеозид (ізорамнетин-3- О-(2'',6''-ди-рамнозил)- глюкозид)	25,0–25,3/253, 265, 355 нм		5,4±0,13		1,5±0,10
Вітексин	26,4–26,5/213, 268, 337 нм			0,5±0,08	
Рутин	28,2–28,5/210, 255, 354 нм			7,2±0,19	0,8±0,12
Календофлавозид (ізорамнетин-3-О-(2''- рамнозил)-глюкозид	29,5–30,0/253, 267, 355нм		3,8±0,12		1,1±0,08
Гіперозид	30,4–30,6/254, 352нм			4,6±0,13	2,5±0,09
Лютеолін-7-глюкозид	31,2-31,6/254, 265, 347нм	10,0±0,25		1,3±0,06	5,5±0,18
Нарцисин (ізорамнетин-3-О- рутинозид)	34,5–34,8/253, 265, 355 нм		4,8±0,21		2,4±0,13
Похідне вітексину (в перерахунку на вітексин)	36,6–36,9/212, 267, 337 нм			5,8±0,20	
Кверцетин	45,2-45,4/255, 365нм		0,4±0,06	0,8±0,07	

Продовж. табл. А.4

1	2	3	4	5	6
Лютеолін	45,3-45,5/254, 265, 347нм	9,5±0,18			3,7±0,22
Сума кислот, мг/г екстракту,		2,4±0,09	2,8±0,11	22,4±0,55	10,5±0,3
Сума флавоноїдів, мг/г екстракту		19,5±0,34	15,7±0,3	33,1±0,48	19,3±0,3

Таблиця А.5

Специфікація до проекту МКЯ «Асенсефіт чай» у фільтр-пакетах

Показники за проектом МКЯ	Вимоги	Методи аналізу
1	2	3
Опис	Суміш шматочків різної форми сірувато-зеленого кольору з білими, жовтими, коричнюватими включеннями, що проходять крізь сито з отворами діаметром 3 мм. Запах слабкий, ароматний	Візуально
Ідентифікація	<i>Ідентифікація А.</i> При перегляді збору повинні бути видні плівчасті ланцетні приквітки; фрагменти плодів сім'янок з 2 або 3 остюками, вкритими щетинками, спрямованими донизу; частини листків буро-зеленого кольору (череди трава); трубчасті серединні квітки з п'яти-зубчастим віночком жовтаво-коричневого кольору, фрагменти крайових квіток яскраво-жовтого кольору, фрагменти обгортки із лінійних сіро-зелених, загострених опушених листочків (нагідок квітки); фрагменти пелюсток віночка квітки жовтувато-білого кольору; фрагменти листків зверху яскраво зеленого кольору, знизу світліші, деколи із восковою поволокою або сіро-зелені; фрагменти кори пагона коричневого кольору (глоду листя і квітки)	Візуально за допомогою бінокулярного мікроскопа
	<i>Ідентифікація В.</i> На мікропрепаратах збору мають бути видимі: епідерма листочків обгортки з видовжених прямокутних тонкостінних клітин і членистих секреторних каналів; цілі або фрагментовані багатоклітинні однорядні покривні волоски зі складчастою кутикулою; гіподерма насінної шкірки з пігментованих темно-коричневих клітин і прилеглим нижнім шаром жовтуватих склереїд (череди трава); епідерма крайових або серединних квіток з видовжених клітин, вкритих складчастою кутикулою, із жовтими хромопластами; фрагменти багатоклітинних дворядних покривних залозистих волосків з голівкою із 2 або 4 клітин (нагідок	Візуально за допомогою світлового мікроскопа

Продовження табл.А.5

1	2	3
	квітки); фрагменти багатоклітинних однорядних волосків; верхня епідерма листа з багатокутних клітин з потовщеними оболонками; одноклітинні покривні товстостінні волоски, округлі пилкові зерна згладенькою або дрібнозернистою екзиною (глоду листа та квітки). <i>Ідентифікація С.</i> На хроматограмі випробовуваного розчину мають бути наявні: 2 зеленуваті флуоресціюючі зони в нижній третині хроматограми (нагідки); жовта флуоресціююча зона на рівні зони рутину (нагідки, глід); інтенсивна жовта флуоресціююча зона в середній частині (череда і глід); 2 коричнювато-червоні зони, розташовані вище та нижче за неї (череда); 2 інтенсивні блакитні флуоресціюючі зони у верхній третині хроматограми (череда, нагідки, глід); 2 червоні флуоресціюючі зони, розташовані близько до фронту розчинника (череда, глід). <i>Ідентифікація D.</i> На хроматограмі випробовуваного розчину мають бути наявні в нижній половині хроматограми 2 фіолетові зони, розташовані на рівні відповідних зон на хроматограмі розчину СЗ календулозидів	Метод ТШХ, ДФУ 2.2.25 Метод ТШХ, ДФУ 2.2.25
Однорідність маси	1,7 г ± 10 %	ДФУ 2.0 «Лікарські рослинні чаї» 1 том, с.1035
Втрата в масі під час висушування	Не більше 12%	ДФУ 2.5. 2.2.32
Загальна зола	Не більше 10 %	ДФУ 2.4.16
Мікробіологічна чистота	В препараті допускається загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів: не більше 10^7 бактерій і не більше 10^5 грибів в 1 г. Допускається наявність не більше 10^3 <i>Escherichia coli</i> в 1 г.	ДФУ 2.4, 5.1.8
Кількісне визначення	Не менше 5 мг поліфенолів в 1 фільтр-пакеті Не менше 70 мг суми полісахаридів в 1 фільтр-пакеті	СФ- метод ДФУ 2.8.14 Гравиметричний метод

Додаток Б

Список публікацій здобувача

Наукові статті

1. Котова Э.Э., Котов А.Г., Колычев И.А., Котов С.А. Разработка ТСХ- методик идентификации и контроля примесей для национальной монографии Государственной Фармакопеи Украины «Череды трава». *Вестник фармации*. (Витебск). 2017. № 3 (77). С. 62–67.
2. Вовк О.Г., Котов А.Г., Котова Е.Е., Количев І.О., Котов С.А. До питання макроскопічної ідентифікації лікарської сировини череди трироздільної трави. *Фармаком*. 2017. № 1. С.17-23.
3. Kotov S., Kotova E., Bezruk I., Gontova T., Kotov A. A Research of the component content of hawthorn leaves/flowers alcoholic extracts and their antioxidant activity. *Danish Scientific Journal*. 2020. №38 (1). С. 55-60.
4. Kotov S.A, Kotova E.E., Bezruk I. V., Gontova T.N., Kotov A.G. Study of the dynamics extraction of biologically active substances from the bur-marigold herb and antioxidant activity of the obtained extracts. *EUREKA: Health Sciences*. 2020. № 6. С. 95-101.
5. Kotova E. E., Kotov S. A., Kotov A. G. Study of chromatographic fingerprint of flavonoid compounds of the bur-marigold herb. Study of chromatographic fingerprint of flavonoid compounds of the bur-marigold herb. *Scientific Study & Research - Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*. 2021. XXII (1). P. 65-79.
6. Котов С. А., Гонтова Т. М., Котов А. Г. Аспекти проектування комбінованого засобу поліфункціональної дії на основі лікарської рослинної сировини. *Фармацевтичний журнал*. 2021. Т. 76 (5). С. 57-67.
7. Котов С. А., Гонтова Т. М., Соколова О. О. Вивчення можливості ідентифікації індивідуальних рослин у багатокомпонентному лікарському рослинному засобі. *Фармацевтичний часопис*. 2021. No 3. С.22-28.

8. Котов С. А., Гонтова Т. М., Соколова О. О. Удосконалення фармакопейної ідентифікації череди трави за макро- і мікроскопічними ознаками. *Вісник фармації*. 2022. № 1 (103). С.3-9.

9. Kotov S., Gontova T., Kononenko N., Chernyavski E., Chikitkina V. Phytochemical analysis and anti-allergic activity of a combined herbal medicine based on bur-marigold, calendula and hawthorn. *Pharmacia*. 2022. 69 (1). P. 237-247.

10. Котов С.А., Гонтова Т.М. Стандартизація дозованої форми комбінованого рослинного засобу антиалергічної дії. *Annals of Mechnikov's Institute*. 2022. № 4. С. 42–51.

