

Національний фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України

Національний фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Яременко Максим Сергійович

УДК 615.07:615.32:582.521.42:581.43:581.45:581.192

ДИСЕРТАЦІЯ

**Фармакогностичне вивчення кореневищ і листя лепехи звичайної та
отримання субстанцій різної біологічної дії**

226 – 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

М. С. Яременко

Науковий керівник Гонтова Тетяна Миколаївна, доктор фармацевтичних наук,
професор

Харків – 2020

АНОТАЦІЯ

Яременко М. С. Фармакогностичне вивчення кореневищ і листя лепехи звичайної та отримання субстанцій різної біологічної дії. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії 226 «Фармація» (22 – Охорона здоров'я). – Національний фармацевтичний університет, МОЗ України, Харків, 2020.

Дисертаційна робота присвячена комплексному фармакогностичному вивченню кореневищ та листя лепехи звичайної, стандартизації лікарської рослинної сировини, розробці оптимальної технології отримання лікарських рослинних препаратів з різною фармакологічною дією та їх стандартизації.

За допомогою сучасних методик ідентифікації та кількісного визначення БАР в об'єктах дослідження встановлено полісахариди, амінокислоти, леткі та фенольні сполуки, стероїди, вітаміни, макро- і мікроелементи.

Гравіметричним методом у листі та кореневищах лепехи звичайної визначено кількісний вміст полісахаридів та інших вуглеводних фракцій. Вміст водорозчинних полісахаридів був вищий у кореневищах лепехи звичайної ($3,41 \pm 0,14$ %), ніж у листі ($2,96 \pm 0,11$ %). Методом ТШХ досліджено якісний склад ВРПС листя і кореневищ лепехи, що представлений галактозою, глюкозою і фруктозою. Вміст пектинових речовин, геміцелюлози А і Б переважав у кореневищах (у 1,4, 1,5 та 1,3 рази відповідно).

У листі та кореневищах лепехи звичайної виявлено 17 амінокислот у вільному стані, а саме: аспарагінова та глютамінова кислоти, серин, пролін, цистин, гліцин, аланін, тирозин, гістидин, аргінін, треонін, валін, метіонін, ізолейцин, лейцин, фенілаланін та лізин. Сумарний вміст визначених амінокислот був вищий у листі – 10,29 %, ніж у кореневищах – 5,67 %.

Титриметричним методом визначено кількісний вміст вільних органічних кислот у перерахунку на яблучну кислоту, що у кореневищах лепехи звичайної

склав $2,31 \pm 0,21$ %, а в листі – $3,17 \pm 0,18$ %. Вміст жирної олії мав незначну різницю у листі та кореневищах рослини ($1,78 \pm 0,15$ та $1,83 \pm 0,22$ % відповідно).

У листі лепехи звичайної ідентифіковано та визначено кількісний вміст 30 карбонових кислот, а у кореневищах – 29. В обох об'єктах визначено 13 жирних кислот, по 5 одно- та двоосновних карбонових кислоти. Встановлено вміст жирних кислот: левулінової – $3065,15$ мкг/г у листі та $3076,07$ мкг/г у кореневищах, пальмітинової – $2225,93$ мкг/г у листі та $1636,06$ мкг/г у кореневищах; лінолевої – $1772,63$ мкг/г у листі та $2093,07$ мкг/г у кореневищах. Домінували у листі: щавлева $1119,71$ мкг/г, стеаринова $573,87$ мкг/г та ліноленова $2760,23$ мкг/г кислоти; у кореневищах: олеїнова – $474,56$ мкг/г та ліноленова $920,35$ мкг/г кислоти.

У листі лепехи звичайної, на відміну від кореневищ, визначено 3-гексенову, азелаїнову, гептадеканову, хенейкозанову і п-кумарову кислоти. Оригінальними для кореневищ лепехи були: міристинова, ванілінова та гексадекандикарбонова кислоти.

Загальний вміст карбонових кислот у листі лепехи звичайної складав – $15757,88$ мкг/г, у кореневищах – $10501,47$ мкг/г, що у 1,5 рази менше. Виявлено, що 25 сполук був однаковими для обох зразків сировини.

Методом спектрофотометрії визначено кількісний вміст суми поліфенольних сполук (у перерахунку на пірогалол) у листі – $1,24 \pm 0,01$ %, у кореневищах – $1,02 \pm 0,09$ %; суми флавоноїдів (у перерахунку на гіперозид) у листі – $0,96 \pm 0,01$ %, у кореневищах – $0,10 \pm 0,01$ %; кількісний вміст суми гідроксикоричних сполук у листі (у перерахунку на хлорогенову кислоту) – $0,82 \pm 0,01$ %.

Методом ТШХ у зразках досліджуваних об'єктів виявлено рутин, кофейну кислоту та β -ситостерин. Методом ВЕРХ у листі ідентифіковано галову, кофейну кислоту, апігенін, акецетин, апегінін-7-глікозид, трифолін, робінін, ізоорієнтин. Флавоноїди ізоорієнтин, робінін, трифолін, апігенін-7-глюкозид та апігенін виявлені тільки в листі лепехи, акацетин – в обох видах сировини: у листі – $69,39 \pm 2,549$ мкг/г, у кореневищах – $19,66 \pm 0,627$ мкг/г. У листі та кореневищах ідентифіковано та встановлено вміст α - і β -азаронів, на частку яких в листі

припадає 56,09 %, а в кореневищах 94,48 % від усіх ідентифікованих сполук фенольної природи.

Встановлено вміст ефірної олії у кореневищах лепехи звичайної – $2,23 \pm 0,03$ % та листі – $1,93 \pm 0,12$ %. Методом газової хроматографії визначено якісний склад та кількісний вміст індивідуальних компонентів ефірної олії: у листі – 42, у кореневищах – 33; 18 з них виявилися однаковими для ефірної олії обох видів сировини. Сумарний кількісний вміст виявлених речовин у листі та кореневищах знаходився практично на одному рівні: у листі – 1730,20 мкг/г, у кореневищах – 1755,92 мкг/г.

В ефірних оліях листя та кореневищ лепехи найбільший вміст становили сесквітерпеноїди (37,8 %, 38,8 % відповідно); ароматичні речовини (25,4 % та 25,4% відповідно); монотерпеноїди (19,02 % та 20,6 % відповідно). Визначено насичені та ненасичені жирні кислоти, дитерпени, тритерпени, насичені вуглеводні.

Домінуючими компонентами в ефірній олії листя були – шиобунон 564,66 мкг/г, азарон 358,78 мкг/г, β -каріофілен, 101,24 мкг/г, аромадендрен 195,73 мкг/г; кореневищ – азарон 350,52 мкг/г, гермакен В 168,34 мкг/г, β -каріофілен 283,90 мкг/г, ліналоол 136,76 мкг/г, δ -кадінен 136,66 мкг/г.

У листі та кореневищах лепехи звичайної ідентифіковано такі вітаміни: тіамін, рибофлавін, нікотинову кислоту, α -токоферол та β -каротин. Вміст вітамінів у листі в 2-3 рази вищий, ніж у кореневищах.

Дослідження антирадикальної активності у зразках сировини лепехи звичайної проводили спектрофотометричним методом в модельній системі з катіон-радикалами АБТС. У порівнянні зі стандартним зразком тролоксу (6-гідрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбонова кислота) значення активності відносно вільних радикалів для кореневищ знаходилось у межах від 9501 до 11508 мкг/г, для листя – від 4468 до 9738,49 мкг/г сухої сировини.

Методом ВЕРХ виявлено 10 сполук фенольної природи, що виявляли антирадикальну активність, з них у листі ідентифіковано хлорогенову кислоту,

рутин, робінін та ізоорієнтин. Сумарне значення становило 473,03 мкг/г для листя та 183,64 мкг/г для кореневищ. У кореневищах виявлено 5 сполук.

За результатами дослідження елементного складу сировини лепехи звичайної встановлено, що вміст важких металів не перевищував вимог ДФУ до якості ЛРС. В усіх досліджуваних видах сировини ідентифіковано 6 макро- та 8 мікроелементів; домінуючим був калій, який становив від 49 до 72 % вмісту елементів. У мінорних кількостях знаходилися плумбум, молібден та нікель.

Визначено макро- та мікроскопічні діагностичні ознаки листя лепехи звичайної, що включені до проєкту МКЯ.

Розроблено методику ідентифікації сировини лепехи звичайної за вмістом азарону методом ТШХ, в якому як стандартний зразок використовували α -азарон. У ході дослідження підтверджено, що в усіх досліджуваних серіях вітчизняних зразків сировини міститься азарон.

Запропоновано методику кількісного визначення суми азаронів у перерахунку на α -азарон методом ВЕТШХ та розроблено методику ідентифікації сировини лепехи звичайної із визначенням граничного вмісту суми α - та β -азаронів у межах не більше 0,5 %. Новизну досліджень підтверджено патентом України на корисну модель № 133674 від 25.04.2019 р. Розроблено та валідовано методику кількісного визначення суми азаронів в перерахунку на α -азарон методом ВЕРХ. Визначено, що в обох досліджуваних об'єктах вміст суми азарону не перевищує запропоновані межі.

За результатами проведених досліджень запропоновано параметри стандартизації листя лепехи звичайної: макро- та мікроскопічні діагностичні ознаки, ідентифікація азарону, граничне визначення суми α - та β -азаронів, сторонні домішки, втрата в масі при висушуванні, вміст золи загальної, вміст золи, нерозчинної в 10% розчині кислоти хлористоводневої, кількісний вміст ефірної олії (не менше 1,0 %) та суми флавоноїдів у перерахунку на гіперозид (не менше 1,0 %).

Проведено визначення показників якості 7 серій кореневищ лепехи звичайної за вимогами ДФ СРСР XI видання (сторонні домішки, втрата в масі при

висушуванні, зола загальна та кількісний вміст ефірної олії) та вмісту суми азаронів.

Для сировини обох видів визначено оптимальні умови екстрагування БАР та запропоновано методики отримання рідких екстрактів. Експериментально встановлено, що оптимальним екстрагентом є 70 % етанол, співвідношення сировина : екстрагент 1 : 5, час настоювання для листя – 24 год, для кореневищ – 12 год. Новизну досліджень підтверджено патентом України на корисну модель № 138526 від 25.11.2019 р.

Стандартизацію одержаних екстрактів запропоновано проводити за такими параметрами: опис, ідентифікація азарону, сухий залишок, вміст етанолу, кількісний вміст суми α - та β -азаронів – не більше 0,5 %. Для екстракту листя лепехи звичайної додатково регламентується кількісний вміст суми флавоноїдів у перерахунку на гіперозид – не менше 0,5 %.

Уперше визначено токсичність одержаного екстракту із листя лепехи звичайної. Встановлено, що LD₅₀ понад 5000 мг/кг, тому екстракт листя лепехи звичайної належав до V класу токсичності за класифікацією Сидорова – практично нетоксичні речовини. Уперше встановлено протизапальні властивості отриманого екстракту листя на моделях карагенінового та гістамінового набряків.

У дисертаційній роботі вперше проведено комплексне фітохімічне вивчення листя та кореневищ лепехи звичайної. Проведено порівняльне дослідження основних класів БАР: полісахаридів, амінокислот, карбонових кислоти, ефірної олії, фенольних сполук, стероїдів, вітамінів, мікро- та макроелементів. Визначено антирадикальну та протизапальну активність одержаних екстрактів.

Уперше в листі ідентифіковано: кофейну та неоохлорогенову кислоти, апігенін, акацетин, апігенін-7-глюкозид, трифолін, робінін, ізоорієнтин; у кореневищах – кофейну та неоохлорогенову кислоти, акацетин.

Проведено дослідження з визначення оптимального терміну заготівлі листя лепехи звичайної за вмістом головних груп БАР. Визначено оптимальну фазу вегетації – масове цвітіння.

Розроблено проєкт «Лепехи кореневищ^N» та проєкт «Азарон» для визначення суми α - β -азаронів в лікарській сировині для внесення до ДФУ (акти впровадження за № 11/1236-5, № 11/1239-5, № 1240-5, № 11-1241-5 від 03.09.2020 р.).

Розроблено проєкти МКЯ на «Лепехи звичайної листя», «Екстракт листя лепехи звичайної» та «Екстракт кореневищ лепехи звичайної».

Результати хімічного та анатомічного дослідження упроваджено в науково-дослідну роботу споріднених закладів вищої освіти України.

Ключові слова: лепеха звичайна, листя, кореневища, фармакогностичне вивчення, біологічно активні речовини, стандартизація, екстракт, протизапальна активність.

Список публікацій здобувача

1. Гонтова Т. М., Яременко М. С. Хромато-мас-спектрометричне вивчення летких сполук кореневищ лепехи звичайної. Збірник наук. праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупика. Київ. 2015. Вип.24, книга 5. С. 77-82 (Особистий внесок – брав участь у плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).

2. Підходи до розробки монографії «Лепехи звичайної кореневища» для включення у Державну фармакопею України / М. С. Яременко, Т. М. Гонтова, Л. М. Сіра, Е. Е. Котова, А. Г. Котов. Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. 2017. № 1 (49). С. 22–26 (Особистий внесок – брав участь у плануванні експерименту, проведенні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті).

3. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Сіра Л. М. До питань використання та ідентифікації неофіцінальної сировини – листя *Asorus calamus* L. Медична та клінічна хімія. 2018. № 0 (1). С.105–110 (Особистий внесок – брав участь у плануванні експерименту, проведенні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті).

4. Yaremenko M. S., Gontova T. M., Mashtaler V. V., Kotova E. E., Kotov A. G. Development of method for identification and determination of limit content of asarone

in *Acorus calamus* rhizomes. Research J. Pharm. and Tech. 2018. Vol. 11 (6). P. 2263–2266 (Особистий внесок – брав участь у плануванні експерименту, проведенні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті).

5. Yaremenko M., Gontova T., Boryak L., Mala O., Andryushayev O. Determination of optimal extraction conditions of phenolic compounds from *Acorus calamus* leaves. EUREKA: Health Sciences. 2020. № 3 P. 63–70 (Особистий внесок – брав участь у плануванні експерименту, проведенні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті).

6. Yaremenko M., Gontova T. The technology of production and quality assessment of the *calamus* liuid extract. International independent scientific journal. 2020. № 12. P. 47–51 (Особистий внесок – брав участь у плануванні експерименту, проведенні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті).

7. Спосіб ідентифікації кореневищ лепехи звичайної з подальшим визначенням граничного вмісту азарону : пат. 133674 України № u201805081; заявл. 05.08.2018 ; опубл. 25.04.2019, бюл. № 8 (Особистий внесок – брав участь у патентному пошуку, плануванні експерименту, проведенні експериментальних досліджень та оформленні патенту).

8. Спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу на основі рослинної сировини з протизапальною дією : пат. 138526 України № u201906408 ; заявл. 10.06.2019 ; опубл. 25.11.2019, бюл. №22 (Особистий внесок – брав участь у патентному пошуку, плануванні експерименту, проведенні експериментальних досліджень та оформленні патенту).

9. Яременко М. С. Изучение аминокислотного состава корневищ аира болотного / Внедрение достижений медицинской науки в клиническую практику : сб. материалов X науч.-практ. конф. молодых ученых и студентов ТГМУ им. Абуали ибни Сино с международным участием. Душанбе, 2015. С. 371.

10. Yaremenko M. S., Gontova T. M. Research of vitamin composition in leaves *Acorus calamus*. Topical issues of new drugs development : abstracts of XXIII International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student 21 April, 2016 : In 2 vol. Kharkiv : Publishing Office NUPh, 2016. Vol.1. 433 p.

11. Яременко М. С., Гонтова Т. М. Порівняльний аналіз амінокислотного складу листя та кореневищ лепехи звичайної // Промислова фармація: Етапи становлення та майбутнє: збірник наукових праць. Х.: Вид-во НФаУ, 2017. С. 137–140.

12. Яременко М. С., Гонтова Т. М. Контроль якості препаратів на основі лепехи звичайної. Матеріали V науково-практичної конференції Школи молодих науковців ПАТ «Фармак». Київ, 2017 С. 49–51.

13. Yaremenko M. S. Research elemental composition of domestic raw *Acorus calamus* rhizomes. Topical issues of new drugs development : Abstracts of XXIV International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student, 20 April, 2017 : In 2 vol. Kh. : Publishing Office NUPh, 2017. Vol.1. P. 144–145.

14. Яременко М. С., Гонтовая Т. Н. Витаминный состав отечественного сырья корневищ аира обыкновенного. Наука и медицина: современный взгляд молодежи : сб. материалов IV междунар. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых Алматы, 20-21 апр. 2017 г. Алмата, 2017. С. 300-301.

15. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Котова Е. Е. Використання фармакопейних методик при вивченні флавоноїдів в сировині лепехи звичайної. Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій : тези доп. Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяч. 80-річчю з дня народж. д-ра. фармац. наук, проф. О.М. Гайдукевича (12-13 квіт. 2018 р.). Харків : НФаУ, 2018. С. 313–314.

16. Яременко М. С., Гонтова Т. М. Порівняльний аналіз елементного складу кореневищ та листя лепехи звичайної / Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів : матеріали VII наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 27-28 верес. 2018 р. Тернопіль : ТДМУ, 2018. С. 57–58.

17. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Котова Е. Е. Кількісне визначення суми поліфенолів у кореневищах та листі лепехи звичайної. Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин : матеріали III Міжнар. наук.–практ. internet–конф., м. Харків, 26–28 листоп. 2018 р. Харків, 2018. С. 276–277.

18. Коранг Л. А., Яременко М. С. Питання безпеки спиртового екстракту листя лепехи звичайної. Фармакоекономіка в Україні: стан та перспективи розвитку : матеріали Х наук.-практ. конф., м. Харків, 21 трав. 2018 р. Харків : Вид-во НФаУ, 2018. С. 44.

19. Yaremenko M. S., Gontova T. M., Kotova E. E. Perspective for using *Acorus calamus* leaves in medicine. Sciences and Pharmacy Practice 2018 : Book of abstracts 9th International Conference dedicated to the 100-th anniversary of independent Lithuania's pharmacy, Kaunas, 9 November, 2018. P. 60.

20. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Руденко В. П. Дослідження кількісного вмісту водорозчинних полісахаридів листя лепехи звичайної. Сучасні проблеми фармакології, косметології та ароматології : матеріали наук.-практ. конф., м. Одеса, 4 жовт. 2019 р. Одеса, 2019 р. С. 74–80.

21. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Котова Е. Е. Перспективи застосування денситометрії при визначенні кількісного вмісту азарону в кореневищах лепехи звичайної. Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку : матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяч. 20-й річниці заснування Дня фармац. працівника України, м. Харків, 19-20 верес. 2019 р. : у 2 т. / редкол. : А. А. Котвіцька та ін. Харків : НФаУ, 2019. Т. 1. С. 281–282.

22. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Гапоненко В. П. Дослідження кількісного вмісту полісахаридних фракцій листя лепехи звичайної. Актуальні питання клінічної фармакології та клінічної фармації : матеріали наук.-практ. internet-конф., м. Харків, 22-23 жовт. 2019 р. / редкол. : А. А. Котвіцька та ін. Х. : НФаУ, 2019. С. 341–347.

23. Yaremenko M. S., Gontova T. M. Quantification of asarone in *Acorus calamus* by RP-HPLC. Science and modern pharmaceutical manufacturing : VII Annual scientific and practical conference of Farmak's School of young scientists with international involvement, Kyiv, 21 November, 2019. Укр. Мед. Часопис. 2019. Т. 2, № 6 (134). P.16–17.

24. Визначення антирадикальної активності кореневищ лепехи звичайної / М. С. Яременко, Т. М. Гонтова, І. В. Безрук, В. О. Грудько. PLANTA+. Досягнення та

перспективи : матеріали міжнар. наук.-практ. конф., присвяч. пам'яті д. хімічних наук, проф. Ніни Павлівни Максютіної до 95-річчя від дня народження, м. Київ, 20–21 лют. 2020 р. Київ : ПАЛИВОДА, 2020. С. 144–146.

25. Перспективність розробки нових препаратів на основі листя лепехи звичайної / О. В. Андрюшаєв, О. А. Рубан, Ю. С. Маслій, М. С. Яременко. Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації : тези доп. II наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених з міжнар. участю, 15 травн. 2020 р. Харків : Вид-во НФаУ, 2020. С. 28–29.

26. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Котова Е. Е. Терміни заготівлі листя лепехи звичайної (*Acorus calamus* L.) : інформ. лист № 367-2018 / Український центр наукової медичної інформації та патентоліцензійної роботи (Укрмедпатентінформ). Київ, 2018. Вип. 40. (Рішення ЕПК “Фармація” Протокол № 104 від 24.10.2018 р.).

ANNOTATION

Yaremenko M. S. Pharmacognostic study of rhizomes and leaves of *Acorus calamus* and creating substances of different biological action. – Qualifying scientific work as a manuscript.

A thesis for a PhD degree by specialty 226 «Pharmacy» (22 – Health care). – National Pharmaceutical University, Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2020.

The thesis is dedicated to the complex pharmacognostic study of rhizomes and leaves of *Acorus calamus*, standardization of medicinal plant raw materials, development of optimal technology for creating herbal medicines with different pharmacological activity and their standardization.

The presence of polysaccharides, amino acids, volatile and phenolic compounds, steroids, vitamins, elemental composition was determined in the objects of study by the modern methods of identification and quantification of BAS.