11. Котов С.А., Гонтова Т.М. Вивчення залежності між вмістом поліфенолів в різних комбінаціях рослинних екстрактів та їх антиоксидантною активністю багатокомпонентного рослинного засобу антиалергічної дії. *Фармацевтичний журнал*. 2022, Т. 77 (5). С.65-73.

Патенти

12. Спосіб одержання комбінованого рослинного засобу антиалергічної дії .Котов С.А., Котов А.Г., Гонтова Т.М., Кононенко Н.М., Чернявські Е.С., Рубан О.А.: пат. на корисну модель 149399 України: МПК А61К36/60, А61К127/00, А61К133/00. № u 2020 08228; заяв. 22.12.2020; опубл. 17.11.2021, Бюл. № 46.

13. Фармацевтична композиція на основі лікарської рослинної сировини із антиалергічною дією. Котов С. А., Котов А.Г., Гонтова Т.М., Кононенко Н.М., Чернявські Е.С., Рубан О.А.: пат. на винахід 126141 України: МПК А61К 36/28, А61К 36/734, А61К 127/00, А61К 133/00. № а 2020 08229; заяв. 22.12.2020; опубл. 17.08.2022, Бюл. № 33.

Тези доповідей

14. Kotov S. Precondition to the development of the herbal medicinal product with desensitizing activity. *Science and Modern Pharmaceutical Manufacturing: materials of VII Scientific and Practical Conference of Farmak's School of Young Scientists with*

International involvement. Kyiv, November 21 st, 2019. *Укр. Мед. Часопис*. 2019. Т. 2. N 6 (134). С. 12–13.

15. Котов С.А., Котова Е.Е., Безрук І. В., Гонтова Т.М., Котов А.Г. Визначення вмісту біологічно активних речовин та антиоксидантної активності спиртових витягів нагідків лікарських. *Сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження*: матеріали наук.-практ. дистанційної між нар. конфер., 19-20 травня 2020 р., м. Івано-Франківськ. Івано-Франківськ: ІФНМУ, 2020. С. 164-166 с.

16. Kotov S., Gontova T. Evaluation of the polysaccharide fraction content of the bur-marigold herb by gravimetric and spectrophotometric methods. *Contemporary pharmacy: issues, challenges and expectations*: International e-conference. 23 October 2020, Kaunas. Kaunas: Lithuanian University of Health Sciences, 2020. P. 38.

17. Котов С.А., Гонтова Т.М., Котов А.Г. Технологічні аспекти екстракції череди трави, нагідок квіток і глоду листя та квіток. *Planta+. Наука, практика та освіта*: матеріали міжнар. наук.-практ. конф., м. Київ, 19 лют. 2021 р. Київ : Паливода А. В., 2021. С. 226–230.

18. Котов С.А., Гонтова Т.М. Вивчення антиоксидантної активності череди трави неокупрайновим методом. *Topical issues of new medicines development*: матеріали XXVIII міжнар. наук.-практ. конф. Молодих вчених та студ., присвяч. 150-річчю з дня народження М.О. Валяшка, м. Харків, 18-19 березня 2021 р. Харків: , С. 77-79.

19. Kotov Semen. Study of the water extracts composition from the combined herbal tea with antiallergic activity. *Современная медицина и фармацевтика: новые подходы и актуальные исследования*: материалы 75-ой междунар. научно-практ. конфер студентов-медиков и молодых учёных. г. Самарканд, 18 мая 2021 г. Журнал гепато-гастроэнтерологических исследований. 2021. № 2 (1). С. 135–136.

20. Котов Семен, Гонтова Тетяна, Котова Еліна. Вивчення хроматографічного профілю комбінованого лікарського рослинного екстракту. *Державна Фармакопея України — європейська якість вітчизняних лікарських засобів*: матеріали наук.-практ.

дистанц. конфер., м. Харків, 25-26 листопада 2021 року. Фармаком. 2021. №1/4. С. 65-69.

21. Котов С.А., Гонтова Т.М. Фракційний склад капсульної маси комбінованого рослинного засобу антиалергічної дії методом лазерної дифракції. *Міждисциплінарні дослідження: гуманітарні та природничі науки*: матеріали наук.-практич. конференції м. Одеса, 22-23 липня 2022 р.. – Одеса: Видавництво «Молодий вчений», 2022. – С. 106-110.

22. Котов С., Гонтова Т. Підходи до стандартизації череди трави за вмістом полісахаридів. *Planta+. Наука, практика та освіта*: матеріали міжнар. наук.-практ. конф., м. Київ, 20 лют. 2023 р. Київ : Паливода А. В., 2023. С. 59-62.

Продовж. дод. Б

Апробація результатів дисертації

Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня:

1. VII Scientific and Practical Conference of Farmak's School of Young Scientists with International involvement «*Science and Modern Pharmaceutical Manufacturing*» (м. Київ, 21 листопада 2019, форма участі – публікація тез);

2. Науково-практична дистанційна міжнародна конференція «*Сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження*» (м. Івано-Франківськ, 19-20 травня 2020 р., форма участі – публікація тез);

3. International e-conference «*Contemporary pharmacy: issues, challenges and expectations*» (Kaunas, 23 October 2020, форма участі – публікація тез);

4. Міжнародна науково-практична конференція «*Planta+. Наука, практика та освіта*» (м. Київ, 19 лют. 2021 р., форма участі – публікація тез);

5. XXVIII міжнар. наук.-практ. конф. Молодих вчених та студ., присвяч. 150-річчю з дня народження М.О. Валяшка «*Topical issues of new medicines development*» (м. Харків, 18-19 березня 2021 р., форма участі – публікація тез);

6. 75-ая международная научно-практическая конференция студентов-медиков и молодых учёных «*Современная медицина и фармацевтика: новые подходы и актуальные исследования*» (г. Самарканд, 18 мая 2021 г., форма участі – публікація тез);

7. Науково-практична дистанційна конференція «*Державна Фармакопея України – європейська якість вітчизняних лікарських засобів*» (м. Харків, 25-26 листопада 2021 р., форма участі – публікація тез);

8. Науково-практична конференція «*Міждисциплінарні дослідження: гуманітарні та природничі науки*» (м. Одеса, 22-23 липня 2022 р.. форма участі – публікація тез);

9. Міжнародна науково-практична конференція «*Planta+. Наука, практика та освіта*» (м. Київ, 20 лют. 2023 р., форма участі – публікація тез)

ДОДАТОК В



Продовж. дод. В



Продовж. дод. В

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ
З ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ
ТА КОНТРОЛЮ ЗА НАРКОТИКАМИ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВИЙ
ФАРМАКОПЕЙНИЙ ЦЕНТР
ЯКОСТІ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ"



STATE SERVICE OF UKRAINE
ON MEDICINES
AND DRUGS CONTROL
STATE ENTERPRISE
"UKRAINIAN SCIENTIFIC
PHARMACOPOEIAL CENTER
FOR QUALITY OF MEDICINES"

61085, м. Харків, вул. Астрономічна, 33. <http://www.sphu.org>. E-mail: phukr@sphukr.kharkov.ua
Тел.: +38 099 2932583 фс. 3, +38 050 4056222 ІНІІТ, +38 099 1800602 ІФА, +38 099 1800603 гр. бюд. методич.,
+38 099 1800601 бухгалтерія, +38 099 1800604 бібліотечна.

Від 18.03.2020 № 4/323-5
На _____ № _____

Акт про участь Котова С.А. у розробці монографії «Череди трава»

Котов С.А. у складі групи «Лікарська рослинна сировина» ДП «Фармакопейний центр», брав участь в експериментальних дослідженнях щодо розробки методики ідентифікації і контролю інших видів методом тонкошарової хроматографії у лікарській рослинній сировині в процесі розробки національної монографії на Череди траву у відповідності до вимог ДФУ та ЄФ.
В результаті був розроблений проєкт розділів Ідентифікація С і «Інші види череди» (тонкошарова хроматографія) для національної монографії «Череди трава» у ДФУ 2.2.