The quantitative content of polysaccharides and other carbohydrate fractions was determined by the gravimetric method in leaves and rhizomes. The content of water-

soluble polysaccharides was higher in the rhizomes of *Acorus calamus* ($3,41 \pm 0,14\%$) than in the leaves ($2,96 \pm 0,11\%$). The qualitative composition of water-soluble polysaccharides (identified galactose, glucose and fructose) was determined by TLC method, it was the same for the studied objects. The content of pectin, hemicellulose A and B was predominant in the rhizome (1,4, 1,5 and 1,3 times, respectively).

The presence of 17 amino acids in the free state, namely: aspartic, serine, glutamine, proline, cystine, glycine, alanine, tyrosine, histidine, arginine, threonine, valine, methionine, isoleucine, leucine, leucine, leucine was determined in the leaves and rhizomes of *Acorus calamus*. The total content of the identified amino acids was higher in the leaf of the plant – 10,29 % than in the rhizome – 5,67%.

The quantitative content of free organic acids in terms of malic acid was determined by the titrimetric method, it was $2,31 \pm 0,21$ % in the rhizomes and in the leaves of *Acorus calamus* – $3,17 \pm 0,18$ %. It was found that the content of fatty oil has a slight difference in the aboveground and underground parts of the plant ($1,78 \pm 0,15$ and $1,83 \pm 0,22\%$), respectively.

Carboxylic acids were identified and determined in the *Acorus calamus* raw material: 30 – in leaves and 29 – in the rhizomes. Fatty acids (13 compounds) predominated in both objects, 5 of them were mono- and dibasic carboxylic acids. There was a high content of levulin ($3065,15 \mu\text{g/g}$ in the leaves and $3076,07 \mu\text{g/g}$ in the rhizomes), palmitic ($2225,93 \mu\text{g/g}$ in the leaves and $1636,06 \mu\text{g/g}$ in the rhizomes) and linoleic ($1772,63 \mu\text{g/g}$ in the leaves and $2093,07 \mu\text{g/g}$ in the rhizomes) acids. In addition, a quiet significant amount of oxalic acid ($1119,71 \mu\text{g/g}$), stearic ($573,87 \mu\text{g/g}$) and linolenic acid ($2760,23 \mu\text{g/g}$) accumulated in the leaf; in the rhizomes – oleic ($474,56 \mu\text{g/g}$) and linolenic ($920,35 \mu\text{g/g}$) acids.

3-hexenoic, azelaic, heptadecanoic, heneicosanoic and p-coumaric acids accumulated in the leaves of *Acorus calamus* unlike to the rhizomes. Myristic, vanillic and hexadecanedicarboxylic acids were identified only in the rhizomes of the plant.

The total content of carboxylic acids in the leaves of *Acorus calamus* was – $15757,88 \mu\text{g/g}$, in the rhizomes – $10501,47 \mu\text{g/g}$, which is 1,5 times less. 25 compounds of this class were common for both types of raw materials.

The spectrophotometric method was used to determine the quantitative content of the sum of polyphenolic compounds: leaves – $1,24 \pm 0,01$ %, rhizomes – $1,02 \pm 0,09$ % and the sum of flavonoids in terms of hyperoside: leaves – $0,96 \pm 0,01$ %, rhizomes $0,10 \pm 0,01$ % in the raw materials of *Acorus calamus*. The quantitative content of the sum of hydroxycinnamic compounds – $0,82 \pm 0,01$ % in terms of chlorogenic acid was determined by spectrophotometric method in the leaf of *Acorus calamus*.

Rutin, caffeic acid, β -sitosterine were identified in the test samples by TLC. Gallic acid, caffeic acid, apigenin, akacetin, apigenin-7-glucoside, trifolin, robinin, isoorientin were identified in the leaves by HPLC. The flavonoids isoorientin, robinin, trifolin, apigenin-7-glucoside and apigenin were found only in the leaves of the plant, akacetin – in both types of raw materials: leaves – $69.39 \pm 2,549$ $\mu\text{g/g}$, rhizomes – $19,66 \pm 0,627$ mcg/g . α - and β -azarone were also detected in the leaves and rhizomes, α -azarone which accounts for 56,09 % of the leaves and 94,48 % of all identified compounds of phenolic nature in the rhizomes.

The content of essential oil in the samples of *Acorus calamus* rhizomes was $2,23 \pm 0,03$ % and in leaves – $1,93 \pm 0,12$ %. The qualitative composition and quantitative content of individual components of the obtained essential oil were determined by gas chromatography: in the leaves – 42 compounds and in the rhizomes – 33, 18 of them were the same for the both types of raw material. . The total quantitative content of the detected substances was practically at the same level: in the leaves – $1730,20$ $\mu\text{g/g}$ and in the rhizomes – $1755,92$ $\mu\text{g/g}$.

The largest percentage was of sesquiterpenoids in both samples of essential oil: in the leaves – 37,8 %, in the rhizomes – 38,8 %; aromatic substances – 25,4 and 25,4 % respectively; monoterpenoids – 19,02 % and 20,6 % respectively. Saturated and unsaturated fatty acids, diterpenes, triterpenes, saturated hydrocarbons were determined.

The dominant components of the essential oil in the leaves were shiobunon 564,66 $\mu\text{g/g}$, azarone 358,78 $\mu\text{g/g}$, β -caryophyllene 101,24 $\mu\text{g/g}$ and aromadendrene 195,73 $\mu\text{g/g}$, in rhizomes – azarone 350,52 $\mu\text{g/g}$, hermacrene B 168,34 $\mu\text{g/g}$, β -caryophyllene 283,90 $\mu\text{g/g}$, linalool 136,76 $\mu\text{g/g}$ and δ -cadinen 136,66 $\mu\text{g/g}$.

Vitamins thiamine, riboflavin, nicotinic acid, α -tocopherol and β -carotene were identified in the leaves and rhizomes of *Acorus calamus*. The content in the leaves was 2-3 times higher than in the rhizomes.

Studies of antiradical activity in samples of *Acorus calamus* raw materials were performed by spectrophotometry in a model system with cation radicals ABTS. The value of activity against free radicals for rhizomes ranged from 9501 to 11508 $\mu\text{g/g}$, for leaves from 4468 to 9738,49 $\mu\text{g/g}$ of dry raw material compared with the standard sample of trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid).

HPLC determined 10 compounds with antiradical activity, of which chlorogenic acid, isorientin, robinin and rutin were identified in the leaf. The total value was 473,03 $\mu\text{g/g}$ in the leaves and in the rhizomes – 183,64 $\mu\text{g/g}$. 5 compounds were found in the rhizomes.

According to the results of the study of the elemental composition of *Acorus calamus* it was found that the content of heavy metals does not exceed the requirements of the SPhU for the quality of medicinal plant raw material. 6 macro- and 8 microelements were identified in all studied types of raw materials, potassium was dominant, which accounted from 49 to 72%. In minor quantities were lead, molybdenum and nickel.

Macro- and microscopic features of *Acorus calamus* leaves were determined, which are included into projects of quality control method «*Acorus calamus* leaves»,

A method for identifying of *Acorus calamus* by azarone content by TLC method has been developed. In the course of the study it was confirmed that azarone is present in all studied series of domestic samples of raw materials.

A method for quantifying the amount of azarone in terms of α -azarone by the method of UHPLC was proposed and a method for identifying *Acorus calamus* with the common determination of the boundary content of the amount of azarone (not more than 0,5 %) was developed. The novelty of the research was confirmed by the patent of Ukraine for the utility model № 133674 dated April 25, 2019. The method of quantitative determination of the amount of azarone in terms of α -azarone by HPLC was developed and validated. It was determined that in both studied objects the content of the amount of azarone does not exceed the proposed limits.

According to the results of the research, the following parameters of standardization of *Acorus calamus* leaves were proposed: macro- and microscopic features, identification for the presence of azarone, limiting determination of azarone, impurities, weight loss during drying, total ash content, ash content insoluble in 10 % acid solution hydrogen chloride, the quantitative content of essential oil (not less than 1,0 %) and the amount of flavonoids in terms of hyperoside (not less than 1,0 %).

The quality indicators of 7 series of rhizomes of *Acorus calamus* according to the requirements of the SF of the USSR XI edition (impurities, weight loss during drying, total ash and quantitative content of essential oil) and the content of the amount of azarone were determined.

For both studied types of raw materials, the optimal conditions for extraction of BAS were determined and methods for obtaining liquid extracts were proposed. It is experimentally established that the optimal extractant is 70% ethyl alcohol, the ratio of raw materials: extractant 1:5, infusion time for leaves – 24 hours, for rhizomes – 12 hours. The novelty of the research was confirmed by the patent of Ukraine for a utility model № 138526 dated November 25, 2019.

It is proposed to standardize the obtained extracts according to the following parameters: description, identification by the presence of azarone, dry residue, ethanol content, quantitative content of azarone – not more than 0,5 %. For the extract of *Acorus calamus* leaves, the quantitative content of the amount of flavonoids is additionally regulated in terms of hyperoside – not less than 0,5 %.

For the first time a toxicity was determined for the obtained extract from the leaves of *Acorus calamus*. It was found that LD50 is more than 5000 mg/kg, so the extract of *Acorus calamus* leaves belongs to the V class of toxicity according to the Sidorov classification – almost non-toxic substances. For the first time the anti-inflammatory properties of the obtained leaf extract were also studied in models of carrageenan and histamine edema.

For the first time a comprehensive phytochemical study of leaves and rhizomes of *Acorus calamus* was carried out. The following main classes of BAS in these types of raw materials were studied: polysaccharides, amino acids, carboxylic acids, essential oil,

phenolic compounds, steroids, vitamins and minerals and a comparative characterization of the composition of leaves and rhizomes of *Acorus calamus*. Antiradical activity of the obtained extracts was determined.

For the first time in the leaves were identified: neochlorogenic and caffeic acids, isorientin, robinin, trifolin, apigenin-7-glucoside, apigenin, akacetin; in the rhizomes – neochlorogenic and caffeic acid, akacetin.

A study was conducted to determine the optimal time for harvesting *Acorus calamus* leaves (mass flowering) in accordance with the results of the analysis of the accumulation of the main groups of BAS depending on the phase of vegetation.

Developed the project «*Acorus calamus* rhizome» and the project «Azaron» to determine the amount of azarone in medicinal raw materials for inclusion in the SPhU (acts of implementation for a № 11/1236-5, №11/1239-5, №11/1240-5, №11/1241-5 dated 03.09.2020).

Projects of quality control method have been developed for «*Acorus calamus* leaves», «*Acorus calamus* leaf extract» and «*Acorus calamus* rhizome extract».

The results of chemical and anatomical research are introduced into the research work of related institutions of higher education in Ukraine.

Key words: *Acorus calamus*, leaves, rhizomes, pharmacognostic study, biologically active substances, standardization, extract, anti-inflammatory activity.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	20
ВСТУП	21
РОЗДІЛ 1. БОТАНІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА, РОЗПОВСЮДЖЕННЯ, ХІМІЧНИЙ СКЛАД ТА ЗАСТОСУВАННЯ В МЕДИЦИНІ ЛЕПЕХИ ЗВИЧАЙНОЇ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	30
1.1 Ботанічна характеристика і розповсюдження лепехи звичайної	30
1.2 Дослідження хімічного складу рослини	33
1.3 Історія та сучасне застосування у фармації та медицині	40
1.4 Проблематика та підходи до стандартизації лепехи звичайної	46
Висновки до розділу 1	48
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ, ЗАГАЛЬНІ МЕТОДИ ТА МЕТОДИКИ, ЗАСТОСОВАНІ В ДОСЛІДЖЕННЯХ	51
2.1 Об'єкти дослідження	51
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	64
2.2.3 Фармакологічні методи досліджень	65
2.2.4 Технологічні випробування	66
2.2.5 Статистична обробка результатів	66
РОЗДІЛ 3. ВИВЧЕННЯ ЯКІСНОГО СКЛАДУ ТА КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ ОСНОВНИХ ГРУП БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН ЛИСТЯ ТА КОРЕНЕВИЩ ЛЕПЕХИ ЗВИЧАЙНОЇ	67
3.1 Порівняльне вивчення якісного складу та кількісного вмісту основних сполук у сировині	67

3.1.1 Полісахариди	67
3.1.2 Амінокислоти	69
3.1.3 Карбонові кислоти	71
3.1.4 Ефірна олія	73
3.1.5 Сполуки фенольної природи	77
3.1.6 Дослідження антрирадикальної активності листя та кореневищ	82
3.1.7 Вітаміни	86
3.1.8 Стероїди	87
3.2 Елементний склад листя та кореневищ лепехи звичайної	88
Висновки до розділу 3	90
РОЗДІЛ 4. СТАНДАРТИЗАЦІЯ СИРОВИНИ ЛЕПЕХИ ЗВИЧАЙНОЇ	94
4.1 Макро- та мікроскопічний аналіз листя та кореневища	94
4.2 Визначення показників якості, обов'язкових для ЛРС	101
4.2.1 Кореневища лепехи звичайної	101
4.2.2 Листя лепехи звичайної	103
4.3 Розробка методу ідентифікації сировини лепехи звичайної за наявністю азарону методом ТШХ	105
4.4 Розробка методу кількісного визначення вмісту азарону	108
4.4.1 Розробка методики кількісного визначення азарону методом ВЕТШХ	108
4.4.2 Розробка спільної методики ідентифікації лепехи звичайної та визначення граничного вмісту азарону в сировині	113
4.4.3 Розробка методики кількісного визначення азарону методом ВЕРХ	115
4.5 Проєкт монографії «Лепехи кореневища ^N »	123

4.6	Проект методу контролю якості «Лепехи звичайної листя»	127
	Висновки до розділу 4	129
	РОЗДІЛ 5. РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ ЕКСТРАКТІВ ІЗ СИРОВИНИ ЛЕПЕХИ ЗВИЧАЙНОЇ. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ БІОЛОГІЧНОЇ ДІЇ ЕКСТРАКТІВ	133
5.1	Розробка технології отримання екстракту з кореневищ лепехи звичайної	133
5.2	Розробка технології отримання екстракту з листя лепехи звичайної	137
5.3	Вивчення якісного складу та кількісного вмісту основних БАР в екстрактах	140
5.3.1	Сполуки фенольної природи	141
5.3.2	Дослідження антирадикальної активності	142
5.3.3	Визначення летких речовин	145
5.3.4	Ідентифікація, визначення граничного та кількісного вмісту азарону	146
5.4	Стандартизація екстрактів	147
5.4.1	Проект МКЯ рідкого екстракту кореневищ лепехи звичайної	148
5.4.2	Проект МКЯ рідкого екстракту листя лепехи звичайної	148
5.5	Дослідження біологічної дії екстрактів	149
	Висновки до розділу 5	155
	ВИСНОВКИ	157
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	160
	ДОДАТКИ	182

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АЕС – атомно-емісійна спектрофотометрія

АРА – антирадикальна активність

БАР – біологічно активі речовини

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

ВЕТШХ – високоефективна тонкошарова хроматографія

ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я

ВРПС – водорозчинний полісахарид

ГХ – газова хроматографія

ГХ-МС – хромато-мас-спектрометрія

ДФ РБ – Державна фармакопея Республіки Білорусь

ДФ РФ – Державна фармакопея Російської Федерації

ДФ СРСР – Державна фармакопея Союзу Радянських Соціалістичних Республік

ДФУ – Державна фармакопея України

ДФУ* – Державна фармакопея України чинного видання

ЄФ – Європейська фармакопея

ЛРП – лікарський рослинний препарат

ЛРС – лікарська рослинна сировина

МКЯ – методи контролю якості

МОЗ – Міністерство охорони здоров'я

НФаУ – Національний фармацевтичний університет

ОА – Австрійська фармакопея

СЗ – стандартний зразок

СРh – Китайська фармакопея

СФ – спектрофотометрія

ТЕАЄ – Тролокс-еквівалент антирадикальної ємності

ТШХ – тонкошарова хроматографія

УФ – ультрафіолетова область

ФСЗ ДФУ – фармакопейний стандартний зразок Державної фармакопеї України

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Відповідно до досліджень ВООЗ близько 80 % населення Земної кулі використовують лікарські рослинні препарати для вирішення питань, що стосуються первинних медичних потреб. При цьому популярність фітопрепаратів не відрізняється між економічно розвиненими країнами та країнами, що розвиваються. Так, наприклад, практично 50 % сучасних лікарських засобів у США отримують із природних джерел, зокрема з лікарської сировини різних видів рослин. Вважається, що лікарські рослинні препарати значно безпечніші порівняно із синтетичними аналогами і при цьому не менш ефективні. Враховуючи значний інтерес до лікарських рослин та їх застосування в медицині, питання пошуку нових перспективних рослин чи переосмислення використання вже давно відомих є актуальним. Однією з перспективних рослин для детального фармакогностичного дослідження є лепеха звичайна.

У багатьох країнах світу кореневище лепехи звичайної – це офіційна лікарська сировина. Використання кореневищ, незважаючи на різноманітний склад біологічно активних речовин, що обумовлює велику кількість фармакологічних ефектів, обмежується лише патологіями шлунково-кишкового тракту (ШКТ). Так, в Україні відвари, настої, настоянки та порошок кореневищ, що входить до складу препаратів «Вікалін» і «Вікаїр», використовують для лікування хронічних гастритів, виразкової хвороби шлунка та дванадцятипалої кишки, при метеоризмі, діареї різного походження. Препарат «Оліметин», до складу якого входить ефірна олія кореневищ показаний для лікування та профілактики жовчнокам'яної і сечокам'яної хвороб. Проте численні дослідження, результати яких опубліковані в престижних наукових журналах, свідчать про те, що ця лікарська рослина має надзвичайно великий медичний та фармакологічний потенціал. Деякі іноземні автори вказують на значну схожість якісного складу та кількісного вмісту надземної та підземної частин лепехи звичайної. Водночас на сьогодні в офіційній медицині застосовується лише кореневище рослини. Враховуючи той факт, що в останнє десятиріччя природний ареал виду звужується, використання листя як

додаткової сировини є перспективним. Все це створює передумови до більш поглибленого фармакогностичного вивчення цієї рослини.

Зважаючи на те, що нормативно-аналітична документація, яка використовуються в Україні є застарілою, не враховує мінливості хімічного складу рослини залежно від місця зростання і не відповідає сучасним методам контролю якості ЛРС, гостро стоїть питання розробки проєкту монографії «Лепехи звичайної кореневища^N» та її внесення до Державної фармакопеї України.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами

Дисертаційна робота виконана відповідно до плану науково-дослідних робіт Національного фармацевтичного університету «Фармакогностичне дослідження лікарської рослинної сировини та розробка фітотерапевтичних засобів на їх основі» (№ держреєстрації 0114U000946) та Проблемної комісії «Фармація» МОЗ і АМН України. Дисертантом особисто проведено фармакогностичне вивчення кореневищ і листя лепехи звичайної та розроблено на їх основі лікарські субстанції.

Мета дослідження

Метою роботи було комплексне фармакогностичне вивчення листя та кореневищ лепехи звичайної, стандартизація сировини, отримання лікарських рослинних засобів та вивчення складу біологічно активних речовин з подальшим установленням їх біологічної дії.

Для досягнення мети були поставлені такі завдання дослідження:

- провести аналіз першоджерел стосовно ботанічної характеристики виду, його поширення, вивченості хімічного складу листя і кореневищ, спектру фармакологічної дії та використання у медицині, косметології та харчовій промисловості;
- провести макро- та мікроскопічний аналіз листя та кореневищ з виділенням діагностичних ознак сировини;
- дослідити склад та визначити вміст основних груп БАР у сировині лепехи звичайної та визначити оптимальні терміни заготівлі листя лепехи звичайної;
- розробити оптимальну методику ідентифікації, визначення граничного та кількісного вмісту азарону в сировині;

- провести стандартизацію серій кореневищ та листя лепехи звичайної, розробити проєкт монографії ДФУ «Лепехи кореневища^N» та проєкт МКЯ «Лепехи звичайної листя»;
- розробити оптимальні способи отримання екстрактів на основі кореневищ і листя лепехи звичайної, дослідити якісний склад та кількісний вміст основних БАР у отриманих екстрактах;
- провести стандартизацію отриманих лікарських рослинних препаратів та розробити відповідні проєкти МКЯ;
- дослідити фармакологічну дію отриманих лікарських рослинних препаратів та їх токсичність.

Об'єкт дослідження. Комплексне фармакогностичне вивчення кореневищ та листя лепехи звичайної й отриманих екстрактів.

Предмет дослідження: виявлення, ідентифікація та кількісне визначення БАР у сировині та одержаних субстанціях (компонентів ефірної олії, органічних та жирних кислот, α - і β -азарону, флавоноїдів, полісахаридів, амінокислот, вітамінів, гідроксикоричних кислот тощо); визначення параметрів стандартизації кореневищ і листя; визначення макро- та мікроскопічних ознак листя та кореневищ лепехи звичайної; розробка проєкту монографії «Лепехи кореневища^N»; підбір оптимальних умов одержання екстрактів; розробка проєктів МКЯ на листя та отримані екстракти; визначення біологічної дії отриманих лікарських рослинних препаратів.

Методи дослідження: *фізичні* (визначення втрати в масі при висушуванні, розчинності, температури плавлення); *фізико-хімічні* (титриметрія, хроматографія в тонких шарах сорбенту, високоефективна тонкошарова хроматографія, спектрофотометрія в ІЧ-, УФ- та видимій ділянках спектра, газорідинна хроматографія, високоефективна рідинна хроматографія, атомно-емісійна спектроскопія, денситометрія); *хімічні* (проведення якісних реакцій); *технологічні* (визначення об'ємної маси, питомої маси, насипної маси, пористості сировини, порізності шару, вільного об'єму шару, плинності сировини, коефіцієнта поглинання екстрагенту, вибір екстрагенту, співвідношення сировина – екстрагент,

часу і температури екстракції); *мікротехнічні* (вивчення мікропрепаратів із поверхні та поперечних і поздовжніх зрізів органів рослини); *статистичні* (статистична обробка результатів).

Наукова новизна отриманих результатів

Уперше проведено комплексне фармакогностичне вивчення лепехи звичайної листя та кореневищ, заготовлених на території України. Виділено діагностичні макро- та мікроскопічної ознаки будови надземної та підземної частин рослини.

Проведено порівняльне дослідження кількісного вмісту водорозчинних полісахаридів. Вміст ВРПС у кореневищах склав $(3,41 \pm 0,14) \%$, а в листі рослини – $(2,96 \pm 0,11) \%$. При цьому якісний склад моносахаридів ідентичний і представлений галактозою, глюкозою і фруктозою.

Ідентифіковано 17 амінокислот. Кількісний вміст суми всіх ідентифікованих амінокислот був у 2 рази вищий у листі лепехи звичайної.

Уточнено наукові дані стосовно кількісного вмісту та якісного складу летких сполук у листі та кореневищах лепехи звичайної. Виявлено, що кількісний вміст ефірної олії в кореневищах вищий $(2,23 \pm 0,03 \%)$, ніж у листі $(1,93 \pm 0,12 \%)$. Методом ГХ-МС у листі виявлено та ідентифіковано 42 сполуки, а в кореневищі – 33. По 18 сполук ідентифіковано в обох досліджуваних об'єктах.

Уперше досліджено фенольний склад сировини лепехи звичайної. Вміст поліфенольних сполук у кореневищах лепехи звичайної становив $(1,02 \pm 0,09) \%$, а в листі – $(1,240 \pm 0,001) \%$ у перерахунку на пірогалол і суху сировину. Хроматографічними методами ідентифіковано в листі 13, а в кореневищах – 7 сполук фенольної природи. Уперше в листі ідентифіковано: неохлорогенову та кофейну кислоти, ізоорієнтин, робінін, трифолін, апігенін-7-глюкозид, апігенін, акацетин; у кореневищах – неохлорогенову та кавову кислоти, акацетин. Уперше досліджено динаміку накопичення флавоноїдів та ефірної олії в листі лепехи звичайної залежно від фази вегетації.

Уперше визначено антирадикальні властивості листя та кореневищ лепехи звичайної, заготовленої на території України. Виявлено, що кореневища лепехи

виявляють більшу здатність до зв'язування вільних радикалів, ніж листя (від 9501 до 11508 мкг/г та від 4468 до 9738,49 мкг/г сухої сировини відповідно). Уточнено наукові дані стосовно вмісту вітамінів, стероїдів та мінеральних сполук у сировині.

Уперше розроблено спільну методику ідентифікації сировини лепехи звичайної та визначення граничного вмісту азарону методом ТШХ. Розроблено та валідовано методику кількісного визначення азарону методом ВЕРХ у перерахунку на α -азарон.

Уточнено наукові дані стосовно накопичення азарону в сировині лепехи звичайної, поширеній на території України. Хроматографічними методами виявлено, що вміст азарону не перевищує 0,5 % у надземній та підземній частинах рослини.

Уперше проведено стандартизацію та виявлено основні показники якості листя лепехи звичайної. Уперше розроблено оптимальні технології одержання екстрактів із кореневищ та листя лепехи звичайної, проведено їх стандартизацію, досліджено склад БАР.

Практична значення отриманих результатів

Експериментальним шляхом підтверджено значну перспективність використання листя лепехи звичайної як додаткову сировину і як сировину з відмінним від кореневищ застосуванням. На основі проведених досліджень визначено основні показники якості листя лепехи звичайної та запропоновано проєкт методик контролю якості «Лепехи звичайної листя».

На основі експериментальних даних щодо динаміки накопичення БАР у листі лепехи звичайної оформлено інформаційний лист № 367-2018 «Терміни заготівлі листя лепехи звичайної (*Acorus Calamus* L.)».

На методику ідентифікації сировини лепехи звичайної та визначення граничного вмісту азарону оформлено патент України на корисну модель № 133674 «Спосіб ідентифікації кореневищ лепехи звичайної з подальшим визначенням граничного вмісту азарону».

На підставі проведених досліджень запропоновано проєкт монографії для ДФУ «Лепехи кореневища^N», який рекомендовано ДП «Український науковий

фармакопейний центр якості лікарських засобів» до внесення у ДФУ (акти впровадження №11/1239-5, №11/1240-5, №11/1241-5 від 03.09.2020 р.).

Розроблено та валідовано методику кількісного визначення суми азарону методом ВЕРХ у перерахунку на α -азарон. Методику запропоновано для включення до проєкту випробування «Азарон» у лікарській рослинній сировині в процесі перегляду національної монографії на «Лепехи кореневища^N» відповідно до вимог ДФУ та ЄФ (акт впровадження № 11/1236-5 від 03.09.2020 р.).

Результати дослідження хімічного складу, анатомічної будови органів лепехи звичайної запроваджено у навчальний процес 4 профільних кафедр ЗВО України: кафедри фармакогнозії Національного фармацевтичного університету; кафедри фармакогнозії та ботаніки Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця; кафедри фармації Івано-Франківського національного медичного університету; кафедри фармакогнозії, фармакології та ботаніки Запорізького державного медичного університету.

Розроблено технології отримання екстракту листя (підтверджено пат. 138526 України «Спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу на основі рослинної сировини з протизапальною дією») та екстракту кореневищ лепехи звичайної. Розроблено проєкти МКЯ на отримані лікарські рослинні засоби, що були апробовані на ТОВ «КФК «ГРІН ФАРМ КОСМЕТИК». Проведено попереднє дослідження фармакологічних ефектів отриманих екстрактів.

Особистий внесок здобувача

Безпосередньо автором здійснено:

- інформаційно-патентний пошук за темою дисертаційної роботи;
- аналіз та систематизацію інформації стосовно стану вивчення лепехи звичайної в Україні та світі;
- аналіз існуючих нормативно-аналітичних документів зі стандартизації кореневищ лепехи звичайної;
- заготівлю сировини лепехи звичайної;
- порівняльний аналіз якісного складу та кількісного вмісту БАР у листі та кореневищах лепехи звичайної;

- дослідження динаміки накопичення головних груп БАР у листі лепехи звичайної, запропоновано оптимальні термін заготівлі сировини;
- аналіз існуючих методик з ідентифікації та кількісного визначення азарону в лікарській рослинній сировині;
- розробку проєктів монографії ДФУ «Лепехи кореневища^N», МКЯ на листя лепехи звичайної та екстракти листя та кореневищ лепехи звичайної;
- розробку та валідацію методики кількісного визначення суми азарону в перерахунку на α -азарон, запропоновано відповідний проєкт випробування «Азарон» для внесення до ДФУ;
- розробку технології отримання екстрактів листя та кореневищ лепехи звичайної;
- дослідження якісного складу та кількісного вмісту БАР в отриманих екстрактах листя та кореневищ лепехи звичайної;
- 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 Т. М. Гонтова та науковці, спільно з якими проведені дослідження: Л. М. Сіра, С. М. Губарь, А. Г. Котов, Е. Е. Котова, В. П. Руденко, В. П. Гапоненко, І. В. Безрук, В. О. Грудько, О. В. Андрюшаєв, О. А. Рубан, Ю. С. Маслій, В. В. Машталер, Л. І. Боряк, О. С. Мала, Л. В. Деримедвідь, Л. А. Коранг. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, дисертанту належить фактичний матеріал і основний творчий доробок.

Апробація результатів дисертації

Основні положення роботи обговорено та викладено на науково-практичних конференціях різного рівня, а саме: X научно-практической конференции молодых ученых и студентов ТГМУ им. Абуали ибни Сино «Внедрение достижений медицинской науки в клиническую практику» с международным участием (Душанбе, 24 квітня 2015 р.); Topical issues of new drugs development : Abstracts of

XXIII International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student (Харків, 21 квітня 2016 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Промислова фармація: етапи становлення та майбутнє» (Харків, 29-30 вересня 2017 р.); V науково-практичній конференції Школи молодих науковців ПАТ «Фармак» (Київ, 19 жовтня 2017 р.); XXIV International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student «Topical issues of new drugs development» (Харків, 20 квітня 2017 р.); IV Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Наука и медицина: современный взгляд молодежи» (Алмата, 20-21 квітня 2017 р.); Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій», присвяченій 80-річчю від дня народження доктора фармацевтичних наук, професора О.М. Гайдукевича (Харків, 12-13 квітня 2018 р.); VII науково-практичній конференції з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (Тернопіль, 27-28 вересня 2018 р.); III науково-практичній internet-конференції «Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин» (Харків, 26–28 листопада 2018 р.); 9th International Conference «Sciences and Pharmacy Practice 2018» dedicated to the 100-th anniversary of independent Lithuania's pharmacy (Каунас, 9 листопада 2018 р.); Науково-практичній конференції «Сучасні проблеми фармакології, косметології та ароматології» (Одеса, 04 жовтня 2019 р.); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку», присвяченої 20-й річниці заснування Дня фармацевтичного працівника України (Харків, 19-20 вересня 2019 р.); науково-практичній internet-конференції «Актуальні питання клінічної фармакології та клінічної фармації» (Харків, 22-23 жовтня 2019 р.); VII scientific and practical conference of Farmak's School of young scientists with international involvement «Science and modern pharmaceutical manufacturing» (Київ, 21 листопада 2019 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «PLANTA+. Досягнення та перспективи», присвяченій пам'яті доктора хімічних наук, професора Ніни Павлівни Максютіної (до 95-річчя від дня народження) (Київ, 20–21 лютого

2020 р.); II науково-практичній конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації» (Харків, 15 травня 2020 р.).

Обсяг і структура дисертації

Дисертаційна робота складається з анотації, вступу, огляду літератури, 5 розділів, загальних висновків, списку джерел літератури і додатків. Основний зміст викладено на 159 сторінках. Робота ілюстрована 41 рисунком, 34 таблицями. Список використаної літератури складає 218 найменування, з них кирилицею – 61, латиницею – 157.

РОЗДІЛ 1. БОТАНІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА, РОЗПОВСЮДЖЕННЯ, ХІМІЧНИЙ СКЛАД ТА ЗАСТОСУВАННЯ В МЕДИЦИНІ ЛЕПЕХИ ЗВИЧАЙНОЇ (Огляд літератури)

Лепеха (*Acorus* L.) – єдиний рід родини айрові (*Acoraceae* Martinov) з порядку айроцвітні (*Acorales* Mart.), до якого офіційно належать два види: *Acorus calamus* L. та *Acorus gramineus* Aiton [1–4].

За літературними даними, вид лепеха злакова (*Acorus gramineus* Aiton) розповсюджений у субтропічних і тропічних зонах Азії (Центральний і Південний Китай, Бірма, Ідокитайський півострів та Центральна Японія) [5]. На території України лепеха злакова та її сорти культивують й використовують у садово-парковому дизайні як декоративні рослини [6].

На території Європи зустрічається вид лепеха звичайна (*Acorus calamus* L.), кореневище якого є офіційною лікарською сировиною [4, 6]. Донедавна, залежно від кількості хромосом, виділяли три різновиди лепехи звичайної. Диплоїдний вид ($2n = 24$) *Acorus calamus* var. *americanus*, що зустрічається в Північній Америці, Західній Європі та Азії; триплоїдний вид (стерильний) *Acorus calamus* var. *calamus* ($2n = 36$), що поширений на території Східної Європи, в деяких регіонах Азії та тетраплоїдний вид *Acorus calamus* var. *angustatus*, поширений на території Азії, Філіпін, Сибіру. Проте у 2002 році проведено комплексний таксономічний аналіз «World Checklist of Selected Plant Families», за результатами якого всі три види вважаються лише окремими різновидами одного виду, а саме *Acorus calamus* [2]. Згідно з науковими джерелами існує близько 10 сортів лепехи звичайної [7].

1.1 Ботанічна характеристика і розповсюдження лепехи звичайної

Лепеха звичайна (*Acorus calamus*) – багаторічна трав'яниста рослина родини айрові (*Acoraceae*). На території України рослина має 112 народних назв, наприклад, айр тростинний (звичайний, болотний), татарське зілля, ір, лепех [8]. За

кордоном рослина широко відома під назвою «солодкий прапор» (sweetflag) чи «солодкий корінь» (sweetroot) [9].

Лепеха звичайна має масивні звивисті повзучі кореневища діаметром до 3 см; горизонтально розташовані практично на поверхні або не глибше 5 см під ґрунтом; прості або із розгалуженнями, трохи сплюснуті зверху та знизу. Мають буре або зеленувато-жовте забарвлення ззовні та біло-рожеве всередині. Від нижньої поверхні кореневищ відходять численні корені шнуркоподібної форми до 50 см завдовжки, розміщені скісними рядами, після відмирання яких залишаються рубці у вигляді маленьких округлих виїмок [10].

Листя ціле, мечоподібне, вузьколінійне, яскраво-зеленого кольору, м'ясисте, зібране на верхівках і відгалуженнях кореневищ окремими пучками. Листя з одного боку жолобчасте, з іншого має гостре ребро, від 2 до 5 см завширшки, до 120 см завдовжки. Після відмирання листя на кореневищах залишаються рубці у формі півмісяця. Квітконосне стебло пряме, нерозгалужене, щільно оточене листям, яке жолобоподібної форми, однобічно сплюснуте, ребристе. Квітконосне стебло закінчується суцвіттям – початком, від 4 до 12 см завдовжки та до 1 см у діаметрі [10]. З одного боку суцвіття від основи відходить довге покривало, що схоже на листок. Квітки невеликі, зеленувато-жовті з простою правильною оцвітиною, мають 6-членні плівчасті листочки, верхівки яких злегка загнуті до середини. Зав'язь квітки верхня, тригнізда, має форму, схожу на шестигранник. Шість тичинок розташовані супротивно листочкам оцвітини. Маточка із сидячим рильцем. Цвіте лепеха на початку літа. Плоди – сухі ягоди червоного кольору, шкірясті, з великою кількістю насіння. Знизу плоди оточені залишками оцвітини [8, 10-12].

Лепеха звичайна має характерний сильний пряно-запашний аромат та гірко-пекучий, пряно-терпкий смак [10-14].

Лепеха звичайна широко розповсюджена по всьому світу. Рослина росте поруч з водоймами на мілководді або добре зволоженому ґрунті в помірних, субтропічних і тропічних зонах. Зустрічається по всій території Європи (за винятком Іспанії), у Північній Малій Азії, в Південному Сибіру, в Китаї, Японії, на

Філіппінах, Бірмі, Цейлоні та в Індії. У Новому Світі лепеха зустрічається на півдні Канади та у суміжних 48 штатах США [15, 16].

Основні масиви лепехи в Україні зосереджені по рівнині Лісостепу та на Поліссі. Поширені рослини відносяться до стерильного триплоїдного цитотипу, тому розмножуються лише вегетативно, хоча на їх квітках і розвиваються партенокарпні плоди [18]. Проте у квітках спочатку дозрівають приймочки маточок, а пиляки розкриваються тільки після того, як вони втрачають здатність сприймати пилок. Існує теорія, що пов'язує вегетативне розмноження винятково з відсутністю на території Європи комах, які переносять пилок [15].

Оптимальними умовами для зростання лепехи є замулені береги мало проточних річок, озер, ставків, де вона утворює щільні масиви. В заплавах може утворювати монодомінантні масиви площею до кількох гектарів. Уздовж русел річок формує стрічкоподібні масиви 5-30 м завширшки, не менше 100 м². Загалом в Україні чітко простежується тенденція виснаження природних ресурсів лепехи внаслідок зміни екологічних умов зростання та експлуатаційного навантаження [19, 20].

Вид чутливий до зниження рівня ґрунтових вод, водночас не переносить тривалого підтоплення при товщі води понад 40 см. На ділянках, які підлягають осушенню, швидко втрачає сировинну цінність. При цьому зменшуються висота рослин, товщина кореневищ та їх щільність на одиницю площі. Суцільні масиви розпадаються на окремі фрагменти, локалізовані в пониженнях. Екстремальним для сировинної цінності виду є тривале зниження рівня води нижче 10 см. Такі несприятливі для лепехи екологічні умови часто ускладнюються використанням частково осушених ділянок заплавл під пасовища, після чого угруповання з переважанням лепехи заміщуються трав'яно-осоковими і сировинна цінність виду остаточно втрачається [21].

Основні сировинні запаси лепехи локалізовані в Тернопільській, Житомирській, Сумській, Полтавській, Черкаській, Вінницькій, Хмельницькій, Волинській, Рівненській та Харківській областях [19, 20, 21]. Інтенсивне осушення заплавл із подальшим переорюванням і використанням таких ділянок під

господарські угіддя призвело до різкого виснаження сировинних масивів у долинах річок Стир, Случ, Тетерів, Стубла, Гнила Прип'ять, Південний Буг, Десна, Рось, Удай, Ворскла, Орель. При проведенні ресурсної оцінки виду в різних регіонах України не виявлено його локалітетів, де б спостерігалась тенденція до збільшення природних ресурсів виду [22-24].

Значної шкоди природним ресурсам лепехи завдає надмірна заготівля її сировини за останні десятиріччя. Загалом по Україні в 1997 р. заготовлено 12 т сировини, в 1998 – 3,1 т, в 1999 – 1,3 т; для порівняння в 1968 р. в Україні заготовляли 806 т неочищених кореневищ айру, середньорічна заготівля 1977-1979 рр. становила 282 т, у 1989 р. – 219 т. За останні 20 років ресурси лепехи в Україні зменшились більш, ніж у 10 разів [19, 21]. Вид знаходиться під регіональною охороною в Дніпропетровській та Луганській областях [19, 20].

1.2 Дослідження хімічного складу рослини

За хімічним складом лепеха звичайна – це ефіроолійна рослина. Ефірна олія виявляє різноманітні фармакологічні властивості, як позитивні: антимікробна, протизапальна, відволікальна, сечогінна, знеболювальна, фунгіцидна, інсектицидна, так і негативні: подразлива, канцерогенна, мутагенна, алергійна [25]. Уперше отримання ефірної олії з лепехи описано у праці Валеріуса Корда (Valerius Cordus) «Dispensatorium Noricum» у 1589 році [26]. За різними оцінками середній вміст ефірної олії в кореневищах лепехи коливається від 1 до 6 % та найбільше накопичується в тетраплоїдному різновиді рослини *Acorus calamus var. angustatus* Besser., що поширений на території Індії та Китаю – в середньому від 4,5 до 6 % [27]. Деякі зразки цього різновиду накопичують до 10 % ефірної олії [28]. У стерильному триплоїдному різновиді *Acorus calamus*, що поширений на території Східної Європи та України, вміст ефірної олії коливається від 1,5 до 3,4 % [29, 30]. Хоча, за результатами деяких досліджень, вміст може складати лише – 0,05 % [31]. Диплоїдні рослини *A. calamus var. americanus* містить від 1 до 2 % ефірної олії [30].

Дослідженню якісного складу та кількісного вмісту ефірної олії в надземній

частині присвячено менше уваги. Згідно наявних даних у листі лепехи звичайної накопичується від 0,21 до 2 % [32-34]. На накопичення ефірної олії в надземній частині значною мірою впливає термін заготівлі і стадія розвитку рослини [35].

За численними дослідженнями одним з головних компонентів ефірної олії є азарон [27, 29, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42]. Вміст азарону знаходиться досить у широкому діапазоні залежно від цитотипу лепехи звичайної. Так, лепеха різновиду *Acorus calamus* var. *americanus* практично повністю позбавлена азарону [18, 30, 43, 44]. Тетраплоїдний цитотип *Acorus calamus* var. *angustatus* має найбільшу кількість азарону. Так, за різними оцінками вміст, β -ізомеру азарону може досягати 90 % від загального вмісту ефірної олії в рослині [17, 44-47]. За літературними даними на території Європи та України поширений триплоїдний різновид лепехи *Acorus calamus* var. *calamus*, який містить від 2 до 30 % β -азарону [15]. Відмічається, що вміст азарону в листі триплоїдного різновиду може бути вищий, ніж у кореневищах практично в 20 разів [17, 30, 31, 44, 48]. Проте останні дослідження ставлять під сумнів твердження, що саме кількість хромосом зумовлює різницю між накопиченням ізомерів азарону у виді лепеха звичайна. Проведений у 2009 році аналіз 14 зразків сировини, заготовленої в Індії, свідчить про те, що диплоїдні рослини можуть містити до 12 % β -азарону, а в триплоїдних його вміст може досягати практично 90 % від загальної кількості ефірної олії. Авторами висунуто припущення, що на вміст азарону впливають умови навколишнього середовища, а твердження, що на території Індії поширений в основному тетраплоїдний цитотип не вірне [49].