Директор ДП «Фармакопейний центр»,
д.х.н., професор



О.І. Гризодуб

Продовж. дод.В

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ
З ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ
ТА КОНТРОЛЮ ЗА НАРКОТИКАМИ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВИЙ
ФАРМАКОПЕЙНИЙ ЦЕНТР
ЯКОСТІ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ"



STATE SERVICE OF UKRAINE
ON MEDICINES
AND DRUGS CONTROL
STATE ENTERPRISE
"UKRAINIAN SCIENTIFIC
PHARMACOPOEIAL CENTER
FOR QUALITY OF MEDICINES"

61085, м. Харків, вул. Астрономічна, 33. <http://www.sphu.org> E-mail: phukr@phukr.kharkov.ua
Тел.: +38 099 2932583 фс. 1, +38 050 4056222 ППТ, +38 099 1800602 ЛФА, +38 099 1800603 гр. біол. методів,
+38 099 1800601 бухгалтерія, +38 099 1800604 відділ кадрів

Від 18.03.2020 № 11/321-5
На _____ № _____

Акт про участь Котова С.А. у розробці монографії
«Череди трава №»

Котов С.А. у складі групи «Лікарська рослинна сировина» ДП «Фармакопейний центр», брав участь в експериментальних дослідженнях щодо вивчення сторонніх домішок, втрати в масі при висушуванні, загальної золи і кількісного визначення у лікарській рослинній сировині в процесі розробки національної монографії на Череди траву у відповідності до вимог ДФУ та ЄФ. В результаті був розроблений розділ «Випробування» і «Кількісне визначення» для національної монографії «Череди трава №» в ДФУ 2.2.

Директор ДП «Фармакопейний центр»,
д.х.н., професор



О.І. Гризодуб

Продовж дод.В

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ
З ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ
ТА КОНТРОЛЮ ЗА НАРКОТИКАМИ

ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВИЙ
ФАРМАКОПЕЙНИЙ ЦЕНТР
ЯКОСТІ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ"



STATE SERVICE OF UKRAINE
ON MEDICINES
AND DRUGS CONTROL
STATE ENTERPRISE
"UKRAINIAN SCIENTIFIC
PHARMACOPOEIAL CENTER
FOR QUALITY OF MEDICINES"

61085, м. Харків, вул. Астрономічна, 33.

[http:// www.sphu.org](http://www.sphu.org).

E-mail: phukr@phukr.kharkov.ua

Тел. +38 099 2932583 ФСЧ, +38 050 4056222 ППТ, +38 099 1800602 ЛФА, +38 099 1800603 гр. біол. метабол.

+38 099 1800601 бухгалтерія, +38 099 1800604 підрозділ кадрів

Від 18.13.2020 № 11/820-5
На _____ № _____

Акт про участь Котова С.А. у розробці монографії
«Череди трава» до ДФУ 2.2

Котов С.А. у складі групи «Лікарська рослинна сировина» ДП «Фармакопейний центр», брав участь в експериментальній роботі по гармонізації національних вимог ДФУ з вимогами Європейської Фармакопеї в процесі розробки національної монографії на лікарську рослинну сировину – Череди трава.

У результаті був розроблений проект національної монографії «Череди трава» до ДФУ 2.2.

Директор ДП «Фармакопейний центр»,
д.х.н., професор



О.І. Гризодуб

Продовж. дод. В

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ
З ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ
ТА КОНТРОЛЮ ЗА НАРКОТИКАМИ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВИЙ
ФАРМАКОПЕЙНИЙ ЦЕНТР
ЯКОСТІ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ"



STATE SERVICE OF UI
ON MEDICINES
AND DRUGS CONT
STATE ENTERPRI
"UKRAINIAN SCIEN
PHARMACOPOEIAL C
FOR QUALITY OF MED

61085, м. Харків, вул. Астрономічна, 33. [http:// www.sphn.org](http://www.sphn.org). E-mail: phukr@phukr
Тел. +38 099 2932583 ФСТ, +38 050 4056222 ППТ, +38 099 1800602 ЛФА, +38 099 1800603 гр. біол.
+38 099 1800601 бухгалтерія, +38 099 1800604 відділ кадрів

Від 14.04.2023 № 11/132-5
На _____ № _____

Акт про участь Котова С.А. у розробці монографії «Череди трава^N»

Котов С.А. у складі групи «Лікарська рослинна сировина» ДП «Фарм центр», брав участь в експериментальних дослідженнях щодо макроскопічних та мікроскопічних ознак лікарської рослинної с процесі перегляду національної монографії на Череди траву у відпо вимог ДФУ та ЄФ.

В результаті був розроблений проєкт розділу Ідентифікація А та В (м мікроскопія) для національної монографії «Череди трава^N» в ДФУ 2.:

Директор ДП «Фармакопейний центр»,
д.х.н., професор



О.І

Продовж. дод. В

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ
З ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ
ТА КОНТРОЛЮ ЗА НАРКОТИКАМИ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВИЙ
ФАРМАКОПЕЙНИЙ ЦЕНТР
ЯКОСТІ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ"



STATE SERVICE OF U
ON MEDICINES
AND DRUGS CONT
STATE ENTERPR
"UKRAINIAN SCIEN
PHARMACOPOEIAL C
FOR QUALITY OF MEC

61085, м. Харків, вул. Астрономічна, 33. [http:// www.sphu.org](http://www.sphu.org). E-mail: phukr@sphu.org
Тел. +38 099 2932583 факс, +38 050 4056222 ПНТ, +38 099 1800602 ЛФА, +38 099 1800603 гр. біол.
+38 099 1800601 бухгалтерія, +38 099 1800604 відділ кадрів

Від 27.04.2023 № 11/131-5
На _____ № _____

Акт про участь Котова С.А. у розробці монографії «Череди трава[№]»

Котов С.А. у складі групи «Лікарська рослинна сировина» ДП «Фармацентр», брав участь в експериментальних дослідженнях щодо кількісного визначення полісахаридів в процесі перегляду монографії на Череди траву у відповідності до вимог ДФУ та ЄФ. В результаті був розроблений проєкт розділу «Кількісне Полісахариди» для національної монографії «Череди трава[№]» в ДФУ

Директор ДП «Фармакопейний центр»,
д.х.н., професор



О.

Продовж. дод. В

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ
З ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ
ТА КОНТРОЛЮ ЗА НАРКОТИКАМИ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВИЙ
ФАРМАКОПЕЙНИЙ ЦЕНТР
ЯКОСТІ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ"



STATE SERVICE OF UKRAINE
ON MEDICINES
AND DRUGS CONTROL
STATE ENTERPRISE
"UKRAINIAN SCIENTIFIC
PHARMACOPOEIAL CENTER
FOR QUALITY OF MEDICINES"

61085, м. Харків, вул. Астрономічна, 33. [http:// www.sphu.org](http://www.sphu.org). E-mail: phukr@phukr.kharkov.ua
Тел.: +38 099 2932583 ФС Л, +38 050 4056222 ІНТЛ, +38 099 1800602 ЛФХ, +38 099 1800603 гр. біл. метр.ін.
+38 099 1800601 бухгалтерія, +38 099 1800604 відділ кадрів

Від 17.04.2023 № 11/133-5
На _____ № _____

Акт про участь Котова С.А. у розробці проекту монографії
«Череди трава^h» до ДФУ 2.5

Котов С.А. у складі групи «Лікарська рослинна сировина» ДП «Фармакопейний центр», брав участь в експериментальній роботі по гармонізації національних вимог ДФУ з вимогами Європейської Фармакопеї в процесі перегляду і доробки національної монографії на лікарську рослинну сировину – Череди трава.

У результаті був розроблений проект національної монографії «Череди трава^h» до ДФУ 2.5.