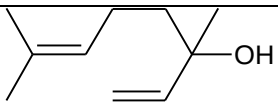
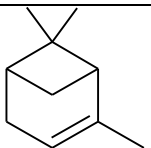
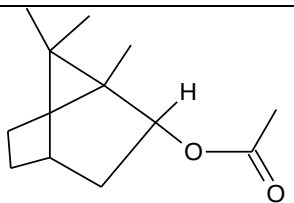
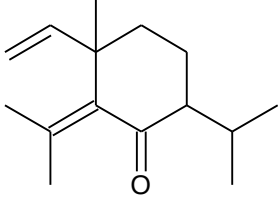
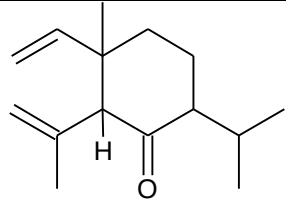
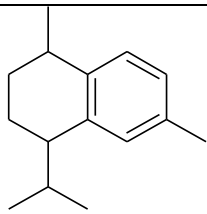
У різних дослідженнях складу ефірної олії ідентифіковано від 30 до 144 компонентів для кореневищ, та від 37 до 81 для листя [33, 34, 37, 49-51].

Найбільше компонентів ефірної олії належить до монотерпеноїдів, сесквітерпеноїдів та фенілпропаноїдів [31, 38, 57]. Монотерпеноїди представлені лимоненом, ліналоолом (1), терпіноленом, *n*-цименом, α -терпіненом, γ -терпіненом, β -феландреном, α - і β -піненами (2), калареном, борнілацетатом (3), борнеолом, D-камфорою. Характерні терпеноїди: ізошиобунон (4), шиобунон (5), епішиобунон, 2,6-діепішиобунон, акорагермакрон, каламен (6), каламендіол (7),

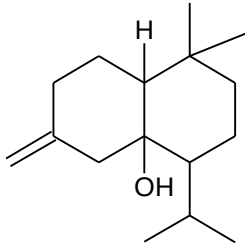
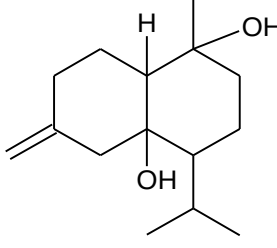
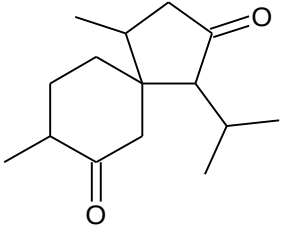
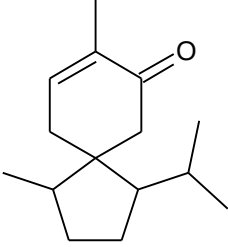
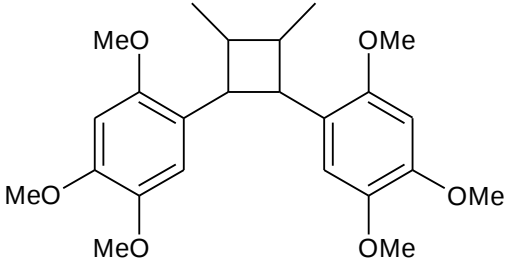
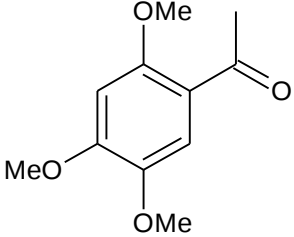
ізокаламендіол (**8**), преізоколамендіол, куркумен, гвайен, каріофілен, акорон (**9**), ізоакорон, акоренон (**10**), аколамон, елемен, неокарон (табл. 1.1). Специфічний запах лепехи звичайної зумовлений наявністю в листі та кореневищах похідних фенілпропану: акорадіну (**11**), азарилальдегіду (**12**), азарону та його похідних – α -, β -, γ -азарону (**13**, **14**), акорамону, евгенолу, ізоєвгенолу, метилевгенолу (**15**), метилізоєвгенолу (**16**) [32, 33, 36-38, 42, 50-52, 57, 58]. У таблиці 1.1 наведено домінантні компоненти ефірної олії лепехи звичайної.

Таблиця 1.1

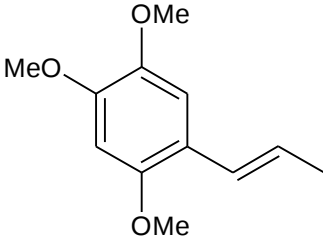
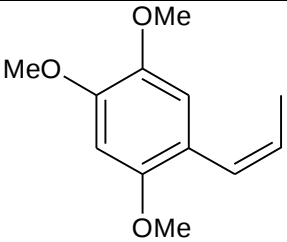
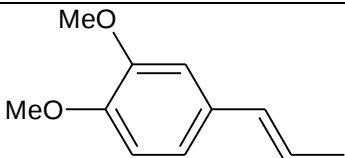
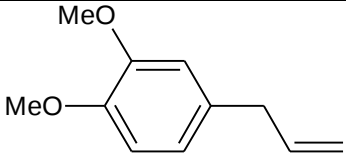
Основні компоненти ефірної олії лепехи звичайної

№ з/п	Сполука	Структурна формула	Літературні джерела
1	2	3	4
1	Лінаоол		38, 39, 56
2	α -Пінен		37-40
3	Борнілацетат		56
4	Ізошиобунон		38-40, 45, 55
5	Шиобунон		17, 29, 38, 39, 45, 55, 56
6	Каламен		52-54

Продовж. табл. 1.1

1	2	3	4
7	Каламендіол		38-40, 55, 56
8	Ізокаламендіол		37, 39, 40, 55
9	Акорон		17, 29, 38-40, 55
10	Акоренон		35, 48
11	Акорадін		38, 39
12	Азарилальдегід		38, 39

Продовж. табл. 1.1

1	2	3	4
13	α -Азарон		27, 37-40, 46
14	β -Азарон		27, 28, 37-40, 45, 46
15	Метилізоевгенол		38, 39, 45
16	Метилевгенол		37, 39, 40, 46

Ненасичені нерозгалужені вуглеводні представлені незначними кількостями нонаналу, тетракозану, пентакозану, гептакозану та нонакозану [59, 60].

Окрім ефірної олії, із кореневищ лепехи звичайної у 1915 році виділено та ідентифіковано специфічний лігнан – акорадин, що може використовуватися як специфічний хемотаксономічний маркер для рослини [61].

У 1938 році Вільям Говард Адольф та Хуї-Лан Йе уперше виділили із лепехи звичайної та ідентифікували β -ситостерин [38].

Велику увагу дослідників привертають полісахариди лепехи звичайної.

Останні дослідження вказують на значний вміст водорозчинних полісахаридів (до 4-5 %) та пектинових речовин (близько 4 %), які складаються з понад 85 % D-галактуранової кислоти та галактози 3 %, арабінози 1 %, ксилози 2 %, рамнози 3 %, геміцелюлози А і Б [51, 62].

Кореневища лепехи звичайної містять протеїн до 17 %, вуглеводи – до 37 %; фітинову кислоту в концентрації 0,94 %; таніни – 32 мкг/100 г [63]. Серед вуглеводів у кореневищах домінуючими є фруктоза і глюкоза, їх вміст становить практично 80 і 20 % відповідно; у незначній кількості зустрічається мальтоза – менше 1 % [64]. Надземна частина лепехи звичайної накопичує вітамін С, β-каротин та вітамін Е [65]. У листі лепехи звичайної визначено близько 1% танінів, вміст суми флавоноїдів – 0,2 %, флавонів – 0,4 %, протоантоціанідинів 0,65 % [34].

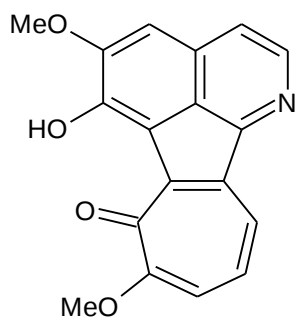
Встановлено, що кореневище містить 13 амінокислот. Незамінні амінокислоти представлені аргініном, лізином, фенілаланіном, треоніном та триптофаном; ідентифіковано α-аланін, аспарагін, аспарагінова та глютамінова кислоти, норвалін, пролін і тирозин [66].

У значній кількості в кореневищах та листі рослини накопичуються карбонові кислоти. Серед жирних кислот домінуючими компонентами є міристинова, пальмітинова, пальмітолеїнова, стеаринова, олеїнова, лінолева та арахідова кислоти [64, 67].

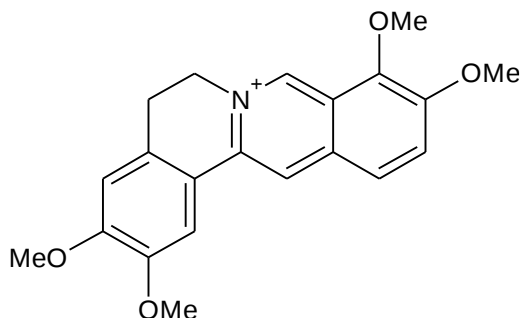
У кореневищах лепехи звичайної міститься від 0,2 до 3 % фенольних сполук (у перерахунку на галову кислоту), флавоноїдів – до 0,2 % (у перерахунку на кверцетин) та від 0,05 до 2,5 % (у перерахунку на катехін [68, 69]. У кореневищах ідентифіковано та встановлено вміст кислот: галової (7,60 мкг/мг), *n*-кумарової (1,81 мкг/мг), *o*-кумарової (0,08 мкг/мг), *транс*-ферулової (0,07 мкг/мг); кверцетину (0,70 мкг/мг). Ідентифіковано гідроксикоричну кислоту хлорогенову, флавоноїди – епігалактокатехін, галангін, дифенілгептаноїд куркумін, нарингін, нарингенін, рутин [38, 40, 70-72]. У надземній частині рослини ідентифіковано галову кислоту [73].

У 2017 р. із кореневищ лепехи звичайної виділено (екстрагент 95 % етанол) та ідентифіковано новий трополоїзохіноліновий алкалоїд неотатарин (**17**) [74].

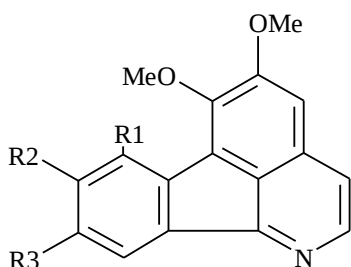
Раніше в кореневищах лепехи посівної ідентифіковано протобербериновий алкалоїд пальматин (**18**), ізохінолінові алкалоїди татарин А (**19**), татарин D (**20**), телітоксин (**21**), сесквілігнан татанан, стерол церевістерол [75].



17



18

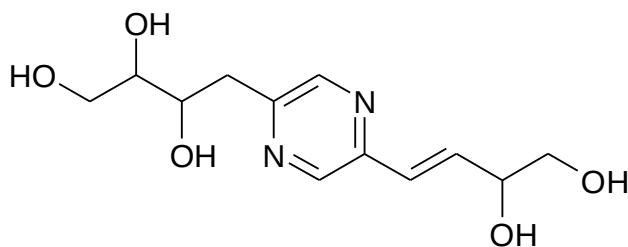


19, 20, 21

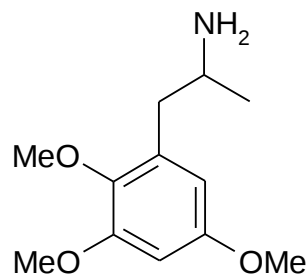
- | | |
|----------------|------------------------|
| 19. Татарин А | $R_1=OH, R_2=H, R_3=H$ |
| 20. Татарин D | $R_1=H, R_2=OH, R_3=H$ |
| 21. Телітоксин | $R_1=H, R_2=H, R_3=OH$ |

У незначній кількості у кореневищах виявлено піразиновий алкалоїд татарімінін А (**22**). Виявлено 2,3,5-триметоксіамфетамін (**23**), що відноситься до групи ТМА (триметоксіамфетаміни) – це ізомери психоделічних галюциногенних препаратів. Існує шість різних ТМА, які розрізняються лише положенням трьох метоксигруп: ТМА, ТМА-2, ТМА-3, ТМА-4, ТМА-5 і ТМА-6. Вони є аналогами кактусового алкалоїду фенілетиламіну мескаліну. ТМА-2, який містить лепехи кореневища, виявляє найбільш сильний галюциногенний ефект.

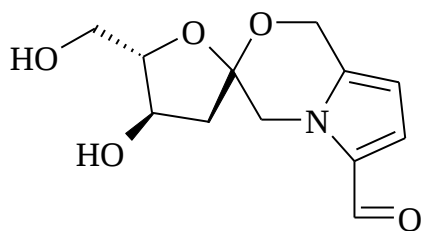
Характерними для лепехи кореневищ є алкалоїди із спірокетальним угрупованням, прикладом можуть бути акорататарин А (**24**) та акорататарин В (**25**).



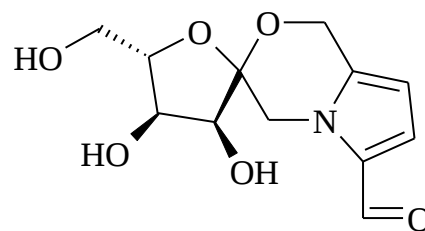
22



23

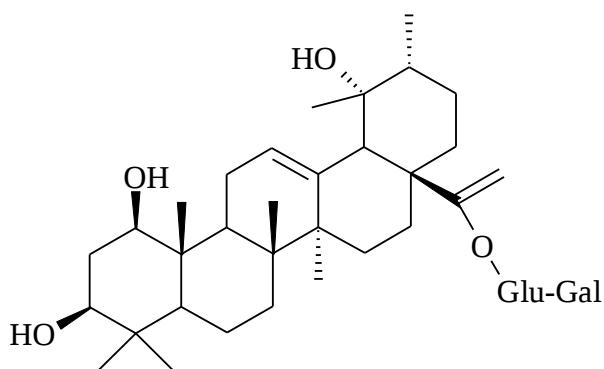


24

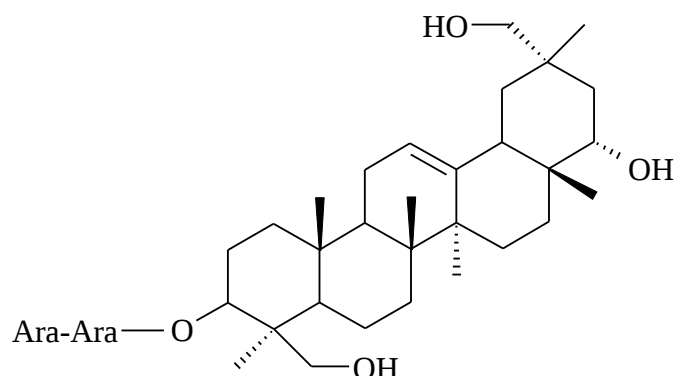


25

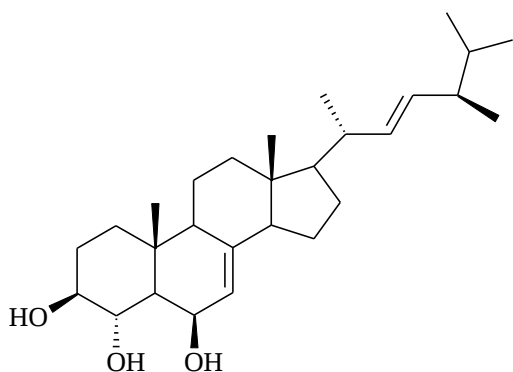
У кореневищах та листі лепехи звичайної виявлені сапоніни і кумарини [76-78]. Тритерпенові пентациклічні сапоніни є похідними α -амірину (**26**) (урсолової кислоти) та β -амірину (**27**) (олеанолу). Серед стероїдних сполук виявлено церевістерол (**28**), β -ситостерол та його глюкозид даукостерол (**29**).



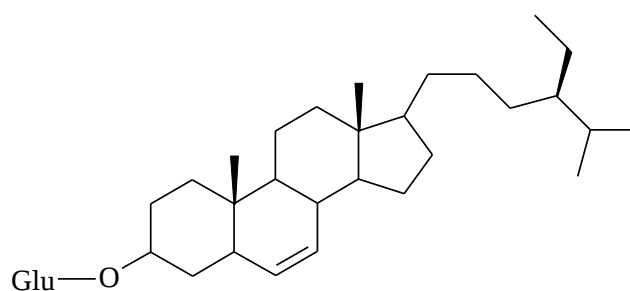
26



27



28



29

1.3 Історія та сучасне застосування у фармації та медицині

Історія. Застосування лепехи звичайної налічує не одну тисячу років. Батьківщиною лепехи звичайної вважається Азія, звідки її у стародавні часи експортували в засушеному вигляді як приправу до Середземномор'я. У самій Азії

використання лепехи звичайної налічує понад 2000 років. Згадки про рослину зустрічаються у аюрведичній літературі, Біблії та працях видатних грецьких та римських вчених, а саму рослину виявлено у гробниці фараона Тутанхамона [79-83]. На Близькому Сході протягом тисячоліть присвоювали кореневищам лепехи властивості афродизіаку [84].

У XI ст. рослину було завезено на територію країн східної Європи татаро-монголами під час їх завоювань [85]. Уперше на території Європи лепеху звичайну культивував австрійський ботанік Класіус у 1574 році, що дістав кореневище з Малої Азії та висадив рослину у Відні [81].

Перші колоністи Північної Америки виявили, що лепеха звичайна широко розповсюджена на цій території. Північноамериканські індіанські племена використовували кореневище лепехи звичайної, так само, як південноамериканські індіанці вживали коку (*Erythroxyloncoca* Lam.) [86, 87].

На сьогодні лепеха звичайна використовується в багатьох сферах життя. Рослина культивується з декоративною метою. Свіже листя додають у салати. Зацукровані кореневища рослини вживають як цукати, що усувають неприємний запах з рота. Кореневища застосовують як приправу до страв та ароматизатор для напоїв. У Польщі до борошна підмішують порошок кореневищ лепехи і випікають ароматні хлібці [88, 89].

Використовується ефірна олія лепехи звичайної в парфумерній та косметичній промисловості, як ароматизатор у милах, мийних засобах, кремах, лосьйонах і парфумах. Максимальний зареєстрований рівень використання ефірної олії становить 0,4 %. Екстракт кореня застосовується в тонізуючих засобах для волосся та проти лупи [90]. Існує велика кількість косметичних засобів зареєстрованих у США, до складу яких входять кореневища лепехи звичайної або екстракти отримані з них [91]. Білоруська фірма «Вітекс» виготовляє відновлювальний шампунь для матусь із лепехою і D-пантенолом, серію косметичних препаратів для догляду за волоссям на основі відварів айру та золотого вуса. На ринку України продаються зубні пасти з лепехою звичайною: «Стоматин-Оптима» (Центр Здоров'я Сім'ї, Україна) і «Royal Dent» (Південна Корея), зубний

порошок «Особливий з корінням айру» для профілактики пародонтозу фірми «Vedan»; профілактичний концентрат-ополіскувач для порожнини рота «Прополіс і Айр» (COCOS, Україна).

Застосування в народній медицині. У деяких азійських країнах, наприклад, у Непалі, місцеві жителі жують кореневище рослини для лікування кашлю. В Японії, Кореї та Індії люди збирають лепеху для використання як ліків, носять кореневище у волоссі для підтримки загального здоров'я [92]. В Індії кореневища традиційно застосовують у вигляді настою для лікування діареї, дизентерії, атонічної диспепсії та астми. У В'єтнамі лепеху звичайну використовують для лікування респіраторних захворювань (астма, запалення верхніх дихальних шляхів), ревматизму, укусів змій та як заспокійливий засіб. В Індонезії та Малайзії кореневища зазвичай застосовують зовнішньо для лікування запалень, ревматизму, люмбаго та шкірних захворювань, внутрішньо після пологів. На Філіппінах кореневища використовується як жувальний засіб проти зубного болю, та як психостимулятор. У Папуа-Новій Гвінеї листя лепехи вживають як тонізуючий засіб і розжовують, щоб усунути зубний біль. У Брунеї лепеха використовується для лікування гастриту та діареї. У Таїланді кореневища застосовуються як вітрогінний, знеболювальний, протиглісний засіб, для лікування діареї та дизентерії. В Японії олію лепехи додають до ванни, що вважається ефективною при захворюваннях шкіри та для поліпшення кровообігу [90]. У Польщі лепеху використовують як відхаркувальний і протизапальний засіб, зовнішньо – проти випадіння волосся [93, 94].

Застосування в офіційній медицині. Фармацевтична промисловість України, Німеччини, Франції, Австрії, Індії та інших держав використовує кореневища лепехи як офіційна сировину [94]. Станом на початок 2020 року, в Україні зареєстровано 22 препарати, до складу яких входять кореневища лепехи звичайної або її екстракти: таблетки «Вікалін» та «Вікаїр», багатокомпонентна настойка «Фітодент», мультикомпонентні збори та настойки для перорального застосування «Детоксифіт», «Бронхофіт», «Гінекофіт» [95].

На ринку Євросоюзу препарати на основі лепехи звичайної представлені

гомеопатичними засобами, наприклад, порошок кореневищ у желатинових капсулах «Kalmus-Wurzel» (VitalIdea, Нідерланди).