Директор ДП «Фармакопейний центр»,
д.х.н., професор



О.І. Гризодуб

Продовж. дод. В

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ З ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ ТА КОНТРОЛЮ ЗА НАРКОТИКАМИ ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО «УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВИЙ ФАРМАКОПЕЙНИЙ ЦЕНТР ЯКОСТІ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ»		STATE SERVICE OF UKRAINE ON MEDICINES AND DRUGS CONTROL STATE ENTERPRISE «UKRAINIAN SCIENTIFIC PHARMACOPEIAL CENTER FOR QUALITY OF MEDICINES»
--	---	---

ЛАБОРАТОРІЯ ФАРМАКОПЕЙНОГО АНАЛІЗУ

Свідоцтво про атестацію № 485 від 03 серпня 2021 р.
 Державний університет «Київський національний університет імені Тараса Шевченка»
 Свідоцтво про відповідність системи управління якістю ДСТУ ІСО 9001:2001 № 01-0004:2020 від 09 вересня 2020 р.
 ДП «Державний науковий фармацевтично-фармакопейний центр стандартів якості лікарських та ветеринарних препаратів»
 вул. Астрономічна, 22 м. Київ 01085, Тел. +38 099 180-06-02, e-mail: lab@phqc.kharkov.ua

11/581 18.04.23

Акт
про апробацію методик контролю якості на Асенсефіт чай
у фільтр-пакетах 1,7 г

Розробники: Т.М. Гонтова (Професор кафедри фармакогнозії Національного фармацевтичного університету), С.А. Котов (аспірант кафедри фармакогнозії Національного фармацевтичного університету)

В процесі апробації методик контролю якості на Асенсефіт чай у фільтр-пакетах 1,7 г виявлено наступне: запропоновані методики відтворюються в умовах атестованої лабораторії фармакопейного аналізу; аналізовані серії засоби відповідали показникам якості згідно проекту МКЯ.

Завідувач лабораторії
фармакопейного аналізу


Олександр ЗІНЧЕНКО



Продовж. дод. В

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ З ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ ТА КОНТРОЛЮ ЗА НАРКОТИКАМИ ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО «УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВИЙ ФАРМАКОПЕЙНИЙ ЦЕНТР ЯКОСТІ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ»		STATE SERVICE OF UKRAINE ON MEDICINES AND DRUGS CONTROL STATE ENTERPRISE «UKRAINIAN SCIENTIFIC PHARMACOPEIAL CENTER FOR QUALITY OF MEDICINES»
ЛАБОРАТОРІЯ ФАРМАКОПЕЙНОГО АНАЛІЗУ Свідоцтво про атестацію № 485 від 05 березня 2021 р. Державна служба з питань лікарських засобів та контролю за наркотиками Свідоцтво про відповідність системи вимірювань вимогам ДСТУ ISO 15012:2005 № 01-00996/2020 від 03 вересня 2020 р. ДП «Державний науковий центр фармакопейної якості лікарських засобів, м. Київ, вул. Астрономічна, 33, м. Харків, 61085. Тел. +38 099 180-06-02 e-mail: labpharma@ukr.net.ua		
<i>11/881 18.04.23</i> Акт про апробацію методик контролю якості на Асенсефіт екстракт сухий		
Розробники: Т.М. Гонтова (Професор кафедри фармакогнозії Національного фармацевтичного університету), С.А. Котов (аспірант кафедри фармакогнозії Національного фармацевтичного університету)		
В процесі апробації методик контролю якості на Асенсефіт екстракт сухий виявлено наступне: запропоновані методики відтворюються в умовах атестованої лабораторії фармакопейного аналізу; аналізовані серії засобу відповідали показникам якості згідно проекту МКЯ.		
Завідувач лабораторії фармакопейного аналізу  Олександр ЗІНЧЕНКО		

Продовж. дод. В

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ З ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ ТА КОНТРОЛЮ ЗА НАРКОТИКАМИ ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО «УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВИЙ ФАРМАКОПЕЙНИЙ ЦЕНТР ЯКОСТІ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ»		STATE SERVICE OF UKRAINE ON MEDICINES AND DRUGS CONTROL STATE ENTERPRISE «UKRAINIAN SCIENTIFIC PHARMACOPEIAL CENTER FOR QUALITY OF MEDICINES»
ЛАБОРАТОРІЯ ФАРМАКОПЕЙНОГО АНАЛІЗУ		
Сертифікат про атестацію № 485 від 05 серпня 2021 р. Державна служба України з лікарських засобів та контролю за наркотиками Сертифікат про відповідність системі контролювання якості ДСТУ ISO 15012:2005 SP 01-0296/2020 від 03 вересня 2020 р. ДП «Український науковий фармацевтичний центр» (національний центр стандартизації, метрології та сертифікації) вул. Астрономічна, 33, м. Харків, 61025. Тел.: +38 099 180-06-03, e-mail: fpharmukr@ukrpost.ua		
41/361 18.04.23		
Акт про апробацію методик контролю якості на Асенсефіт капсули		
Розробники: Т.М. Гонтова (Професор кафедри фармакогнозії Національного фармацевтичного університету), С.А. Котов (аспірант кафедри фармакогнозії Національного фармацевтичного університету)		
В процесі апробації методик контролю якості на Асенсефіт капсули виявлено наступне: запропоновані методики відтворюються в умовах атестованої лабораторії фармакопейного аналізу; аналізовані серії засобу відповідали показникам якості згідно проекту МКЯ.		
Завідувач лабораторії фармакопейного аналізу		Олександр ЗІНЧЕНКО

Продовж. дод. В

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53

Тел. (057)706-30-71

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної
роботи НФаУ

проф. _____ І.М.Владимирова

«_____» _____ 2023 р.

МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ
ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ
(ПРОЕКТ)

АСЕНСЕФІТ ЧАЙ

по 1.7 г в фільтр-пакетах, вкладених по 20 в пачку з картону

Розроблено:

Професор кафедри фармакогнозії
Національного фармацевтичного
університету

аспірант кафедри фармакогнозії
Національного фармацевтичного
університету



Т.М. Гонтова



С.А. Котов

Склад:

Фільтр пакет	1,7 г
що містить суміш лікарської рослинної сировини:	
череда траву (ДФУ 2.5, стор.324)	1,02 г
нагідок квітки (ДФУ 2.0, т.3, с.400)	0,51 г
глоду листя та квітки (ДФУ 2.0, т.3, с.284)	0,17 г

Методики контролю

Вміст: не менше 5 мг суми поліфенолів в 1 фільтр-пакеті, у перерахунку на пірогалол ($C_6H_6O_3$; М.м. 126.1) і суху сировину;

не менше 70 мг суми полісахаридів в 1 фільтр-пакеті, у перерахунку на суху сировину.

Приготування середньої проби вмісту фільтр-пакетів.

Отриману суміш сировини (збір) в розділі «Однорідність маси» використовують для проведення тестів: «Ідентифікація», «Втрата в масі під час висушування», «Загальна зола», «Кількісне визначення».

Опис. Суміш шматочків різної форми сірувато-зеленого кольору з білими, жовтими, коричнюватими включеннями, що проходять крізь сито з отворами діаметром 3 мм (ДФУ, 2.9.12). Запах слабкий, ароматний

Ідентифікація А. При перегляді збору під лупою повинні бути видні плівчасті ланцетні приквітки; фрагменти плодів сім'янок з 2 або 3 остюками, вкритими щетинками, спрямованими донизу; частини листків буро-зеленого кольору (череда трава); трубчасті серединні квітки з п'яти-зубчастим віночком жовтаво-коричневого кольору, фрагменти крайових квіток яскраво-жовтого кольору, фрагменти обгортки із лінійних сіро-зелених, загострених опушених листочків (нагідок квітки; фрагменти пелюсток віночка квітки жовтуватого-білого кольору; фрагменти листків зверху яскраво зеленого кольору, знизу світліші, деколи із восковою поволокою або сіро-зелені; фрагменти кори пагона коричневого кольору (глоду листя і квітки)

Ідентифікація В. На мікропрепаратах збору мають бути видимі: епідерма листочків обгортки з видовжених прямокутних тонкостінних клітин і членистих секреторних каналів; цілі або фрагментовані багатоклітинні однорядні покривні волоски зі складчастою кутикулою; гіподерма насінної шкірки з пігментованих темно-коричневих клітин і прилеглим нижнім шаром

жовтуватих склереїд (череди трава); епідерма крайових або серединних квіток з видовжених клітин, вкритих складчастою кутикулою, із жовтими хромопластами; фрагменти багатоклітинних дворядних покривних волосків; фрагменти багатоклітинних однорядних залозистих волосків з голівкою із 2 або 4 клітин (нагідок квітки) ; верхня епідерма листа з багатокутних клітин з потовщеними оболонками; одноклітинні покривні товстостінні волоски, округлі пилкові зерна з гладенькою або дрібнозернистою екзиною (глоду листя та квітки).

Ідентифікація С. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

Випробовуваний розчин. До 1.0 г здрібненого на порошок збору (500) (2.9.12) додають 10 мл етанолу (70 %, об/об) Р, нагрівають зі зворотним холодильником протягом 20 хв, охолоджують і фільтрують.

Розчин порівняння. 5.0 мг ФСЗ ДФУ гіперозиду і 3.0 мг ФСЗ ДФУ лютеоліну розчиняють у 10 мл метанолу Р.

Пластинка: ТШХ-пластинка із шаром силікагелю F_{254} Р.

Рухома фаза: мурашина кислота безводна Р – вода Р – етилацетат Р (10:10:80).

Нанесення: 10 мкл, смугами.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 10 см від лінії старту.

Висушування: за температури від 100 °С до 105 °С.

Виявлення: теплу пластинку обприскують розчином 10 г/л дифенілборної кислоти аміноетилового ефіру Р у метанолі Р, потім розчином 50 г/л макроголу 400 Р у метанолі Р і висушують на повітрі протягом 30 хв. Переглядають в УФ світлі за довжини хвилі 365 нм.

Результати: На хроматограмі випробовуваного розчину мають бути наявні:

2 зеленуваті флуоресціюючі зони в нижній третині хроматограми (нагідки); жовта флуоресціююча зона на рівні зони рутину (нагідки, глід); інтенсивна жовта флуоресціююча зона в середній частині хроматограми (череда і глід); 2 коричнювато-червоні зони, розташовані вище та нижче за неї (череда); 2 інтенсивні блакитні флуоресціюючі зони у верхній третині хроматограми (череда, нагідки, глід); 2 червоні флуоресціюючі зони, розташовані близько до фронту розчинника (череда, глід).

Ідентифікація D. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

Випробовуваний розчин. До 2.0 г здрібненого на порошок збору (500) (2.9.12) додають 20 мл *етанолу* (50 %, об/об) *P*, нагрівають на водяній бані зі зворотним холодильником протягом 30 хв, охолоджують, фільтрують, фільтрат випарюють за залишкового тиску до об'єму близько 5 мл, охолоджують і фільтрують крізь паперовий фільтр. Осад на фільтрі промивають 5.0 мл *води P* та змивають 5.0 мл *метанолу P*. Використовують одержаний метанольний фільтрат.

Розчин порівняння. До 5.0 мг *ФСЗ ДФУ календулозидів* додають 5 мл *метанолу P*, перемішують, відстоюють і використовують надосадову рідину. *Пластика: ТШХ* пластинка із шаром *силікагелю P*.

Рухома фаза: *хлороформ P* - *оцтова кислота льодяна P* - *метанол P* - *вода P* (35:16:6:4).

Об'єм проб, що наносяться: 20 мкл, смугами.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 10 см від лінії старту.

Висушування: на повітрі протягом 10 хв.

Виявлення: обприскують *анісового альдегіду розчином P*, витримують протягом 10 хв при температурі (100-105) °C і переглядають при денному світлі.

Результати: на хроматограмі випробовуваного розчину мають бути наявні в нижній половині хроматограми 2 фіолетові зони, розташовані на рівні відповідних зон на хроматограмі розчин у *СЗ календулозидів*.

ВИПРОБУВАННЯ

Однорідність маси. Випробування проводять відповідно до ДФУ 2.0 «Лікарські рослинні чаї»¹ том, с.1035.

Визначають індивідуальну і середню масу 20 випадково обраних фільтр-пакетів: зважують кожен повний пакет збору, відкривають його без втрати будь-якого фрагмента, звільняють його цілком, використовуючи щітку. Зважують порожній пакет і визначають масу вмісту за допомогою віднімання. Повторюють операцію з іншими 19 пакетами. Не більше двох із 20 індивідуальних мас вмісту можуть відхилитися від середньої маси вмісту більш як на 10%, і жодна маса не може виходити за 20%.

Втрата в масі під час висушування. Випробування проводять відповідно до ДФУ 2.5 (2.2.32). Не більше 12,0 %. 1.000 г здрібненого на порошок збору (500) (2.9.12) сушать за температури 105 °С.

Загальна зола. Випробування проводять відповідно до ДФУ 2.5 (2.4.16). Не більше 10,0 %.

Мікробіологічна чистота. Випробування проводять відповідно до вимог ДФУ 2.4 (5.1.8).

В препараті допускається загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів: не більше 10^7 бактерій і не більше 10^5 грибів в 1 г. Допускається наявність не більше 10^3 *Escherichia coli* в 1 г.

Кількісне визначення.

Поліфеноли. Метод спектрофотометрії (2.2.25).

Випробовуваний розчин. 1000 мг збору заливають 100 мл гарячої води, настоюють 15 хв. Дають осадити та рідину фільтрують крізь фільтрувальний папір діаметром 125 мм, відкидаючи перші 20 мл фільтрату.

До 2.0 мл одержаного розчину додають 1.0 мл *фосфорномолібденово-вольфрамового реактиву Р*, 10.0 мл *води Р*, перемішуючи після кожного додавання, та доводять *натрію карбонату розчином Р* до об'єму 25.0 мл.

Через 30 хв вимірюють оптичну густину (2.2.25) розчину за довжини хвилі 760 нм, використовуючи як компенсаційну рідину *воду Р*.

Розчин порівняння. Безпосередньо перед випробуванням 50.0 мг ФСЗ ДФУ пірогалолу розчиняють у воді Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл. 5.0 мл одержаного розчину доводять водою Р до об'єму 100.0 мл. До 2.0 мл одержаного розчину додають 1.0 мл фосфор номолібденово-вольфрамового реактиву Р, 10.0 мл води Р, перемішуючи після кожного додавання, та доводять натрію карбонату розчином Р до об'єму 25.0 мл. Через 30 хв вимірюють оптичну густину (2.2.25) розчину за довжини хвилі 760 нм, використовуючи як компенсаційну рідину воду Р. Вміст суми поліфенолів, у перерахунку на пірогалол, в 1 фільтр-пакеті, обчислюють за формулою:

$$\frac{A_1 \times m_2 \times 0.05 \times m_{cp}}{A_2 \times m_1}$$

де:

A_1 – оптична густина випробовуваного розчину,

A_0 – оптична густина розчину порівняння,

m_1 – маса наважки випробовуваного збору, у міліграмах,

m_2 — маса наважки ФСЗ ДФУ пірогалолу, у міліграмах,

m_{cp} – середня маса вмісту 1 фільтр-пакету, у міліграмах.

Полісахариди. 1000 мг збору заливають 100 мл гарячої води, настоюють 15 хв. Дають осад осісти та рідину фільтрують крізь фільтрувальний папір діаметром 125 мм, відкидаючи перші 20 мл фільтрату. 25 мл одержаного розчину поміщають у центрифужну пробірку, додають 75 мл етанолу (96 %) Р, перемішують, нагрівають на водяній бані при температурі 30 °С протягом 5 хв, витримують протягом 1 год і центрифугують зі швидкістю 5000 об/хв протягом 30 хв. Надосадову рідину фільтрують у вакуумі за тиску від 13 кПа до 16 кПа крізь скляний фільтр ПОР16, попередньо висушений при температурі (100-105) °С до постійної маси. Осад кількісно переносять на фільтр за допомогою 15 мл суміші вода Р - етанол (96 %) Р (1:2) і промивають 10 мл етанолу (96 %) Р. Фільтр із осадом сушать на повітрі, потім висушують до постійної маси за температури (100-105) °С.

Вміст суми водорозчинних полісахаридів, у відсотках, обчислювали за формулою :

$$\frac{(m_2 - m_1) \times 4 \times m_{cp}}{m}$$

де m – маса наважки випробовуваного збору, у міліграмах;

m_1 – маса фільтра, у міліграмах;

m_2 – маса фільтра із залишком, у міліграмах

m_{cp} – середня маса вмісту 1 фільтр-пакету, у міліграмах.

УПАКОВКА

По 1,7 г у фільтр-пакети. Пакети по 20 вкладають у пачку картонну за умовами і вимогами фірми-виробника.

МАРКУВАННЯ

На етикетці вказують “Україна”, “фірма-виробник, його товарний знак та адресу, назву продукції українською мовою, масу в одиниці упаковки в грамах, умови зберігання, номер серії, термін придатності.

ЗБЕРІГАННЯ

Зберігати в сухому, захищеному від світла та недоступному для дітей місці при температурі 15-25 °С.

ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ

2 роки.

Продовж. дод. В

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53

Тел. (057)706-30-71

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної

роботи НФаУ

проф. _____ І.М.Владимирова

«_____» _____ 2023 р.

**МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ
ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ
(ПРОЕКТ)**

АСЕНСЕФІТ ЕКСТРАКТ СУХИЙ

(субстанція для виробництва нестерильних лікарських засобів)

Розроблено:

Професор кафедри фармакогнозії

Національного фармацевтичного
університету

аспірант кафедри фармакогнозії

Національного фармацевтичного
університету



Т.М. Гонтова



С.А. Котов

Склад.

Асенсефіт екстракт сухий що виготовлений із суміші лікарської рослинної сировини:

череда траву (ДФУ 2.5, стор.324) 6 ч

нагідок квітки (ДФУ 2.0, т.3, с.400) 3 ч

глоду листя та квітки (ДФУ 2.0, т.3, с.284) 1 ч

Екстрагент 40 % етанол.

Співвідношення сировина/сухий екстракт DER 4-5,5:1

Примітка. 40 % спирт етиловий готують з 96 % спирту (ДФУ 2.0, Т.2, с.233) у відповідності з ДФУ 2.0, Т.1, с.941, (5.5).

Методики контролю

Вміст: Не менше 3 % суми флавоноїдів, у перерахунку на лютеолін-7-глюкозид ($C_{23}H_{24}O_{10}$; М.м. 460) та сухий екстракт

Не менше 5 % суми поліфенолів, у перерахунку на пірогалол ($C_6H_6O_3$; М.м. 126.1) та сухий екстракт.

ОПИС.

Порошок коричневого кольору.

Ідентифікація А. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

Випробовуваний розчин. До 0.25 г екстракту додають 10 мл розчину 80% (об/об) метанолу Р, обробляють ультразвуком протягом 15 хвилин і фільтрують.

Розчин порівняння. 5.0 мг ФСЗ ДФУ гіперозиду і 3.0 мг ФСЗ ДФУ лютеоліну розчиняють у 10 мл метанолу Р.

Пластика: ТШХ-платинка із шаром силікагелю F_{254} Р.

Рухома фаза: мурашина кислота безводна Р – вода Р – етилацетат Р (10:10:80).

Нанесення: 10 мкл, смугами.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 10 см від лінії старту.

Висушування: за температури від 100 °С до 105 °С.

Виявлення: теплу пластинку обприскують розчином 10 г/л дифенілборної кислоти аміноетилового ефіру *P* у метанолі *P*, потім розчином 50 г/л макроголу 400 *P* у метанолі *P* і висушують на повітрі протягом 30 хв. Переглядають в УФ світлі за довжини хвилі 365 нм.

Результати: На хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися 2 зеленуваті флуо-ресціюючі зони в нижній третині хроматограми, жовта флуоресціююча зона на рівні зони рутину, інтенсивна блакитна флуоресціююча зона, розташована на рівні зони хлорогенової кислоти, інтенсивна жовта флуоресціююча зона в середній частині хроматограми, розташована майже на рівні зони гіперозиду, 2-3 інтенсивні блакитні флуоресціюючі зони у верхній третині хроматограми, інтенсивна жовта флуоресціююча зона розташована близько до фронту розчинника на рівні зони лютеоліну.

Ідентифікація В. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

Випробовуваний розчин. До 0.2 г екстракту додають 20 мл етанолу (50 %, об/об) *P*, нагрівають на водяній бані зі зворотним холодильником протягом 30 хв, охолоджують, фільтрують, фільтрат випарюють за залишкового тиску до об'єму близько 5 мл, охолоджують і фільтрують крізь паперовий фільтр. Осад на фільтрі промивають 5.0 мл води *P* та змивають 5.0 мл метанолу *P*. Використовують одержаний метанольний фільтрат.

Розчин порівняння. До 5.0 мг ФСЗ ДФУ календулозидів додають 5 мл метанолу *P*, перемішують, відстоюють і використовують надосадову рідину. *Пластинка:* ТШХ пластинка із шаром силікагелю *P*.

Рухома фаза: хлороформ *P* - оцтова кислота льодяна *P* - метанол *P* - вода *P* (35:16:6:4).

Нанесення: 20 мкл, смугами.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 10 см від лінії старту.

Висушування: на повітрі протягом 10 хв.

Виявлення: обприскують *анісового альдегіду розчином Р*, витримують протягом 10 хв при температурі (100-105) °С і переглядають при денному світлі.

Результати: На хроматограмі випробовуваного розчину в нижній половині хроматограми мають виявлятися 2 фіолетові зони, розташовані на рівні відповідних зон на хроматограмі розчину ФСЗ ДФУ календулозидів.

ВИПРОБУВАННЯ

Втрата в масі під час висушування. Випробування проводять відповідно до ДФУ 2.5 (2.2.32). Не більше 6,0 %. 1.000 г екстракту сушать за температури 105 °С.

Важкі метали. Випробування проводять відповідно до ДФУ 2.0 (2.4.27). Не більше 0.01% (100 ppm).

Мікробіологічна чистота. Випробування проводять відповідно до вимог ДФУ 2.0. (2.6.31).

В препараті допускається загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів: не більше 10^4 бактерій і не більше 10^2 грибів в 1 г. Не допускається наявність *Escherichia coli* в 1 г. Не допускається наявність *Salmonella* в 25 г.

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Поліфеноли. Метод спектрофотометрії (2.2.25)

Випробовуваний розчин. 0,050 г екстракту поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, додають 80 мл *води Р*, обробляють ультразвуком протягом 3 хв, охолоджують, доводять до позначки *водою Р* і фільтрують, відкидаючи перші 20 мл фільтрату.

До 2.0 мл одержаного розчину додають 1.0 мл *фосфорномолібденово-вольфрамового реактиву Р*, 10.0 мл *води Р*, перемішуючи після кожного додавання, та доводять *натрію карбонату розчином Р* до об'єму 25.0 мл.

Через 30 хв вимірюють оптичну густину (2.2.25) розчину за довжини хвилі 760 нм, використовуючи як компенсаційну рідину *воду Р*.

Розчин порівняння. Безпосередньо перед випробуванням 50.0 мг ФСЗ ДФУ пірогалолу розчиняють у воді *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл. 5.0 мл одержаного розчину доводять водою *P* до об'єму 100.0 мл. До 2.0 мл одержаного розчину додають 1.0 мл фосфор номолібденово-вольфрамового реактиву *P*, 10.0 мл води *P*, перемішуючи після кожного додавання, та доводять натрію карбонату розчином *P* до об'єму 25.0 мл. Через 30 хв вимірюють оптичну густину (2.2.25) розчину за довжини хвилі 760 нм, використовуючи як компенсаційну рідину воду *P*.

Вміст суми поліфенолів, у перерахунку на пірогалол, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{A_1 \times m_2 \times 5}{A_2 \times m_1}$$

де:

A_1 – оптична густина випробовуваного розчину,

A_0 – оптична густина розчину порівняння,

m_1 – маса наважки вмісту капсул, у грамах,

m_2 – маса наважки ФСЗ ДФУ пірогалолу, у грамах,

Флавоноїди. Метод спектрофотометрії (2.2.25)

Вихідний розчин 1. 0.200 г екстракту поміщають у колбу місткістю 200 мл, додають 60 мл етанолу (60 %, об/об) *P*, нагрівають у водяній бані за температури 60 °C протягом 10 хв, обережно струшуючи, охолоджують і фільтрують в мірну колбу місткістю 1000 мл. Колбу місткістю 200 мл і фільтр обполіскують етанолом (60 %, об/об) *P*, промивну рідину переносять у ту саму мірну колбу місткістю 100 мл, доводять об'єм суміші етанолом (60 %, об/об) *P* до позначки і фільтрують.

Випробовуваний розчин. 5.0 мл вихідного розчину 1 поміщають у круглодонну колбу й упарюють насухо за зниженого тиску. Одержаний залишок за допомогою 8 мл суміші метанол *P* – оцтова кислота безводна *P* (10:100) переносять у мірну колбу місткістю 25 мл. Круглодонну колбу обполіскують 3 мл суміші метанол *P* – оцтова

кислота безводна Р (10:100) і промивну рідину поміщають у ту саму мірну колбу місткістю 25 мл. До одержаного розчину додають 10.0 мл розчину, що містить 25.0 г/л *борної кислоти Р*, 20.0 г/л *щавлевої кислоти Р* у *мурашиній кислоті безводній Р*, і доводять об'єм розчину *оцтовою кислотою безводною Р* до 25.0 мл.