Сучасні фармакологічні дослідження. Дослідження метанольного екстракту рослини вказують на значну активність проти грибів *Trichophyton rubrum*, *Microsporum gypseum* та *Penicillium marneffe* [96]. Встановлено помірну активність проти дріжджів *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* і *Saccharomyces cerevisiae* [97]. Доведено дію петролейного екстракту проти *P. aeruginosai* та *S. aureus*. Відносно *E. coli* та *B. subtilis* спостерігалось гальмування розвитку мікроорганізмів [98]. Етанольний та метанольний екстракти кореневища лепехи виявляють протимікробні властивості відносно *E. coli*, *S. epidermidis*, *S. aureus* та *Candida albicans* [99, 100]. Антибактеріальна активність ефірної олії та виділеного із неї β -азарону досліджені та підтверджені *in vitro* у 2012 році відносно трьох грамнегативних бактерій, а саме *Pasteurella multocoda*, *Escherichia coli* і *Salmonella enterica*, та грампозитивних бактерій *S. aureus* [101]. Проведені дослідження вказують на те, що саме α - і β -азарони мають виражені антибактеріальні та фунгіцидні властивості [102-103].

Досліджені протизапальні властивості водного екстракту із листя лепехи звичайної, обумовлені пригніченням продукції протизапальних цитокінів [104]. Підтверджено протизапальну активність ефірної олії та етанольних екстрактів лепехи звичайної [105-108]. Отримані результати досліджень показали значну репаративну дію водних екстрактів кореневищ айру та протизапальну активність *in vitro* [109].

Описані результати досліджень спазмолітичних та протисудомних властивостей метанольного екстракту з лепехи звичайної, азарону та ефірної олії [110-112]. Повідомляється, що ефірна олія лепехи звичайної та азарон має антиепілептичну дію [79].

Досліди на щурах показали, що спиртовий екстракт кореневищ лепехи має противиразкову активність [113]. Окрім цього виявлено гепатопротекторну дію [114, 115]. Водна витяжка з кореневищ лепехи виявляє противиразкові властивості, знижує рН та ферментативну активність шлунка, тоді як спиртовий

витяг збільшує ці показники [116].

Повідомляється про нейромодулювальний, нейропротекторний та антидепресивний ефект при застосуванні екстракту листя лепехи звичайної шляхом впливу на нігростріарний дофамінергічний шлях [117, 118]. Описано низку експериментів, що свідчать про значний вплив ефірної олії та α -азарону на ЦНС, що виявляє антидепресивні, нейропротекторні, анксиолітичні, тривалізуючі властивості [119-127]. Повідомляється про можливість застосування β -азарону при лікуванні хвороби Альцгеймера, його седативні, нейропротекторні та антидепресивні властивості [128-135].

Отримані експериментальні дані дають можливість стверджувати, що кореневища лепехи звичайної мають значну знеболювальну, протисудомну та цитотоксичну активність і можуть бути використані при лікуванні болю та пухлин [136, 137]. Цитотоксичну дію ефірної олії кореневищ лепехи звичайної доведено відносно колоректальної аденокарциноми (HT-29), епідермоїдної карциноми та клітин раку шийки матки (SiHa) людини [138]. Проведені дослідження вказують на здатність метанольного екстракту кореневищ рослини захищати ДНК від пошкоджень [139].

Доведено, що ефірна олія лепехи звичайної та виділені з неї шиобунон та ізошиобунон виявляють інсектицидні властивості відносно *Lasioderma serricorne*, *Tribolium castaneum* та ларвіцидні властивості відносно *Spodoptera litura* та *Plutella xylostella*, *Drosophila melanogaster* та *Solenopsis invicta* [41, 140-142].

Проведені дослідження вказують на здатність лепехи звичайної очищувати стічні води [143-145].

50 % етанольний екстракт кореневищ лепехи звичайної та виділений з нього комплекс сапонінів продемонстрував гіполіпідемічну активність [146, 147]. Досліджено гіполіпідемічний та антихолестеричний ефект α -азарону та його похідних [148].

Підтверджені антиоксидантні властивості ефірної олії з кореневищ та листя лепехи звичайної [149]. Описано радіопротекторну та антиоксидантну активність 50 % етанольного екстракту лепехи звичайної [150].

Токсичність. Проведено дослідження щодо токсичності лепехи звичайної та не рекомендовано її приймати вагітним та дітям. Встановлено, що ефірна олія тетраплоїдних сортів лепехи через 18 тижнів вживання уповільнює ріст щурів, є причиною значної ексудації в черевну порожнину і порушує функції серця та нирок [151, 152]. Встановлено, що азарони виявляють цитотоксичність гепатоцитів, можливо, викликаючи окиснювальний стрес [153].

У дослідженнях на людях вплив фенілпропаноїдів із трави *Acorus calamus*, яка містить високі концентрації азаронів, викликав тривалу блювоту у піддослідних [154]. Повідомляється про цитотоксичну та генотоксичну дію азаронів проти клітин HepG2. Встановлено, що α -азарон є гепатотоксичним, викликаючи морфологічні та ультраструктурні зміни, накопичення триацилгліцерину (жирна печінка) і гальмування синтезу білка та секреції в культивованих гепатоцитах щурів. Подібно β -азарону, α -ізомер сприяє розвитку пухлин печінки, виявляє мутагенні властивості, підвищує частоту обміну сестринських хроматид у лімфоцитах людини і клітинах кісткового мозку мишей [155]. Автори продемонстрували, що після метаболічної активації β -азарон у концентраціях, що перевищують 50 мкг/мл, був генотоксичним, про це свідчить позитивний тест Еймса та сестринський обмін хроматидного обміну [156, 157].

Проте у ході дослідів доведено, що α -азарон має меншу токсичність. Його LD₅₀ для мишей при пероральному введенні становило 417,6 мг/кг, у той час як LD₅₀ β -азарону – 182,4 мг/кг [158-160].

Проведені дослідження щодо токсичності лепехи звичайної та субстанцій на її основі досить неоднозначні. Зазвичай дослідження гострої (разової дози) токсичності проводять на лабораторних тваринах із застосуванням високої дози (достатньої для смерті або захворюваності) відповідної речовини. При цьому не завжди проводились експерименти в менших концентраціях [150]. Як наслідок, опубліковані результати досліджень, що підтверджують відсутність значних негативних впливів етанольного екстракту лепехи звичайної та свідчать про безпечність застосування екстракту кореневищ лепехи (екстрагент метанол) у концентрації менше 300 мг/кг маси тіла [150-153].

1.4 Проблематика та підходи до стандартизації лепехи звичайної

Незважаючи на значну кількість підтверджених фармакологічних ефектів, застосування лепехи звичайної в багатьох країнах обмежено. Управління продовольства і медикаментів (Food and Drug Administration) США заборонили використовувати лепеху звичайну та її ефірну олію в напоях та харчових продуктах незалежно від наявності азарону. У Канаді та США лепеха звичайна та будь-які безрецептурні препарати на її основі заборонені для орального застосування [17].

Через потенційну токсичну дію азарону, зокрема β -ізомеру, Європейська рада обмежила вміст β -азарону на рівні не більше 1 мг/кг в алкогольних напоях та приправах, а в інших напоях та харчових продуктах – не більше 0,1 мг/кг (Європейське агентство з лікарських засобів (ЕМЕА), 2002). Для розширення регулювання/обмеження споживання β -азарону в харчових та алкогольних напоях тимчасово встановлено обмеження впливу лікарських засобів рослинного походження, на рівні ~ 115 мкг/добу, тобто приблизно 2 мкг/кг маси тіла на добу до повної оцінки користі/ризiku [44]. На сьогодні в Європейській фармакопеї відсутня монографія на кореневища лепехи звичайної, не зважаючи на те, що відповідні проекти існують з 2005 року. Зараз до упровадження зареєстрований проєкт монографії № 2456 «*Calamus rhizome for decoction used in TCM*», суть якого полягає в тому, що використання кореневищ обмежується лише приготуванням відварів, що забезпечить мінімальний вміст азарону в отриманій витяжці [161].

Незважаючи на відсутність офіційної монографії в Європейській або Американській фармакопеї, деякі країни, мають відповідні АНД в своїх профільних нормативних документах на сировину кореневища лепехи звичайної. *Rhizome Calami* описано у ДФ СРСР, ДФ РБ, Німецькому фармацевтичному кодексі 2011 (Deutscher Arzneimittel Codex, DAC), Австрійській фармакопеї 2006 (Oesterreichisches Arzneibuch, OA) та Китайській фармакопеї 2005 (CPh) [162-166].

Аналіз вищенаведених монографій виявив таке:

- назви монографій відрізняються: ДФ СРСР – «*Rhizomata Calami*» (Кореневища Лепехи), в ДФ РБ – «*Acori Calami rhizomata*» (Лепехи звичайної

кореневища), ОА – «*Radix Calami*» (Корені Лепехи), у ДАС – «*Calami rhizoma*» (Лепехи кореневища) та в СРн – «*Rhizoma Acori Calami*» (кореневища лепехи звичайної [94];

- регламентація запаху і смаку наводиться у ДАС, ОА, СРн та ДФ СРСР; ДФ РБ регламентує тільки запах; у монографії ДФ СРСР – смак сировини визначається як пряно-гіркий, у ОА – описаний як специфічний, гострий і гіркий, у ДАС – запах ароматний, а смак – гострий, злегка гіркуватий, у СРн – запах сировини сильний та характерний, смак – гострий [94];

- у всіх НД у розділі «Макроскопія» наведені морфологічні ознаки цілої сировини, додатково у ДАС, ОА та ДФ СРСР наведені ознаки подрібненої сировини (у ДФ СРСР додатково наводяться макроскопічні ознаки порошку) [94];

- у розділі «Мікроскопія» ДФ РБ та ОА регламентує мікроскопічні ознаки цілих кореневищ, а ДФ СРСР та ДАС описують діагностичні ознаки цілої сировини і порошку, у СРн цей розділ відсутній [94];

- ОА у розділі «Ідентифікація» наводить якісну реакцію з розчином заліза (ІІІ) хлориду, і з винною кислотою в суміші з концентрованою сірчаною кислотою, ДФ РБ наводить якісну реакцію з розчином заліза (ІІІ) хлориду [94];

- у всіх НД, за винятком ДФ СРСР, наведена методика ідентифікації сировини методом тонкошарової хроматографії в різних хроматографічних умовах з використанням як свідків тимолу, анетолу, ліналолу. СРн – як свідка регламентує використовувати стандартний зразок Лепехи кореневищ, як рухому фазу – хлороформ, як проявник – 10 % розчин сірчаної кислоти в етанолі, на хроматограмі випробовуваного розчину регламентується основна зона, подібна такій самій зоні на хроматограмі розчину стандарту [94];

- «Втрата в масі при висушуванні» регламентовано на рівні: ДФ СРСР – не більше 14 %, ДФ РБ – не більше 13 %, ДАС – не більше 12 %. Окрім цього, ДФ СРСР регламентує цей показник для порошку з кореневищ – не більше 10 % [94];

- усі фармакопеї регламентують показник «Вміст загальної золи» – не більше 6 %, а вміст золи, не розчинної у хлористоводневій кислоті не

регламентується [94];

- у всіх НД у сировині регламентовано показник «Вміст ефірної олії» (не менше 20 мл/кг для цілої сировини), який визначається фармакопейним методом перегонки з водяною парою. DAC та ДФ СРСР додатково регламентують вміст ефірної олії для подрібненої сировини (не менше 15 мл/кг) [94];

- ОА та DAC регламентують у сировині граничний вміст азарону (не більше 0,5 %), що визначається в першому документі спектрофотометричним методом, а в другому – методом високоефективної рідинної хроматографії [94];

- у монографії ДФ СРСР регламентовано тару, в якій зберігаються кореневища лепехи звичайної, в той час як у ДФ РБ, ОА, DAC та СPh прописано лише температурний режим і загальні принципи зберігання сировини [94].

В Україні донедавна чинною нормативною документацією на цей вид ЛРС є стаття Фармакопеї СРСР XI вид., яка регламентує вміст ефірної олії в сировині і не визначає наявність азарону [94]. Враховуючи широке використання кореневищ лепехи у медицині та відсутність у національній нормативній документації методики контролю азарону в сировині, актуальним питанням є розробка методик ідентифікації цієї речовини в сировині та визначення її граничного вмісту.

Висновки до розділу 1

1. Аналіз наукових першоджерел показав, що в Україні широко розповсюджений триплоїдний (стерильний) цитотип лепехи звичайної (*Acorus calamus*), що є офіційною лікарською рослинною сировиною в багатьох країнах світу. Через нераціональну заготівлю кореневищ у минулому та зміни в природних екологічних умов зростання сировинні запаси лепехи звичайної постійно зменшуються.

2. Використання у народній медицині листя та фрагментарні дослідження їх хімічного складу і деяких фармакологічних ефектів свідчать про доцільність проведення комплексних фармакогностичних досліджень надземної частини та

порівняльного аналізу хімічного складу кореневищ і листя, а в подальшому комплексного застосування рослини та листя як додаткової сировини.

3. Умови зростання рослини значно впливають на хімічний склад сировини, зокрема таких груп БАР, як флавоноїди та ефірна олія, що відіграють роль адаптогенів до змін середовища. Відсутність сучасних досліджень хімічного складу вітчизняної сировини, з огляду на можливу токсичність компонентів ефірної олії, створюють передумови для детального вивчення вітчизняних зразків лепехи звичайної. Особливо важливим є вивчення динаміки накопичення флавоноїдів, гідроксикоричних кислот, ефірної олії та її компонента азарону, з яким пов'язують антибактеріальні, антидепресивні, нейропротекторні, анксиолітичні, протизапальні, цитотоксичні, інсектицидні, знеболювальні властивості і токсичність сировини.

4. Через застарілість нормативно-аналітичної документації на лепехи звичайної кореневища виникає необхідність у розробці відповідної монографії для внесення до Державної фармакопеї України, з використанням сучасних аналітичних методик, нових підходів до стандартизації кореневищ та стандартизації та розробці методів контролю якості на листя лепехи звичайної.

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

1. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Сіра Л. М. Азарон. Фармацевтична енциклопедія / гол. ред. ради та автор передмови В. П. Черних. URL : <http://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/14192/azaron> (дата звернення: 02.09.2020).

2. Підходи до розробки монографії «Лепехи звичайної кореневища» для включення у Державну фармакопею України / М. С. Яременко, Т. М. Гонтова, Л. М. Сіра, Е.Е. Котова, А.Г. Котов. *Управління, економіка та забезпечення якості в фармації*. 2017. № 1 (49). С. 22–26.

3. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Сіра Л. М. До питань використання та ідентифікації неофіцінальної сировини – листя *Acorus calamus* L. *Медична та клінічна хімія*. 2018. № 0 (1). С. 105–110.

4. Yaremenko, M. S. Perspective for using *Acorus calamus* leaves in medicine / M. S. Yaremenko, T. M. Gontova, E. E. Kotova. *Sciences and Pharmacy Practice 2018* : book of abstracts 9th International Conference dedicated to the 100-th anniversary of independent Lithuania's pharmacy, Kaunas, November 9, 2018. P. 60.

5. Перспективність розробки нових препаратів на основі листя лепехи звичайної / О. В. Андрюшаєв, О. А. Рубан, Ю. С. Маслій, М. С. Яременко. Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації : тези доп. II Наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених з міжнар. участю, 15 травн. 2020 р. Харків : Вид-во НФаУ, 2020. С. 28–29.

РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ, ЗАГАЛЬНІ МЕТОДИ ТА МЕТОДИКИ, ЗАСТОСОВАНІ В ДОСЛІДЖЕННЯХ

2.1 Об'єкти дослідження

Об'єктами досліджень стали зразки лепехи звичайної листя та кореневищ, заготовлені у 2013-2019 рр., а також рідкі екстракти, отримані з листя та кореневищ рослини. Зразки сировини були заготовлені на території 9 областей України (рис. 2.1, табл. 2.1). Відповідно до загальноновживаних рекомендацій кореневища рослини заготовляли ранньої весни або пізньої осені після відмирання надземної частини, листя в період масового цвітіння (червень-липень). Зібрані зразки піддавали повітряно-тіньовому сушінню, при температурі не вище 35 °С.

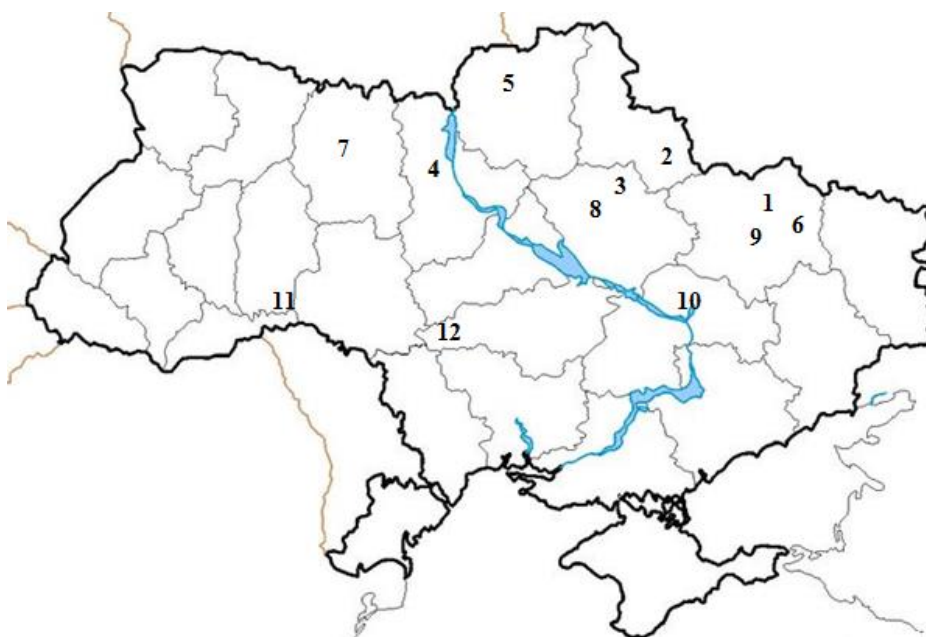


Рис. 2.1 Місця заготівлі сировини лепехи звичайної

Таблиця 2.1

Зразки сировини лепехи звичайної

№ з/п	№ зразка	Місце заготівлі	Географічні координати	Дата заготівлі
1	2	3	4	5
1	F-2	Харківська обл., с. Мартове	49.92625, 37.00163	17.03.2013
	R-2			02.10.2013

Продовж. табл. 2.1

1	2	3	4	5
	F-10	Харківська обл., с. Мартове	49.92151, 37.02356	15.06.2017
	R-10			01.07.2018
2	F-4	Сумська обл., с. Чернетчина	50.31451, 34.83796	28.03.2013
	R-4			10.10.2013
3	R-1	Полтавська обл., м. Гадяч	50.37457, 34.01301	29.10.2013
	F-1			15.04.2013
4	F-8	Київська обл., м. Ірпінь	50.54047, 30.24545	23.03.2015
	R-8			11.10.2015
	1(F)			03.06.2018
5	F-5	Чернігівська обл., м. Чернігів	51.47419, 31.29868	17.10.2013
	R-5			11.03.2013
	2(F)			13.06.2018
6	F-3	Харківська обл., м. Куп'янськ	49.69185, 37.61859	18.05.2013
	R-3			02.10.2013
	3(F)			01.06.2018
7	F-7	Житомирська обл., м. Житомир	50.23885, 28.61899	17.06.2013
	R-7			12.11.2013
	1(R)			05.11.2016
8	R-6	Полтавська обл., с. Петрівка-Роменська	50.35868, 33.74058	03.03.2014
	F-6			12.05.2014
	F-9			15.06.2017
	R-9			09.11.2017
	F-14			22.06.2019
	R-14			06.11.2019
9	1-d.f.	Харківська обл., с. Кампиця	49.67079, 36.41293	23.04.2017
	2-d.f.			13.06.2017
	3-d.f.			07.07.2017
	4-d.f.			26.08.2017
10	F-11	Дніпропетровська обл., м. Підгородне	48.55056, 35.15953	03.07.2018
	R-11			10.11.2018
11	F-13	Хмельницька обл., с. Березівка	48.63828, 27.22989	21.05.2019
	R-13			28.10.2019
12	F-12	Кіровоградська обл., м. Гайворон	48.33417, 29.85516	04.07.2018
	R-12			14.10.2018

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 при висушуванні, гравіметричний аналіз, титриметричний аналіз, ТШХ, ВЕТШХ, ВЕРХ, ГХ, ГХ-МС, АЕС, спектрофотометрія в ультрафіолетовій та видимій ділянках.

Втрата в масі при висушуванні. Визначення цього показника якості проводили відповідно до вимог ДФУ 2.2.32 «Втрата в масі при висушуванні» у всіх зразках сировини [167].

Гравіметричні методи. Кількісний вміст полісахаридів визначали гравіметричним методом з використанням методики описаної в ДФУ 2 видання монографії «Алтеї корені»[168]. Визначення вмісту полісахаридів проводили на серіях сировини F,R- 1, 1(R), 3 (F) та F,R-10.

Вміст суми водорозчинних полісахаридів, в перерахунку на абсолютно суху сировину, у відсотках, обчислювали за формулою (2.1):

$$x = \frac{(m_1 - m_2) \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot (100 - W)}, \quad (2.1)$$

де: m_1 – маса фільтра разом з осадом, у г;

m_2 – маса фільтра до аналізу, у г;

w – втрата в масі при висушуванні, у %;

m – маса наважки досліджуваної сировини, у г.