Компенсаційний розчин 1. 5.0 мл вихідного розчину 1 поміщають у круглодонну колбу й упарюють насухо за зниженого тиску. Одержаний залишок за допомогою 8 мл суміші *метанол Р* – *оцтова кислота безводна Р* (10:100) переносять у мірну колбу місткістю 25 мл. Обполіскують круглодонну колбу 3 мл суміші *метанол Р* – *оцтова кислота безводна Р* (10:100) і промивну рідину поміщають у ту саму мірну колбу місткістю 25 мл. До одержаного розчину додають 10.0 мл *мурашиної кислоти безводної Р* і доводять об'єм розчину *оцтовою кислотою безводною Р* до 25.0 мл.

Вихідний розчин 2. 0.010 г (точна наважка) *ФСЗДФУ лютеоліну* поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняють у 70 мл *метанолу Р*, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки й перемішують.

Розчин порівняння. 1.0 мл вихідного розчину 2 переносять у мірну колбу місткістю 25 мл, додають 10.0 мл розчину, що містить 25.0 г/л *борної кислоти Р*, 20.0 г/л *щавлевої кислоти Р* у *мурашиній кислоті безводній Р*, і доводять об'єм розчину *оцтовою кислотою безводною Р* до 25.0 мл.

Компенсаційний розчин 2. 1.0 мл вихідного розчину 2 переносять у мірну колбу місткістю 25 мл, додають 10.0 мл *мурашиної кислоти безводної Р* і доводять об'єм розчину *оцтовою кислотою безводною Р* до 25.0 мл.

Оптичну густину (2.2.25) випробовуваного розчину вимірюють через 30 хв після приготування за довжини хвилі 410 нм відносно компенсаційного розчину 1. Паралельно вимірюють оптичну густину розчину порівняння відносно компенсаційного розчину 2.

Вміст суми флавоноїдів, у перерахунку на лютеолін- 7-глюкозид, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{A_1 \times m_2 \times 20 \times 1.63 \times p}{A_2 \times m_1}$$

де A_1 – оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 410 нм;
 A_2 – оптична густина розчину порівняння за довжини хвилі 410 нм;
 m_1 – маса наважки екстракту, використаного для приготування випробовуваного розчину, у грамах;
 m_2 – маса наважки ФСЗ ДФУ лютеоліну, використаного для приготування розчину порівняння, у грамах;
 1.63 – коефіцієнт перерахунку лютеоліну на лютеолін-7-глюкозид;
 p – вміст лютеоліну у ФСЗ ДФУ лютеоліну, у відсотках.

УПАКОВКА

По 1кг у пакети, банки тощо за умовами і вимогами фірми-виробника.

МАРКУВАННЯ

На етикетці вказують “Україна”, “фірма-виробник, його товарний знак та адресу, назву продукції українською мовою, використаний при екстракції первинний розчинник, співвідношення кількості лікарської рослинної сировини й кількості натурального екстракту, склад діючих речовин у грамах на 100 г субстанції, масу в одиниці упаковки в кілограмах, умови зберігання, номер серії, термін придатності.

ЗБЕРІГАННЯ

У сухому захищеному від світла місці, при температурі від 10°C до 30°C.

ТЕРМІН ЗБЕРІГАННЯ

1 рік.

Результати аналізу 3 серій комбінованого рослинного сухого екстракту за показниками проекту МКЯ «Асенсефіт екстракт сухий»

Показники за проектом МКЯ	Вимоги	Результати аналізу		
		Серія 101020	Серія 221019	Серія 310819
1	2	3	4	5
Опис	Порошок коричневого кольору	Відповідає	Відповідає	Відповідає
Ідентифікація	Метод ТШХ. <i>Ідентифікація А.</i> На хроматограмі випробовувального розчину мають виявлятися 2 зеленуваті флуоресціюючі зони в нижній третині хроматом-рами, жовта флуоресцію-юча зона на рівні зони рутину, інтенсивна блакитна флуоресціююча зона, розташована на рівні зони хлорогенової кислоти, інтенсивна жовта флуоресціююча зона в середній частині хроматограми, розташована майже на рівні зони гіперозиду, 2-3 інтенсивні блакитні флуоресціюючі зони у верхній третині хроматограми, інтенсивна жовта флуоресціююча зона розташована близько до фронту розчинника на рівні зони лютеоліну. Метод ТШХ. <i>Ідентифікація В.</i> На хроматограмі випробовуваного розчину в нижній половині хроматограми мають виявлятися 2 фіолетові зони, розташовані на рівні відповідних зон на хроматограмі розчину ФСЗ ДФУ календулозидів	Виявлено всі регламентовані зони Виявлено 2 регламентовані зони	Виявлено всі регламентовані зони Виявлено 2 регламентовані зони	Виявлено всі регламентовані зони Виявлено 2 регламентовані зони

Продовження табл. В1

1	2	3	4	5
Втрата в масі під час висушування	Не більше 6%	5,8±0,28%	5,3 ± 0,24%	4,85±0,18%
Важкі метали	Не більше 0.01% (100 ppm)	Витримує вимоги	Витримує вимоги	Витримує вимоги
Кількісне визначення	СФ- метод. Не менше 3 % суми флавоноїдів, у перерахунку на лютеолін-7-глюкозид та сухий екстракт.	3,13±0,14%	3,25±0,17%	3,43±0,16%
	Не менше 5 % суми поліфенолів у перерахунку на пірогалол та сухий екстракт.	5,04±0,25%	5,10±0,22%	5,25±0,28%

Продовж. дод. В

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53

Тел. (057)706-30-71

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної

роботи НФаУ

проф. _____ І.М.Владимирова

«_____» _____ 2023 р.

**МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ
ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ
(ПРОЕКТ)**

АСЕНСЕФІТ КАПСУЛИ

Розроблено:

Професор кафедри фармакогнозії

Національного фармацевтичного
університету

аспірант кафедри фармакогнозії

Національного фармацевтичного
університету



Т.М. Гонтова



С.А. Котов

Склад вмісту однієї капсули.*діючі речовини:*

Асенсефіт сухий екстракт (DER 4-5,5:1) - 250 мг

не менше 5 % суми поліфенолів

(СТП до реєстр. Посвідчення № від фірми “ ”,)

допоміжні речовини:

Мікрокристалічна целюлоза (МКЦ 200) - 250 мг

(Європейська Ф., 04/2021:0316)

Методики контролю*Вміст:* Не менше 12 мг суми поліфенолів в одній капсулі, у перерахунку на пірогалол ($C_6H_6O_3$; М.м. 126.1).**ОПИС.**

Тверді желатинові капсули №0 з кришечкою синього кольору та корпусом білого кольору, що містять порошок коричневого кольору.

Приготування середньої проби вмісту капсул.

Розкривають 20 капсул, видаляють якомога повніше їх зміст та ретельно його перемішують. Отриману суміш використовують для проведення тестів «Ідентифікація», «Кількісне визначення».

Ідентифікація А. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).*Випробовуваний розчин.* До 0.5 г середньої проби вмісту капсул додають 10 мл розчину 80% (об/об) метанолу Р, обробляють ультразвуком протягом 15 хвилин і фільтрують.*Розчин порівняння.* 5.0 мг ФСЗДФУ гіперозиду і 3.0 мг ФСЗДФУ лютеоліну розчиняють у 10 мл метанолу Р.*Пластика:* ТШХ-пластинка із шаром силікагелю F_{254} Р.*Рухома фаза:* мурашина кислота безводна Р – вода Р – етилацетат Р (10:10:80).

Нанесення: 10 мкл, смугами.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 10 см від лінії старту.

Висушування: за температури від 100 °С до 105 °С.

Виявлення: теплу пластинку обприскують розчином 10 г/л дифенілборної кислоти аміноетилового ефіру *P* у метанолі *P*, потім розчином 50 г/л макроголу 400 *P* у метанолі *P* і висушують на повітрі протягом 30 хв. Переглядають в УФ світлі за довжини хвилі 365 нм.