Зі шроту, що залишився після отримання водорозчинних полісахаридів, виділяли пектинові речовини. Екстракцію сировини проводили двічі сумішшю 0,5 % розчинів кислоти щавлевої P і амонію оксалату P (1 : 1, об./об.) у співвідношенні сировина – екстрагент 1 : 20 за температури 80-85 °С протягом 2 год. Отримані розчини об'єднували, концентрували й осаджували п'ятикратним об'ємом 96% етанолу. Після чого осад відфільтровували, промивали етанолом, висушували і зважували. З шроту, що залишився після отримання пектинових речовин,

виділяли геміцелюлозу А і Б. Екстракцію проводили двічі 7% розчином *натрію гідроксиду Р* у співвідношенні сировина – екстрагент 1 : 5 при кімнатній температурі протягом 12 год. Лужні витяжки об'єднували і підкислювали *кислотою оцтовою крижаною Р* до випадання осаду геміцелюлози А. Осад відфільтровували, промивали 96% етанолом, висушували і зважували. До отриманого фільтрату додавали двократний об'єм 96% етанолу. Отриманий осад відфільтровували, промивали 96% етанолом, висушували і зважували отриману фракцію геміцелюлози Б [169].

Титриметричні методи. Дослідження кількісного вмісту суми вільних органічних кислот проводили методом об'ємного титрування. Для цього 25,0 г (точна наважка) подрібненої на порошок сировини (1000) поміщали в колбу місткістю 250 мл, заливали 200 мл *води Р* та витримували на киплячій водяній бані протягом 2 год. Після чого охолоджували до кімнатної температури і кількісно переносили в мірну колбу місткістю 250 мл, доводили *водою Р* до позначки та перемішували [168].

10 мл отриманого розчину поміщали в колбу місткістю 500 мл, додавали 200 мл *води Р*, 1 мл *фенолфталеїну розчину Р1*, 2 мл розчину 1г/л *метиленового синього Р* і титрували 0,1 М розчином *натрію гідроксиду Р* до появи в піні світло-фіолетово-червоного забарвлення.

Вміст органічних кислот (X), у перерахунку на яблучну кислоту, у відсотках, обчислювали за формулою (2.2):

$$X = \frac{V \cdot 0,0067 \cdot 2500}{m}, \quad (2.2)$$

де: 0,0067 – кількість яблучної кислоти, що відповідає 1 мл 0,1 М розчину *натрію гідроксиду*, у г;

V – об'єм розчину *натрію гідроксиду Р*, витраченого на титрування, у мл;

m – маса наважки сировини лепехи звичайної, у г.

Визначення жирної олії проводили відповідно до методики описаної в ДФУ. 5,00 г подрібненої сировини (355) поміщали у круглодонну колбу місткістю 100 мл, додавали 50 мл *хлороформу Р*, нагрівали зі зворотним холодильником протягом

60 хв, охолоджували і фільтрували в іншу, попередньо зважену круглодонну колбу. Залишок у першій колбі промивали 25 мл, змиви фільтрували у ту саму зважену колбу, одержаний екстракт випарювали до видалення хлороформу. Круглодонну колбу з жирною олією висушували у сушильній шафі при температурі 105 °С до постійної маси [168].

Вміст жирної олії, у відсотках, у перерахунку на суху сировину, обчислювали за формулою:

$$X = \frac{m \times 100 \times 100}{m_1 - \times (100 - w)}, \quad (2.3)$$

де: m – маса жирної олії, у г;

m_1 – маса наважки сировини лепехи звичайної, у г;

w – втрата в масі при висушуванні, у %.

Тонкошарова хроматографія. Ідентифікацію сировини лепехи на наявність фенольних сполук, зокрема флавоноїдів та гідроксикоричних кислот, на наявність β -ситостерину і деяких компонентів ефірної олії проводили з використанням ТШХ. Визначення кількісного вмісту азарону проводили методом ВЕТШХ.

Для проведення досліджень використовували повітряно-суху сировину, подрібнену на лабораторних млинах ЛЗМ-1 і ЛЗМК-1 та просіяну крізь сита № 355 і 710, з якої готували метанольні та етанольні витяги [168].

Хроматографування проводили з використанням пластинок Merk Silica gel 60 F₂₅₄ на скляній або металічній основі. Хроматографічні системи готували з використанням розчинників кваліфікації «ч.д.а.», «х.ч.» або «для ВЕРХ».

Вивчення якісного складу полісахаридних комплексів проводили методом тонкошарової хроматографії на зразках сировини F,R-1, 1(R), 3 (F) та F,R-10 [169].

Випробовуваний розчин. 100,0 мг полісахаридної фракції поміщали в конічну колбу місткістю 25 мл, розчиняли у мінімальному об'ємі води P і гідролізували таким же об'ємом 20% розчину кислоти сульфатної при нагріванні на водяній бані протягом 6 годин. Гідролізат нейтралізували насиченим розчином барію гідроксиду до рН 5,3. Отриманий розчини фільтрували, промиваючи фільтри і осади водою. Отримані фільтрати упарювали під вакуумом до сухого залишку, які

розчиняли у 0,5 мл 96% етанолу.

Хроматографування проводили двократно в системі розчинників *ацетон Р – н-бутанол Р – вода Р* (7 : 2 : 1) та *н-бутанол Р – кислота оцтова льодяна Р – вода Р* (4 : 12) у присутності вірогідних зразків моносахаридів. Як стандартні зразки моносахаридів використовували галактозу, глюкозу, ксилолу, рамнозу та фруктозу (концентрація усіх розчинів становила 1 мг/мл). Хроматограми висушували на повітрі, обробляли анілінфталатним реактивом і нагрівали у сушильній шафі при температурі 100-105 °С протягом 5-10 хв. Результати переглядали при денному світлі.

Ідентифікацію флавоноїдів та гідроксикоричних сполук методом ТШХ проводили у таких системах:

1) *мурашина кислота безводна Р – кислота оцтова безводна Р – вода очищена Р – етилацетат* (7,5 : 7,5 : 17,5 : 67,5);

2) *мурашина кислота безводна Р – вода очищена Р – метилетилкетон Р – етилацетат Р* (10 : 10 : 30 : 50).

Хроматографічні профілі обробляли 10 г/л *аміноетиловим ефіром дифенілборної кислоти Р* у метанолі *Р* та 50 г/л *макроголу 400 Р* у метанолі *Р*, через 30 хв визначали за забарвленням у денному світлі та за їх флуоресценцією у фільтрованому УФ-світлі при 365 нм [168].

Як розчин порівняння використовували розчин *кофейної та хлорогенової кислот, гіперозиду, рутину, лутеоліну, лутеолін-7-глікозиду, флароніну*. Для хроматографування використовували метанольні витяжки з досліджуваної сировини, які готували таким чином: до 1,0 г сировини подрібненої на порошок та просіяної крізь сито № 355 додавали 10 мл *метанолу Р*, нагрівали на водяній бані при температурі 65 °С протягом 5 хв, охолоджували і фільтрували.

Виявлення β-ситостерину проводили за методикою у тонкому шарі сорбента відповідно до монографії ДФУ «Пальми сереноа плоди» у зразках кореневищ R-8, 14 та листя L-8 [168]. Випробовуваний розчин із сировини лепехи звичайної готували таким чином: до 1,5 г подрібненої на порошок сировини (710) додавали 20 мл *етанолу (96%) Р*, струшували протягом 15 хв, після чого фільтрували крізь

паперовий фільтр «синя стрічка». Хроматографування проводили в системі розчинників *оцтова кислота льодяна Р – етилацетат Р – толуол Р* (1 : 30 : 70). Для проявлення хроматографічні пластинки обробляли *анісового альдегіду розчином Р* і нагрівали при температурі 100-105°C протягом 5-10 хв. Після чого переглядали при денному світлі.

Ідентифікацію азарону методом ТШХ проведено у всіх серіях сировини лепехи звичайної. Для дослідження використовували метанольні витяги з ЛРС. Метанольні витяги отримували з 1,0 г свіжеподрібненої на порошок сировини додавали 10 мл *метанолу Р*, після чого нагрівають протягом 1 хв на водяній бані при температурі 60 °С, охолоджували і фільтрували. Як розчин порівняння використовували стандартний зразок α -азарону фірми «Sigma-Aldrich». Використовували хроматографічну систему *толуол Р – етилацетат Р* (93 : 7). Обробку ТШХ проводили розчином *анісового альдегіду Р* із подальшим нагріванням у сушильній шафі при температурі від 100 до 105 °С протягом 5-10 хв. Переглядали при денному світлі.

Високоєфективна тонкошарова хроматографія. Для хроматографування з подальшим денситометричним обчисленням кількісного вмісту азарону обрано хроматографічну пластину HPTLC plates silica gel 60 F₂₅₄ (Merc), 10 x 10 cm. Досліджуваний розчин із кореневищ лепехи звичайної готували у концентрації 0,2 г/мл. Для напівавтоматичного нанесення зразків на хроматографічну пластину використовували аплікатор Linomat 5 (Camag) зі швидкістю нанесення 150 нл/с.

Хроматографування проводили за тих самих умов, що й ідентифікацію азарону методом ТШХ на зразку R-8. 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».

Спектрофотометрія. Визначення вмісту БАР сировини лепехи звичайної проводили за: вмістом суми флавоноїдів і суми гідроксикоричних кислот на базі ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів" за консультативною допомогою завідувача сектора «Експериментальна підтримка

розробки монографій на ЛРС», к. фарм. н. Е. Е. Котової.

При визначенні загального вмісту сполук поліфенольної природи використовували методику ДФУ, описану в ст. 2.8.14. «Визначення танінів у лікарській рослинній сировині» [167]. Усі операції з екстрагування та розведення здійснювали у захищеному від світла місці.

Вміст поліфенолів, у перерахунку на пірогалол, у відсотках, у сировині (2.4) та екстрактах (2.5) обчислювали за формулами:

$$x (\%) = \frac{A_1 \cdot m_2 \cdot 250 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 5 \cdot 2 \cdot 100 \cdot 100}{A_2 \cdot m_1 \cdot 5 \cdot 2 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 25 \cdot (100 - W)} = \frac{A_1 \cdot m_2 \cdot 62,5 \cdot 100}{A_2 \cdot m_1 \cdot (100 - W)}, \quad (2.4)$$

$$x (\%) = \frac{A_1 \cdot m_2 \cdot 250 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 5 \cdot 2 \cdot 100}{A_2 \cdot m_1 \cdot 5 \cdot 2 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 25} = \frac{A_1 \cdot m_2 \cdot 62,5}{A_2 \cdot m_1}, \quad (2.5)$$

де: A_1 – оптична густина випробовуваного розчину при довжині хвилі 760 нм;

A_2 – оптична густина розчину порівняння при довжині хвилі 760 нм;

w – втрата в масі при висушуванні сировини, у %.

m_1 – маса наважки випробовуваного зразка, у г;

m_2 – маса наважки пірогалолу, у г.

Визначення кількісного вмісту суми флавоноїдів здійснювали уніфікованими спектрофотометричними методами у перерахунку на гіперозид, що наведені у ДФУ 2.1, монографії «Глоду листя та квітки^N» та «Берези бруньки» [170].

У дослідженні кількісного вмісту суми флавоноїдів за методикою описаною в монографії «Глоду листя та квітки^N», що заснована на визначенні флавоноїдів після реакції із сумішшю борної і щавлевої кислот у суміші мурашиної та оцтової кислот у всіх заготовлених зразках листя лепехи звичайної.

Випробовуваний розчин екстрактів готували таким чином: рідкі екстракти у кількості 1,000 г розчиняли у колбі місткістю 100 мл, доводили об'єм розчину *етанолом* (70 % об/об) *P* до позначки і перемішували. Далі дослідження проводилося відповідно до методики описаної у відповідній монографії [168].

Вміст флавоноїдів, у перерахунку на гіперозид, у сировині (2.6) та в екстрактах (2.7) обчислювали у відсотках за формулами:

$$x (\%) = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{m \cdot 5 \cdot 405 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 1,235 \cdot 100}{m \cdot (100 - W)}, \quad (2.6)$$

$$x (\%) = \frac{A \cdot 100 \cdot 25}{m \cdot 5 \cdot 405} = \frac{A \cdot 1,235}{m}, \quad (2.7)$$

де: A – оптична густина випробовуваного розчину при довжині хвилі 410 нм;

m – маса наважки випробовуваного зразка, у г;

405 – питомий показник поглинання гіперозиду при довжині хвилі 410 нм;

w – втрата в масі при висушуванні сировини, у %.

Визначення кількісного вмісту суми флавоноїдів за методикою монографії «Береги листя» ґрунтується на здатності флавоноїдів вступати в реакцію з алюмінієм хлоридом. Оптичну густина випробовуваного розчину вимірювали через 30 хв у порівнянні із компенсаційним розчином при довжині хвилі 425 нм [168].

Вміст флавоноїдів, у перерахунку на гіперозид, у сировині L,R-8 (2.8) та в екстрактах (2.9) обчислювали у відсотках за формулами:

$$x (\%) = \frac{A \cdot 100 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{m \cdot 20 \cdot 10 \cdot 500 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 1,25 \cdot 100}{m \cdot (100 - W)}, \quad (2.8)$$

$$x (\%) = \frac{A \cdot 100 \cdot 50 \cdot 25}{m \cdot 20 \cdot 10 \cdot 500} = \frac{A \cdot 1,25}{m}, \quad (2.9)$$

де: A – оптична густина випробовуваного розчину при довжині хвилі 425 нм;

m – маса наважки випробовуваної сировини, у г;

500 – питомий показник поглинання гіперозиду при довжині хвилі 425 нм;

w – втрата в масі при висушуванні сировини, у %.

Кількісний вміст суми гідроксикоричних кислот визначали у зразках сировини лепехи звичайної серії F,R-8 спектрофотометричним методом у перерахунку на хлорогенову кислоту, який наведено у ДФУ 2.0 монографії «Кропива листя» [168].

Оптичну густина випробовуваних розчинів вимірювали відразу при довжині хвилі 525 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи як розчин порівняння компенсаційний розчин.

Вміст суми гідроксикоричних кислот, у перерахунку на кислоту хлорогенову (у відсотках), у сировині (2.10) та екстракті (2.11) обчислювали за формулами:

$$x (\%) = \frac{A \cdot 1000 \cdot 100}{m \cdot 188 \cdot (100 - W)}, \quad (2.10)$$

$$x (\%) = \frac{A \cdot 1000}{m \cdot 188}, \quad (2.11)$$

де: A – оптична густина випробовуваного розчину при довжині хвилі 525 нм;
188 – питомий показник поглинання хлорогенової кислоти при довжині хвилі 525 нм;

w – втрата в масі при висушуванні сировини, у %.

m – маса наважки випробовуваного зразка, у г.

Спектрофотометричне визначення антирадикальної активності кореневищ і листя лепехи звичайної проводили за методом R. Re et al. на зразках листя та кореневищ лепехи звичайної F,R-1, 3, 5, 7, 8, 12 та 13 [171].

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».

Катіонний радикал $ABTS^+$ отримували шляхом реакції між 7мМ водним розчином $ABTS$ (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) і 2,4 мМ розчину персульфату калію, змішаних у рівних кількостях, що зберігалися в темряві при кімнатній температурі протягом 16 год перед використанням. Після чого отриманий розчин розбавляли водою до моменту, поки не було досягнуто оптичне поглинання на рівні 0,900 AU при довжині хвилі 734 нм і в подальшому використовували як робочий розчин.

До 100 мкл досліджуваного розчину додавали 4,9 мл робочого розчину $ABTS$ і через 30 хв вимірювали оптичне поглинання.

Для розрахунку антирадикальної активності за допомогою стандартного розчину Trolox, було побудовано калібрувальний графік. Визначення проводили у перерахунку на Trolox еквівалент та суху сировину за формулою:

$$TE_{ABTS} = \frac{C \cdot V \cdot 100}{m \cdot (W - 100)},$$

де: C – Trolox концентрація в мкг/л із калібрувального графіка;

V – об'єм досліджуваного розчину, у л;

m – маса наважки сировини, у г;

W – втрата в масі при висушуванні, у %.

Кількісний вміст вітамінів групи В визначали для вітаміну B_1 – у перерахунку на тіамін, та вітаміну B_2 , у перерахунку на рибофлавін. Вміст вітаміну РР визначали методом флуориметрії у перерахунку на нікотинову кислоту, вміст вітаміну Е – методом спектрофотометрії у перерахунку на суму токоферолів. Для аналізу використовували СФ-46 та флуориметр ЕФ-3МА [172]. Дослідження проводили у випробувальному центрі Інституту тваринництва УААН за консультативної допомоги м. н. с. М. М. Долгої у досліджуваних зразках F,R-8.

Атомно-емісійна спектрометрія. Елементний склад сировини лепехи звичайної (серії F,R-8) визначали АЕС на базі Інституту монокристалів НАН України. Калібрувальні графіки будували з використанням стандартних розчинів солей металів (ІСОРМ-23-27) в інтервалі вимірюваних концентрацій. Випарювання проб проводили у розряді дуги змінного струму силою 16 А та часу експозиції 60 с. Як джерело збудження спектрів використовували атомізатор ІВС- 28. Спектри реєстрували на фотоплівці за допомогою спектрографа ДФС-8-3 із фракційною решіткою 600 штр/мм і трилінзовою системою освітлення щілини [173].

Вимірювання інтенсивності спектрів досліджуваних проб і стандартних розчинів солей металів проводили з використанням мікрофотометра МФ-4. Детектування проводили при довжині хвилі 230–347 нм у порівнянні із державними стандартними зразками суміші мінеральних елементів. Відносне стандартне відхилення не перевищувало 3 % ($n = 5$) при визначенні числових величин концентрацій елементів [173].

Визначення якісного складу та кількісного вмісту амінокислот у досліджуваних сировині проводили методом іонообмінної хроматографії за допомогою автоматичного амінокислотного аналізатора ААА Т-339М (Чехія) на базі Інституту тваринництва НААН України у сировині серія № R-1, F-3, F, R- 7 та F, R-8.

Високоєфективна рідинна хроматографія. Визначення кількісного вмісту азарону в сировині лепехи звичайної та рідких спирто-водних екстрактах проводили з використанням високоєфективного рідинного хроматограф ProStar,

укомплектованого діодно-матричним детектором PDA model 330 (фірми «Varian», США) на базі Державної науково-дослідної лабораторії з контролю якості лікарських засобів НФаУ за наукової консультації к. фарм. н. С. М. Губарь. Для визначення вмісту азарону була використана колонка Purospher® STAR RT-18e, Hibar (250 x 4,0 мм, розмір часток 5 мкм), фірми «Merck». Як стандарт використовували стандартний зразок α -азарону виробництва фірми «Sigma-Aldrich». Дослідження проводили на зразках сировини F,R-1, 7, 8, 14.

Визначення якісного складу та кількісного вмісту сполук фенольної природи проводили на базі кафедри фармакогнозії Литовського університету наук про здоров'я (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas). Аналіз проводили з використанням високоефективного рідинного хроматографу Waters e2695 Alliance system (фірм«Waters», США) укомплектованого спектрофотометричним детектором Waters 2998. Дослідження проводили використовуючи октадецилільну хроматографічну колонку ACE C18 150 мм x 4,6 мм (фірми «АСТ», Великобританія), із розміром сорбенту 3 мкм.

Хроматографування проводили в градієнтному режимі, використовуючи як рухому фазу А: 0,05% розчин *трифтороцтової кислоти Р* та *ацетонітрил Р* як рухомц фазу Б. Швидкість рухомої фази – 0,5 мл/хв; об'єм інжекції – 10 мкл. Градієнтний режим наведено в таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Програма для градієнта хроматографування

Час, хв	Рухома фаза А (% , об/об)	Рухома фаза В (% , об/об)
0	88	12
5	88	12
50	70	30
51	10	90
56	10	90
57	88	12

Ідентифікацію індивідуальних речовин проводили за часом утримання та характерними максимумами поглинання у порівнянні з хроматограмами стандартних розчинів. Визначення кількісного вмісту сполук фенольної природи

розраховували за допомогою калібрувальних графіків побудованих з використанням розчинів стандартних зразків сполук фенольної природи [174].

Визначення антирадикальної активності сполук фенольної природи методом ВЕРХ хроматографії проводили за такою методикою [174]: після дослідження якісного складу та кількісного вмісту сполук фенольної природи методом ВЕРХ рухому фазу, що містила аналіти, вводили в реакційну котушку Waters PCR module (фірми «Waters», США) через змішувальний трійник, куди одночасно подавали реагент ABTS (розділене співвідношення, 1 : 1) насосом Гілсона 305 (фірми «Waters», США). Налаштування системи: діапазон температур встановлювали при 50 °C, а витрата реагенту – 0,5 мл/хв.

Розчин ABTS готували за методами, описаними Раудонісом та ін. [175, 176].

Реакція антиоксидантних сполук з реагентом ABTS призвела до зміни кольору, що було виявлено за допомогою додаткового Waters 2487 UV/VIS детектору (фірми «Waters», США). Виявлення ABTS у розчині реєстрували при довжині хвилі 650 нм. Як показник для вибору умов аналізу була обрана висота негативних піків активних сполук. Антиоксидантну активність екстрактів оцінювали шляхом порівняння їх активності зі стандартом Trolox. Калібрувальні криві готували зі стандартного розчину Trolox у восьми розведеннях у межах 0,625 – 80 мг/мл. Калібрувальна крива, що утворилася, була еквівалентною стандартному розчину Trolox і виражалася таким квадратичним рівнянням: $R^2 (ABTS) = 0,9991$ ($Y = -1,54 \cdot 10^2 x^2 + 4,16 \cdot 10^4 x - 2,08 \cdot 10^4$) [177].

Хромато-мас-спектрофотометричний аналіз органічних та жирних кислот. Дослідження жирно-кислотного складу проводили відповідно до загальноновживаної методики з використанням газового хроматографа.

Хромато-мас-спектрофотометричний аналіз ефірної олії. Ефірну олію отримували методом гідродистиляції відповідно до ДФУ 2.0 ст. 2.8.12 «Визначення вмісту ефірних олій в лікарській рослинній сировині» [167].

Методика 1. Кількісний вміст речовин у зразках F, R-8 визначали методом нормалізації по відношенню площі піка компонента до суми площ усіх піків на хроматограмі. Дослідження здійснювали використовуючи хроматограф Agilent

Technologies 6890N із мас-спектрометричним детектором 5973. Ідентифікацію речовин проводили з використанням баз даних мас-спектрів NIST05 і WILEY 2007 разом зі спеціалізованими програмами для ідентифікації AMDIS і NIST [178].

Методика 2. Дослідження якісного складу компонентів ефірної олії у отриманих екстрактах методом ГХ-МС у порівнянні зі стандартними зразками речовин проводили з використанням газової хроматографії – системи мас-спектрометрії GCMS-QP2010 (фірми «Shimadzu», Японія) та хроматографічної капілярної колонки RXI-5ms «Restek Corporation» (завдовжки 30 м, з зовнішнім діаметром 0,25 мм і товщиною фази 0,25 мкм стаціонарної фази) з рідкою нерухомою фазою (5% дифенілу та 95% полісилоксану), як газ-носіє хроматографії використано гелій [179].

2.2.2 Фармакогностичні методи аналізу

Фармакогностичні дослідження проводилися згідно з методами аналізу ДФУ 2.8 «Методи фармакогнозії» [167].

Відбір проб і пробопідготовку сировини лепехи звичайної проводили відповідно до вимог ДФУ монографії 2.8.20 «Лікарська рослинна сировина: відбір проб і пробопідготовка» [167].

Визначення вмісту сторонніх домішок проводили відповідно до вимог ДФУ 2.8.2 «Сторонні домішки у лікарській рослинній сировині» [167].

Зола, нерозчинна у хлористоводневій кислоті. Визначення проводили відповідно до вимог ДФУ 2.8.1 «Зола, нерозчинна в хлористоводневій кислоті» [167].

Макро- і мікроскопічне дослідження сировини лепехи звичайної для аналізу проводили згідно з методикою ДФУ 2.8.23 «Мікроскопічне дослідження лікарської рослинної сировини». Досліджували як цільну сировину лепехи (препарати з поверхні та поперечні зрізи), так і подрібнену на порошок та просіяну крізь сито 355. Порошковану сировину подрібнювали згідно з вимогами ДФУ монографії 2.9.12 «Ситовий аналіз» і просвітлювали за допомогою хлоралгідрату Р [167].

Діагностичні ознаки встановлювали з використання мікроскопів МБР-1 та МБІ-6 ЛОМО при збільшеннях у 80, 120, 300, 600 та 800 разів. Фіксували результати дослідження за допомогою фотокамери Canon IXUS 220 HS.

Вміст екстрактивних речовин досліджуваної сировини визначали за методикою монографії «Полин гіркий^N» [168]. Визначення проводили з використанням як екстрагент *воду Р* та *спирту етилового Р* різної концентрації: 30, 50, 70 та 96 %.

Визначення сухого залишку екстракту проводили у зразках сировини серії № 3-d.f та R-8 у відповідності до вимог ДФУ, які зазначені у монографії 2.8.16 «Визначення сухого залишку екстрактів» [167].

Кількісне визначення ефірної олії у сировині. Визначення проводили методом перегонки з водяною парою за вимогами ДФУ 2.8.12 «Визначення вмісту ефірних олій в лікарській рослинній сировині» у всіх заготовлених зразках ЛРС [167].

Загальна зола. Визначали відповідно до вимог ДФУ 2.4.16 «Загальна зола» [167].

Вміст етанолу в екстрактах. Досліджували пікнометричним методом відповідно до методики ДФУ 2.0, монографія 2.9.10 «Вміст етанолу й алкоголеметричні таблиці» [167].

Визначення важких металів проводили згідно з вимогами ДФУ, монографія 2.4.8 «Важкі метали» з використанням методу А на базі ДНУ НКТ «Інститут монокристалів» НАН України на зразках F,R-1, 3, 5, 7, 8 [167].

2.2.3 Фармакологічні методи досліджень

Визначення гострої токсичності та протизапальної активності рідкого екстракту листя лепехи звичайної та рідкого екстракту кореневищ рослини проводили на базі кафедри фармакології Національного фармацевтичного університету за консультативною допомогою д. мед. н., проф. Л. В. Деримедвідь.

Протизапальну активність отриманого екстракту листя лепехи звичайної вивчали на моделях індукованого карагеніном набряку лапи та гістамінового

запалення лапи щурів [181, 182].

2.2.4 Технологічні випробування

Подрібнення всіх досліджуваних зразків ЛРС визначали за ДФУ 2.9.12 «Ситовий аналіз». Середньоподрібнений порошок: не менше 95 % маси порошку має проходити через сито номер 355 і не більше 40 % маси порошку – крізь сито номер 180 [167].

Визначення таких технологічних параметрів, як *питома, об'ємна та насипна маси і середній розмір частинок, пористість сировини, порізність шару, вільний об'єм та питому поверхню часток* проводили за методиками, наведеними у наукових джерелах на сировині серії № 3-d.f та R-8 [183].

Ваги аналітичні Kern ABJ 220-4M, водяна баня HWS 12, прилад ВП-12А, мірний посуд. Усі реактиви готували відповідно до вимог ДФУ і використовували свіжоприготованими.

2.2.5 Статистична обробка результатів

Статистична обробка отриманих результатів проводилася відповідно до вимог ДФУ, монографії 5.3 «Статистичний аналіз результатів біологічних випробувань та тестів» та 5.3.N.1 «Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту^N» з використанням програми «SPSS Statistics 26.0». Використовували непараметричний критерій Манна–Уїтні, при порівнянні статистичних показників був прийнятий рівень значущості $p < 0,05$. Для побудови структурних формул сполук використовували програмне забезпечення ACD/ChemSketch [167].

РОЗДІЛ 3. ВИВЧЕННЯ ЯКІСНОГО СКЛАДУ ТА КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ ОСНОВНИХ ГРУП БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН ЛИСТЯ ТА КОРЕНЕВИЩ ЛЕПЕХИ ЗВИЧАЙНОЇ

3.1 Порівняльне вивчення якісного складу та кількісного вмісту основних сполук у сировині

Аналіз літературних джерел показав, що головними діючими компонентами кореневищ лепехи звичайної є полісахариди та ефірна олія. Більшість наукових публікацій зосереджено на дослідженні саме підземної частини рослини, тоді як відомості про компонентний склад БАР листя обмежені, а дослідження вітчизняних зразків не проводилися. Враховуючи те, що заготівля кореневищ відбувається після відмирання надземної частини рослини, на першому етапі роботи встановлено, яке відсоткове співвідношення припадає на кореневища та листя рослини. Визначення проводили методом зважування окремих органів сухої сировини. Результати отримані при аналізі 40 окремо заготовлених рослин показали, що маса листя становить не менше 36 % від загальної маси рослини, кореневищ (без коренів) – близько 63 %. Через те, що при раціональній заготівлі надземної частини, рослина практично не пошкоджується і не втрачає життєздатності, при додатковому використанні листя можна значно зменшити навантаження на популяцію виду, не втрачаючи при цьому заготівельної здатності. Тому доцільно провести порівняльне дослідження хімічного складу листя і кореневищ, розробити ЛРП на їх основі та провести їх стандартизацію.

3.1.1 Полісахариди

Для рослинних полісахаридів встановлено багато фармакологічних властивостей: протизапальні, пом'якшувальні, обволікавальні, репаративні, протипухлинні, протизапальні та ін. Дослідження вказують на значну біологічну активність полісахаридів кореневищ лепехи, зокрема протипухлинну [62].

У ході проведених досліджень визначено та порівняно кількісний вміст полісахаридних фракцій кореневищ та листя лепехи звичайної. Кількісний вміст полісахаридів визначали гравіметричним методом відповідно до методики ДФУ 2.0 (розд. 2.2.1). Отримані результати наведено в табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Результати кількісного вмісту полісахаридних фракцій кореневищ та листя лепехи звичайної, n = 3

Полісахаридний комплекс	Вміст у листі, %	Вміст у кореневищах, %
ВРПС	$2,96 \pm 0,11$	$3,41 \pm 0,14$
Пектинові речовини	$3,73 \pm 0,02$	$5,20 \pm 0,22$
Геміцелюлоза А	$1,44 \pm 0,03$	$2,12 \pm 0,09$
Геміцелюлоза Б	$6,99 \pm 0,04$	$9,03 \pm 0,10$

Виявлено, що кількісний вміст полісахаридних фракцій дещо вищий у кореневищах рослини. Вміст ВРПС у кореневищах складав $3,41 \pm 0,14$ %, що в 1,2 разу більше, ніж у листі, пектинових речовин – $5,20 \pm 0,22$ %, що у 1,4 разу більше, ніж у листі. Вміст геміцелюлози А і Б переважав у кореневищі, ніж у листі, в 1,5 та 1,3 рази відповідно [184, 185].

Якісний склад водорозчинних полісахаридів листя та кореневищ лепехи звичайної визначали методом ТШХ (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Результати вивчення якісного складу полісахаридних фракцій листя та кореневищ лепехи звичайної

Об'єкт дослідження	Гідролізат фракції	Моносахарид				
		галактоза	глюкоза	ксилоза	рамноза	фруктоза
1	2	3	4	5	6	7
Листя	ВРПС	+	+	—	—	+
	ПР	+	+	+	+	—
	ГЦ А	—	+	—	—	—
	ГЦ Б	—	+	—	—	—

Продовж. табл. 3.2

1	2	3	4	5	6	7
Кореневища	ВРПС	+	+	—	—	+
	ПР	+	+	+	+	—
	ГЦ А	—	+	—	—	—
	ГЦ Б	—	+	—	—	—

Примітка. (+) – речовина ідентифікована; (—) – речовина не ідентифікована.

У фракції водорозчинних полісахаридів ідентифіковано 3 простих цукри: галактозу, глюкозу і фруктозу. У пектині виявлено галактозу, глюкозу, ксилозу і рамнозу, а фракції у геміцелюлози А і Б – лише глюкозу.

Отже, визначений якісний мономерний склад надземної та підземної частин рослини практично однаковий.

3.1.2 Амінокислоти

У результаті проведеного порівняльного аналізу амінокислотного складу листя та кореневищ лепехи звичайної визначено 17 амінокислот, з яких 7 сполук незамінні і 10 замінні амінокислоти. Результати наведено в табл. 3.3.

Таблиця 3.3

Результати порівняльного аналізу якісного складу та кількісного вмісту амінокислот у листі та кореневищах лепехи звичайної

Амінокислота	Вміст у листі, %	Вміст у кореневищах, %
1	2	3
Аспарагінова*	0,69	0,48
Серин*	0,72	0,47
Глутамінова*	0,68	0,45
Пролін*	0,42	0,22
Цистин*	0,34	0,11
Гліцин*	1,42	0,89

Продовж. табл. 3.3

1	2	3
Аланін*	1,07	0,56
Тирозин*	0,08	0,04
Гістидин*	0,15	0,08
Аргінін*	0,98	0,55
Треонін**	0,37	0,21
Валін**	0,98	0,45
Метіонін**	0,15	0,04
Ізолейцин**	0,44	0,16
Лейцин**	0,53	0,28
Фенілаланін**	0,52	0,27
Лізин**	0,75	0,41
<i>Сума незамінних</i>	<i>3,74</i>	<i>1,82</i>
<i>Сума замінних</i>	<i>6,55</i>	<i>3,85</i>
<i>Сума загальна</i>	<i>10,29</i>	<i>5,67</i>
<i>Протеїн сирий</i>	<i>11,84</i>	<i>6,26</i>
<i>Нітроген</i>	<i>1,894</i>	<i>1,001</i>

Примітка. * – замінна амінокислота; ** – незамінна амінокислота.

Виявлено, що при ідентичному якісному складі амінокислот кількісний вміст переважав у листі. Так, гліцину накопичувалося 1,42 мг / 100 г, що майже вдвічі більше, ніж у кореневищах, де сполука містилася в кількості 0,89 мг / 100 г. Незамінні амінокислоти валін і лізин, що в кореневищах накопичувалися практично на одному рівні (0,45 і 0,41 мг / 100 г відповідно) у листі накопичувались у більшій кількості (0,98 і 0,75 мг / 100 г). Вміст аланіну був на рівні 1,07 мг / 100г у листі проти 0,56 мг / 100 г у кореневищах. У надземній частині рослини цистину, ізолейцину і метіоніну виявлено втричі більше, ніж в підземній. Сума незамінних амінокислот в листі складав 3,74 мг / 100 г, а в кореневищах – 1,82 мг / 100 г. Визначено, що сума замінних амінокислот у листі становить майже 6,55 мг / 100 г, у кореневищах – 3,85 мг / 100 г. Вміст сирого протеїну практично вдвічі вищий у

листі лепехи звичайної (11,84 %), ніж у кореневищах (6,26 %). Загальний вміст нітрогену вищий у надземній частині рослини [186, 187]. Високий та різноманітний вміст амінокислот у листі вказує на перспективність поглибленого вивчення цього виду сировини і розробки нових ЛРП.

3.1.3 Карбонові кислоти

Дослідження сумарного вмісту вільних органічних кислот та жирної олії у сировині лепехи звичайної проводили методами титриметрії. В ході експерименту визначено, що вміст вільних органічних кислот (у перерахунку на яблучну кислоту) в кореневищах складав $2,31 \pm 0,21$ %, у листі – $3,17 \pm 0,18$ %. Дослідження вмісту жирної олії виявило незначну різницю між накопиченням цієї групи БАР у надземній та підземній частині рослини – $1,83 \pm 0,22$ % та $1,78 \pm 0,15$ % відповідно.

Проведено визначення якісного складу та кількісного вмісту карбонових кислот у досліджуваних об'єктах методом ГХ-МС. Результати наведено в табл. 3.4.

Таблиця 3.4

Карбонові кислоти у листі та кореневищах лепехи звичайної

Кислота	Вміст, мкг/г	
	Листя	Кореневища
1	2	3
Капронова	47,73	4,03
3-Гексенова	8,62	–
Щавлева	1119,71	111,90
Малонова	–	25,12
Фумарова	112,62	9,22
Левулінова	3065,15	3076,07
Бурштинова	261,29	46,33
Бензойна	15,20	4,26
Саліцилова	2,32	5,15
Лауронова	80,03	7,39
Яблучна	993,87	741,56

Продовж. табл. 3.4

1	2	3
Міристинова	—	68,14
Пентадеканова	25,16	25,50
Азелаїнова	61,97	—
Пальмітинова	2225,93	1636,06
Пальмітолеїновая	186,68	70,81
Гептадеканова	134,81	—
Лимонна	852,64	500,78
Стеаринова	573,87	295,92
Олеїнова	179,68	474,56
Лінолева	1772,63	2093,07
Ліноленова	2760,23	920,35
Ванілінова	—	6,38
Арахінова	233,96	60,25
Пальмітинова	311,72	73,82
Хенейкозанова	21,71	—
Бегенова	224,04	83,95
Гексадекандікарбонова	—	23,39
<i>n</i> -Кумарова	33,05	—
Трикозанова	97,57	39,97
Бузкова	25,87	6,52
Гентизинова	7,26	7,78
Тетракозанова	266,21	53,55
Ферулова	56,35	29,64

Примітка. (—) – не ідентифіковано.

У зразках листя лепехи звичайної виявлено та ідентифіковано 30 карбонових кислот, із них 5 належать до одноосновних, 5 до двоосновних, 1 до триосновних, 13 до жирних і 7 до ароматичних: бензойна, фенолкарбонові –саліцилова, ванілінова, бузкова, гентизинова; гідроксикоричні – *n*-кумарова та ферулова. Домінували щавлева (1119,71 мкг/г), левулінова (3065,15 мкг/г), малонова (993,87 мкг/г), пальмітинова (2225,93 мкг/г), лимонна (852,64 мкг/г), стеаринова (573,87 мкг/г), лінолева (1772,63 мкг/г) та ліноленова (2760,23 мкг/г) кислоти.

У кореневищах лепехи виявлено та ідентифіковано 29 сполук, які належать до карбонових кислот, з них по 5 одноосновних та двоосновних, 1 триосновна, 12 жирних і 6 ароматичних. Домінували левулінова (3076,07 мкг/г), малінова (741,56 мкг/г), пальмітинова (1636,06 мкг/г), лимонна (500,78 мкг/г), олеїнова (474,56 мкг/г), лінолева (2093,07 мкг/г) та ліноленова (920,35 мкг/г) кислоти.

Загальний вміст карбонових кислот у листі лепехи звичайної складає 15757,88 мкг/г, а у кореневищах – 10501,47 мкг/г, що в 1,5 разу менше. В цілому якісний склад надземної і підземної частин досить схожий. Із 30 та 29 (відповідно) виявлених та ідентифікованих речовин 25 виявлено в обох видах сировини. В листі лепехи звичайної, на відміну від кореневищ, накопичують 3-гексенова, азелаїнова, гептадеканова, хенейкозанова і *n*-кумарова кислоти. Міристинова, ванілінова та гексадекандикарбонова кислоти ідентифіковано лише в кореневищах рослини.

Результати досліджень свідчать про те, що вміст майже всіх карбонових кислот був вищий саме в листі. Так, вміст щавлевої кислоти у листі лепехи звичайної становив 1119,71 мкг/г проти 111,90 мкг/г у кореневищах. Вміст малінової та пальмітинової кислот у надземній частині рослини був на рівні 993,87 та 2225,93 мкг/г, що практично на 30% вище, ніж у підземній частині. Майже в три рази вміст ліноленової кислоти був вищий у листі лепехи (2760,23 мкг/г), ніж у кореневищах (920,35 мкг/г). Із домінувальних компонентів карбонових кислот лише лінолева кислота накопичувалася у кореневищах в більшій кількості, ніж у листі (2093,07 мкг/г та 1772,63 мкг/г відповідно). Вміст левулінової кислоти у досліджуваних зразках майже по 3000 мкг/г.

3.1.4 Ефірна олія

Наступним етапом наших досліджень було вивчення ефірної олії виділеної з листя та кореневищ лепехи звичайної.

Вміст ефірної олії дослідної серії в кореневищ досягав $2,23 \pm 0,03$ %, а в листі – $1,93 \pm 0,12$ % у перерахунку на суху сировину [188, 189].

Компонентний склад ефірної олії досліджували з використанням ГХ-МС,

розраховуючи кількісний вміст ідентифікованих сполук методом нормалізації (розд. 2.2.1, метод 1). Результати наведено в табл. 3.5.

Таблиця 3.5

**Порівняльна характеристика компонентів ефірної олії листя та кореневищ
лепехи звичайної**

Сполука	Вміст, мкг/г	
	Листя	Кореневища
1	2	3
Бензальдегід	1,95	—
α -Пінен	—	0,80
Камфен	—	4,97
Лимонен	18,21	1,25
β -Оцимен	27,63	19,51
α -Оцимен	4,88	—
Цитронелаль	4,59	—
Ліналоол	136,76	29,45
Камфора	34,11	58,68
Цитронелаль	4,59	—
Борнеол	16,30	—
α -Терпінол	31,58	10,29
1,7,7-Триметилбіцикло[2.2.1]гепт-2-іл-ацетат	33,75	—
α -Фенілацетат	—	2,72
Біциклоелемен	21,09	—
2,6-Диметилоктадієн	6,12	—
Геранілацетат	76,62	—
β -Елемен	19,00	54,63
Зингіберен	—	34,70
<i>ало</i> -Аромадендрен	1,05	15,13

Продовж. табл. 3.5

1	2	3
β-Каріофіллен	283,90	101,24
Шиобунон	—	564,66
<i>транс</i> -Ізоевгенол	11,82	—
<i>цис</i> -Ізоевгенол	76,15	—
β-Фарнезен	4,26	—
Гермакрен В	168,34	—
δ-Кадинен	136,66	—
Азарон	350,52	358,78
3,7,11-Триметилдодека-2,4,6,10-тетратрієналь	12,06	—
Ізокаламендіол	21,60	—
Аромадендрен	-	195,73
2,3,4,5,6-Гексагідро-1,1,5,5-тетраметил-2,4а-метанонафтален-7(4а)-он	19,04	—
6,10,14-Триметилпентадек-2-он	7,96	—
1,4- <i>цис</i> -1,7- <i>транс</i> -акоренон	—	17,31
Акоренон В	—	2,62
Леден	—	9,03
α-Гумулен	—	12,40
(4a α ,6R,8a α)-6-Ізопропеніл-4,8-диметил-4а,5,6,7,8,8а-гексагідро-2(1H)-нафталенон	—	50,89
2-Гідрокси-4,4-диметил-6-трет-бутилциклогекса-2,5-дієн-1-он	—	5,10
Аристон	—	65,69
Пентадеканова кислота	6,32	—
Етиленоліат	2,06	—
3,7,11-Триметилдодека-2,6,10-трієн-1-ол	4,91	—

Продовж. табл. 3.5

1	2	3
Пальметилолеїнова кислота	34,91	—
Пальмітинова кислота	47,20	53,26
Лінолева кислота	—	17,86
Олеїнова кислота	20,95	10,32
Фітол	4,54	—
Стеаринова кислота	4,56	5,27
Трикозан	2,82	4,12
Тетракозан	2,59	0,750
Пентакозан	0,89	1,55
Гексакозан	1,45	1,55
Гептакозан	9,10	1,84
Сквален	49,58	39,71
Нонакозан	7,84	4,11
Сумарний вміст ідентифікованих компонентів	1730,26	1755,92

Примітка. (—) – не ідентифіковано.