Результати: На хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися 2 зеленуваті флуоресціюючі зони в нижній третині хроматограми, жовта флуоресціююча зона на рівні зони рутину, інтенсивна блакитна флуоресціююча зона, розташована на рівні зони хлорогенової кислоти, інтенсивна жовта флуоресціююча зона в середній частині хроматограми, розташована майже на рівні зони гіперозиду, 2-3 інтенсивні блакитні флуоресціюючі зони у верхній третині хроматограми, інтенсивна жовта флуоресціююча зона розташована близько до фронту розчинника на рівні зони лютеоліну.

Ідентифікація В. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

Випробовуваний розчин. До 0.4 г середньої проби вмісту капсул додають 20 мл етанолу (50 %, об/об) *P*, нагрівають на водяній бані зі зворотним холодильником протягом 30 хв, охолоджують, фільтрують, фільтрат випарюють за залишкового тиску до об'єму близько 5 мл, охолоджують і фільтрують крізь паперовий фільтр. Осад на фільтрі промивають 5.0 мл води *P* та змивають 5.0 мл метанолу *P*. Використовують одержаний метанольний фільтрат.

Розчин порівняння. До 5.0 мг ФСЗ ДФУ календулозидів додають 5 мл метанолу *P*, перемішують, відстоюють і використовують надосадову рідину. *Пластинка:* ТШХ пластинка із шаром силікагелю *P*.

Рухома фаза: хлороформ *P* - оцтова кислота льодяна *P* - метанол *P* - вода *P* (35:16:6:4).

Нанесення: 20 мкл, смугами.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 10 см від лінії старту.

Висушування: на повітрі протягом 10 хв.

Виявлення: обприскують *анісового альдегіду розчином Р*, витримують протягом 10 хв при температурі (100-105) °С і переглядають при денному світлі.

Результати: На хроматограмі випробову-вального розчину в нижній половині хроматограми мають виявлятися 2 фіолетові зони, розташовані на рівні відповідни зон на хроматограмі розчину ФСЗДФУ календулозидів

ВИПРОБУВАННЯ

Однорідність маси (2.9.5). Випробування відповідно до вимог ДФУ 2.4, 2.9.5..Середня маса вмісту капсул має бути від 0.252 г до 0.308 г. Не більше двох індивідуальних мас вмісту капсул можуть відхилятися від середньої маси на 10% , причому жодна індивідуальна маса не має відхилятися від середньої маси більш ніж на 20%.

Розчинення. Випробування проводять відповідно до вимог ДФУ 2.0, 2.9.3 «Тест «Розчинення» для твердих дозованих одиниць».

Визначення проводять на приладі з кошиком, швидкість обертання кошика - 100 об/хв, використовують 500 мл води Р в якості середовища розчинення, температура середовища (37 ± 0,5) °С. 6 капсул поміщають до приладу, через 45 хв відбирають 10 мл розчину з кожної посудини, фільтрують, відкидаючи перші 5 мл. 2.0 мл фільтрату використовують для приготування випробовуваного розчину. Паралельно проводять визначення вмісту поліфенолів в наважці капсульної маси у перерахунку на пірогалол. Розрахунок для капсул проводять, використовуючи знайдену середню масу вмісту 20 капсул.

Кількість суми поліфенолів, що вивільнилися в середовище розчинення протягом 45 хв має бути не менше 80 %.

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Поліфеноли. Метод спектрофотометрії (2.2.25)

Випробовуваний розчин. 0,080 г середнього вмісту капсул поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, додають 80 мл *води Р*, обробляють ультразвуком проягом 3 хв, охолоджують, доводять до позначки *водою Р* і фільтрують, відкидаючи перші 20 мл фільтрату.

До 2.0 мл одержаного розчину додають 1.0 мл *фосфорномолібденово-вольфрамового реактиву Р*, 10.0 мл *води Р*, перемішуючи після кожного додавання, та доводять *натрію карбонату розчином Р* до об'єму 25.0 мл.

Через 30 хв вимірюють оптичну густину (2.2.25) розчину за довжини хвилі 760 нм, використовуючи як компенсаційну рідину *воду Р*.

Розчин порівняння. Безпосередньо перед випробуванням 50.0 мг *ФСЗ ДФУ пірогалолу* розчиняють у *воді Р* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл. 5.0 мл одержаного розчину доводять *водою Р* до об'єму 100.0 мл. До 2.0 мл одержаного розчину додають 1.0 мл *фосфор номолібденово-вольфрамового реактиву Р*, 10.0 мл *води Р*, перемішуючи після кожного додавання, та доводять *натрію карбонату розчином Р* до об'єму 25.0 мл. Через 30 хв вимірюють оптичну густину (2.2.25) розчину за довжини хвилі 760 нм, використовуючи як компенсаційну рідину *воду Р*. Вміст суми поліфенолів, у перерахунку на пірогалол, в 1 фільтр-пакеті, обчислюють за формулою:

$$\frac{A_1 \times m_2 \times 0.05 \times m_{cp}}{A_2 \times m_1}$$

де:

A_1 – оптична густина випробовуваного розчину,

A_0 – оптична густина розчину порівняння,

m_1 – маса наважки вмісту капсул, у міліграмах,

m_2 – маса наважки *ФСЗ ДФУ пірогалолу*, у міліграмах,

m_{cp} – середня маса вмісту 1 капсули, у міліграмах.

УПАКОВКА

Капсули упаковують за умовами і вимогами фірми-виробника.

МАРКУВАННЯ

На етикетці вказують “Україна”, “фірма-виробник, його товарний знак та адресу, назву продукції українською мовою, склад діючих речовин у грамах на 1 капсулу, кількість в одиниці упаковки в шт, умови зберігання, номер серії, термін придатності.

ЗБЕРІГАННЯ

Зберігати в сухому, захищеному від світла та недоступному для дітей місці при температурі 15-25 °С.

ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ

2 роки.

Таблиця В2

Результати аналізу 3 серій капсул за показниками проекту МКЯ «Асенсефіт, капсули»

Показники за проектом МКЯ	Вимоги	Результати аналізу		
		Серія 110520	Серія 201219	Серія 310121
1	2	3	4	5
Опис	Тверді желатинові капсули №0 з кришечкою синього кольору та корпусом білого кольору, що містять порошок коричневого кольору	Відповідає	Відповідає	Відповідає
Ідентифікація	Метод ТШХ. <i>Ідентифікація А.</i> На хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися 2 зеленуваті флуо-ресціюючі зони в нижній третині хроматограми, жовта флуоресціююча зона на рівні зони рутину, інтенсивна блакитна флуоресціююча зона, розташована на рівні зони хлорогенової кислоти, інтенсивна жовта флуоресціююча зона в середній частині	Виявлено всі регламентовані зони	Виявлено всі регламентовані зони	Виявлено всі регламентовані зони

Продовження табл. В2

1	2	3	4	5
	хроматограми, розташована майже на рівні зони гіперозиду, 2-3 інтенсивні блакитні флуоресціюючі зони у верхній третині хроматограми, інтенсивна жовта флуоресціююча зона розташована близько до фронту розчинника на рівні зони лютеоліну. Метод ТШХ. Ідентифікація В. На хроматограмі випробовуваного розчину в нижній половині хроматограми мають виявлятися 2 фіолетові зони, розташовані на рівні відповідних зон на хр-мі розчину ФСЗ ДФУ календулозидів	Виявлено 2 регламентовані зони	Виявлено 2 регламентовані зони	Виявлено 2 регламентовані зони
Однорідність маси	Середня маса вмісту капсул має бути від 0.462 г до 0.537 г. Не більше двох індивідуальних мас вмісту капсул можуть відхилятися від середньої маси на 7.5%, причому жодна індивідуальна маса не має відхилятися від середньої маси більш ніж на 15%.	Середня маса вмісту – 0,4995 г Максим. відхил.: +2.75%	Середня маса вмісту – 0,50135 г Максим. відхил.: +4.10%	Середня маса вмісту – 0,4927 г Максим. відхил.: -2.75%
Розчинення	Не менше 80 % суми поліфенолів мають розчинитися протягом 45 хв)	середнє для 6 капсул – 96.5%	середнє для 6 капсул – 90.8%	середнє для 6 капсул – 93.7%
Кількісне визначення	СФ- метод. Не менше 12 мг суми поліфенолів у перерахунку на пірогалол в одній капсулі	12,9±0,51 мг	12,6±0,57 мг	12,8±0,44 мг