Як видно з отриманих результатів у кореневищах рослини виявлено та ідентифіковано 33 леткі сполуки, у листі – 42 сполуки. Проте, незважаючи на значну різницю в кількості виявлених та ідентифікованих сполук їх сумарний кількісний вміст знаходився практично на одному рівні – 1730,20 мкг/г (у листі) та 1755,92 мкг/г (у кореневищах). При цьому 18 сполук є в обох досліджуваних об'єктах лепехи звичайної.

У кореневищах виявлено: сесквітерпеноїди – 37,8 %, ароматичні речовини – 20,59 %, монотерпеноїди – 19,02 %, жирні кислоти – 4,62 %, насичені вуглеводні – 2,86 %. У найбільшій кількості містилися шиобунон – 564,66 мкг/г, азарон – 358,78 мкг/г, аромадендрен – 195,73 мкг/г і β -каріофілен – 101,24 мкг/г.

Серед ідентифікованих сполук у листі переважали сесквітерпеноїди – 38,8 %, ароматичні сполуки – 25,46 % та монотерпеноїди – 20,6 %. Серед жирних кислот

насичені становлять 3,35 %, ненасичені – 3,2 %, дитерпени (4,35 %), тритерпени (2,9 %), насичені вуглеводні (1,4 %).

Серед індивідуальних сполук відмічено високий вміст азарону (350,52 мкг/г), β -каріофілену (283,90 мкг/г), гемакрену В (168,34 мкг/г), δ -кадінену (136,66 мкг/г) та ліналоолу (136,76 мкг/г). Варто відзначити, що вміст азарону в надземній та підземній частинах рослини, визначений методом ГХ-МС, є практично однаковим.

3.1.5 Сполуки фенольної природи

На першому етапі дослідження сполук фенольної природи, проведено визначення загального вмісту поліфенольних речовин відповідно до методики ДФУ 2.0 у перерахунку на пірогалол та суху речовину [167].

Установлено, що у кореневищах лепехи звичайної поліфенольні сполуки накопичувалися у кількості $1,02 \pm 0,09$ %, а в листі – $1,241 \pm 0,001$ % ($n = 3$) [190]. На рис. 3.1 зображено типові спектри поглинання випробовуваних розчинів листя та кореневищ лепехи звичайної та розчину *пірогаголу* *P* після реакції з фосфорномолібденовольфрамовим реактивом.

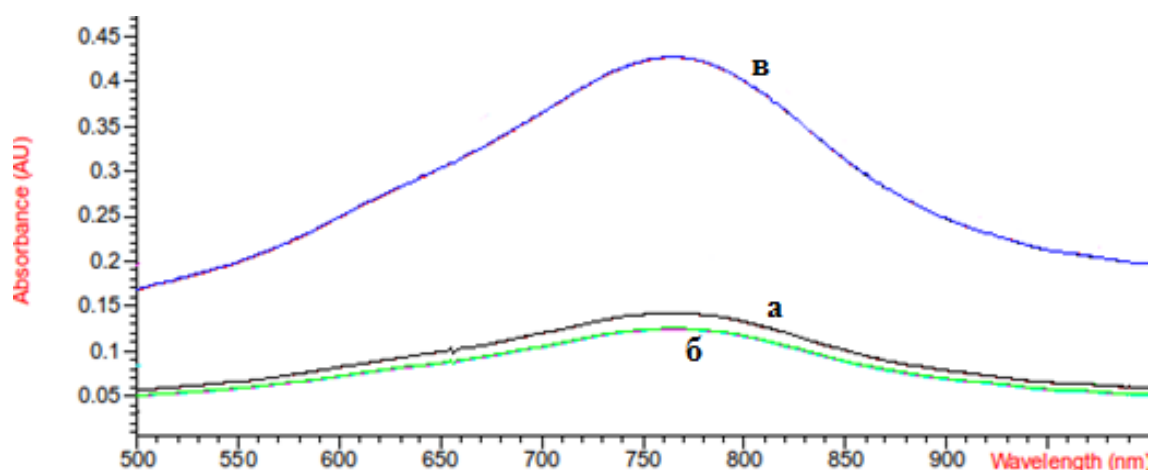


Рис 3.1 Типові спектри поглинання випробовуваних розчинів листя (а), кореневищ (б) лепехи звичайної та розчину пірогалолу (в)

Визначення оптимальної методики ідентифікації вирішено почати з методики ДФУ 2.0, описаної в монографії «Гінго листя» [170]. Як рухому фазу використовували суміш *мурашина к-та безводна P* – *кислота оцтова льодяна P* –

вода *P* – етилацетат *P* (7,5 : 7,5 : 17,5 : 67,5).

Ідентифікацію сполук фенольної природи проводили методом тонкошарової хроматографії, використовуючи уніфіковані методики ДФУ (рис.3.2) [168].

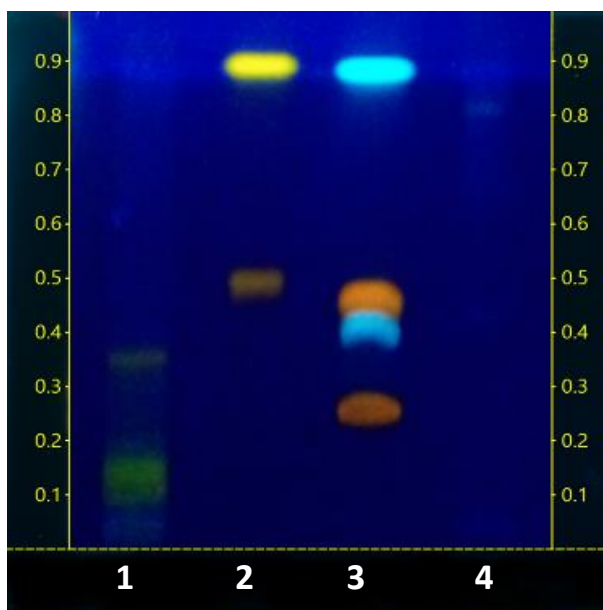


Рис 3.2 Хроматограма випробовуваного розчину з листя (1) та кореневищ (4) лепехи звичайної, ФСЗ ДФУ: лютеоліну та лютеоліну-7-глікозиду (2) та рутину, гіперозиду, кофейної та хлорогенової кислот (3)

Як видно з наведених результатів дослідження на хроматограмі випробовуваного розчину листя лепехи звичайної виявлено дві зони: із зеленою ($R_f \approx 0,21$) та з жовто-зеленою флуоресценцією ($R_f \approx 0,41$), що підтверджує те, що надземна частина рослини накопичує флавоноїди. Отримані результати свідчать про непридатність цієї рухомої фази для подальших досліджень через те, що інтенсивність забарвлення та ефективність розділення хроматографічних зон випробовуваного розчину була занадто низькою.

На хроматограмі випробовуваного розчину кореневищ лепехи звичайної аналітичних зон не виявлено, тому в подальшому методику ідентифікації фенольних сполук вирішено добирати з використанням лише випробовуваного розчину листя лепехи звичайної.

Наступний крок полягав у проведенні апробації методики ідентифікації фенольних речовин описана в ДФУ 2.1, монографії «Глоду листя» [168]. Як розчини порівняння використовували ФСЗ ДФУ: кофейної та хлорогенової кислот, гіперозиду, рутину, лютеоліну, лютеолін-7-глікозиду, флароніну, ізорамнетин-3,7-

дигалактозиду, кемпферол-3-рамноглюкозиду, 3-глюкорамнозид ізорамнетину, 3-глюко-7-рамно-ізорамнетину, 3-глюко-7-рамнозид кверцетину. Результати апробації методики наведені на рис 3.3.

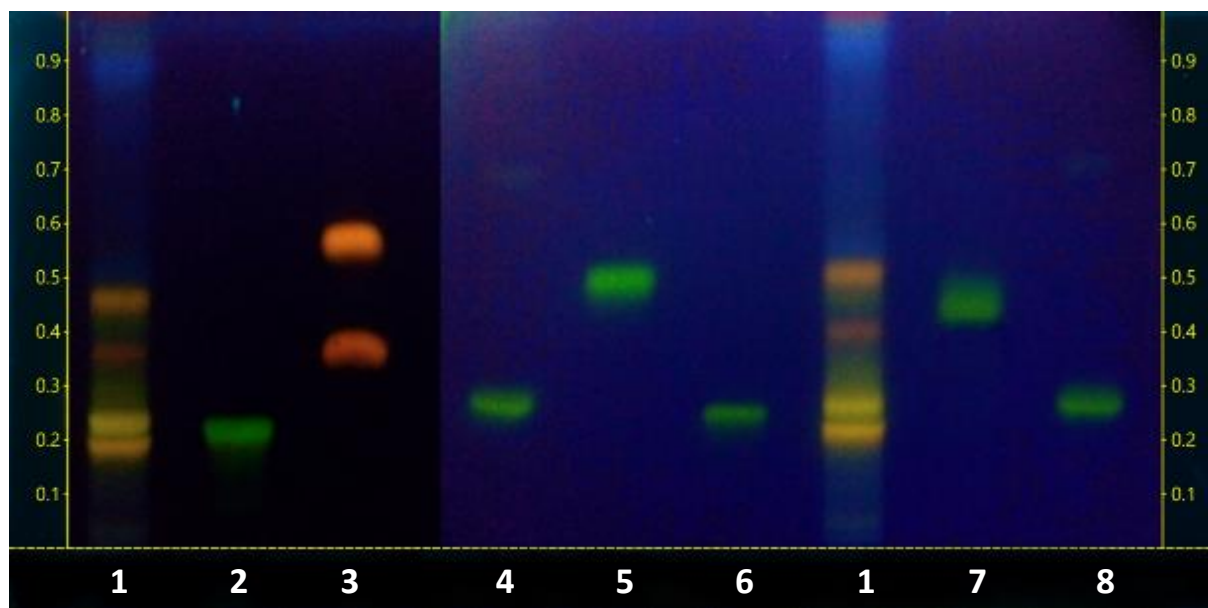


Рис 3.3 Хроматограма випробовуваного розчину листя лепехи звичайної (1), ФСЗ ДФУ: флароніну (2), суміші рутину та гіперозиду (3), ізорамнетин-3,7-дігалактозиду (4), кемпферол-3-рамноглюкозиду (5), 3-глюкорамнозид ізорамнетину (6), 3-глюко-7-рамно-ізорамнетину (7) та 3-глюко-7-рамнозид кверцетину (8)

У наведених хроматографічних умовах виявлено 8 зон, віднесених до сполук фенольної природи, з яких порівняно з хроматограмою ФСЗ ДФУ за характером забарвленням та показником R_f одна речовина була ідентифікована як рутин. Отримані результати підтверджують придатність цієї методики для ідентифікації флавоноїдів у листі кореневища лепехи звичайної [191].

Ідентифікацію сполук фенольної природи методом ТШХ проводили в умовах описаних у монографії ДФУ 2.0 «Фіалка триколірна (квітучі надземні частини)» [168]. Використовуючи систему розчинників *мурашина кислота безводна* P – *оцтова кислота* P – *вода* P – *етилацетат* P (11 : 11 : 27 : 100) та проявлення, як і у попередніх методах, у листі лепехи звичайної виявлено 10 хроматографічних зон, які віднесли до флавоноїдів і гідроксикоричних кислот.

У порівнянні зі стандартними зразками ідентифіковано рутин та кофейну

кислоту. На хроматограмі випробовуваного розчину кореневищ лепехи звичайної спостерігалися слабкі зони, що відповідали зонам рутину та кофейної кислоти на хроматограмах розчинів порівняння (рис. 3.4).

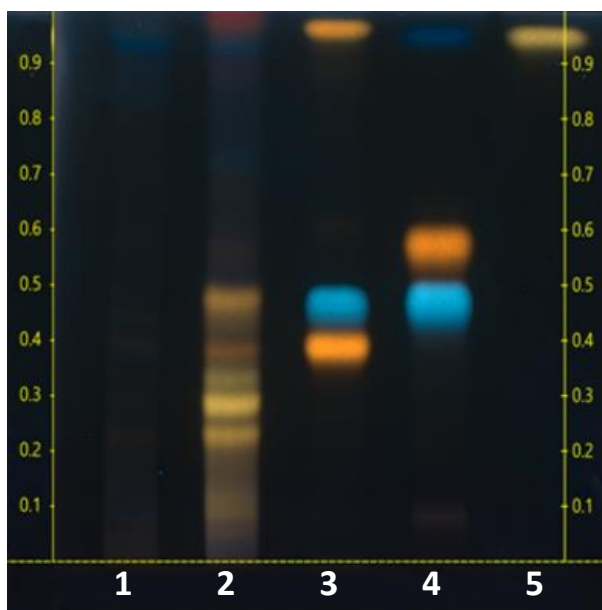


Рис 3.4 Хроматограма випробовуваного розчину листя (2) та кореневищ (1) лепехи звичайної, ФСЗ ДФУ: рутину, хлорогенової кислоти та кверцетину (3); хлорогенової кислоти, гіперозиду та кофейної кислоти (4); лютеоліну (5).

Визначення кількісного вмісту суми гідроксикоричних кислот, проводили методом спектрофотометрії за методикою ДФУ 2.0, монографія «Кропиви листя», отримано типовий спектр поглинання досліджуваного розчину листя лепехи звичайної [168] (рис. 3.5).

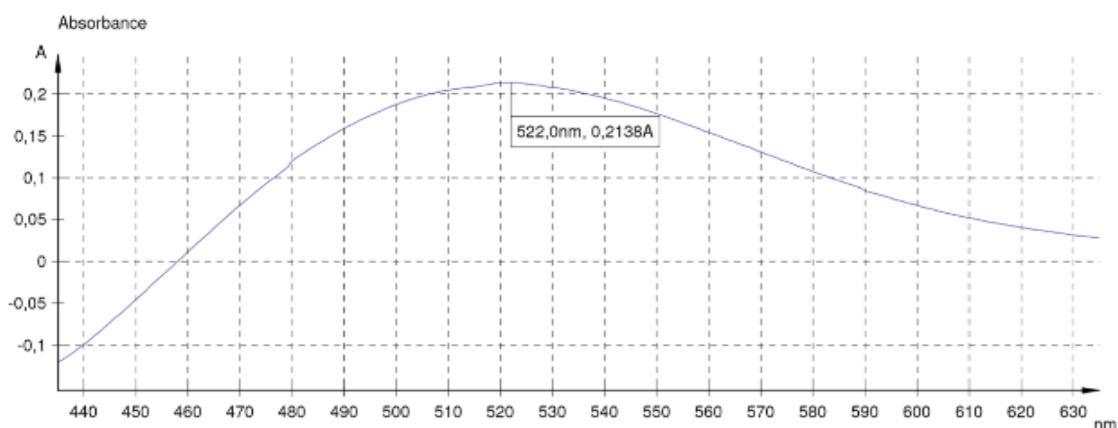


Рис. 3.5 Типовий спектр поглинання випробовуваного розчину листя лепехи звичайної

Виявлено, що гідроксикоричні кислоти накопичуються у листі лепехи звичайної на рівні $0,82 \pm 0,01$ % (у перерахунку на хлорогенову кислоту і

абсолютно суху сировину). У ході дослідження не спостерігався характерний максимум поглинання для випробовуваного розчину кореневищ лепехи звичайної, що свідчить про незначний вміст цієї групи БАР.

Для визначення кількісного вмісту суми флавоноїдів обрано дві уніфіковані фармакопейні методики, наведені у ДФУ, монографії «Глоду листя та квітки^N» та «Берези бруньки» [168].

На рис. 3.6 та 3.7 зображено типові спектри поглинання випробовуваного розчину листя лепехи звичайної після реакцій з алюмінію хлоридом та із сумішшю борна – щавлева кислоти в середовищі мурашина – оцтова кислоти.

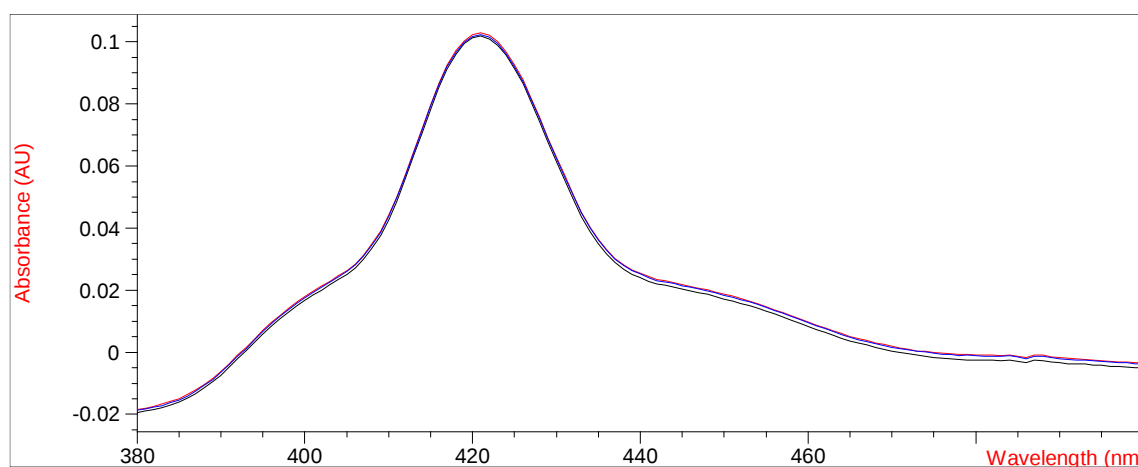


Рис. 3.6 Типовий спектр поглинання випробовуваного розчину листя лепехи звичайної після взаємодії з алюмінію хлоридом

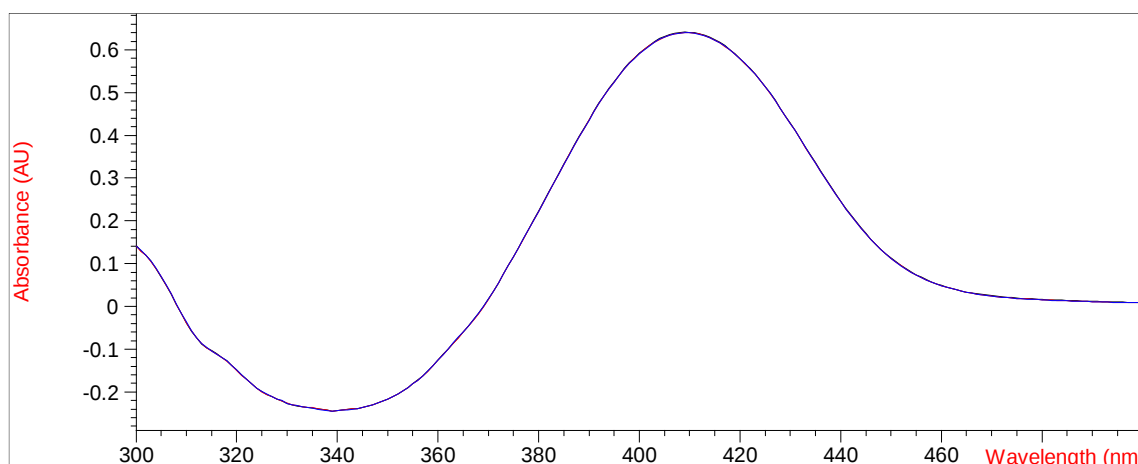


Рис. 3.7 Типовий спектр поглинання випробовуваного розчину листя лепехи звичайної після взаємодії із сумішшю борна – щавлева кислоти в середовищі мурашина – оцтова кислоти

У результаті експерименту визначено, що кількісний вміст суми флавоноїдів у листі, за спектрофотометричною методикою з попереднім гідролізом склав

$0,12 \pm 0,01$ % (у перерахунку на гіперозид і абсолютно суху сировину). Вміст суми флавоноїдів, визначений за методикою, заснованої на реакції із сумішшю борною та щавлевої кислот, був значно вищий і становив $(0,96 \pm 0,01$ % (у перерахунку на гіперозид і абсолютно суху сировину). Значна відмінність в результатах визначення кількісного вмісту пояснюється тим, що у листі лепехи звичайної накопичуються переважно флавони, які мають слабкі комплексоутворювальними властивості з алюмінію хлоридом [191, 192].

Враховуючи це, подальші дослідження кількісного вмісту суми флавоноїдів проведені за методикою монографії «Глоду листя та квітки^N» [168]. Кількісний

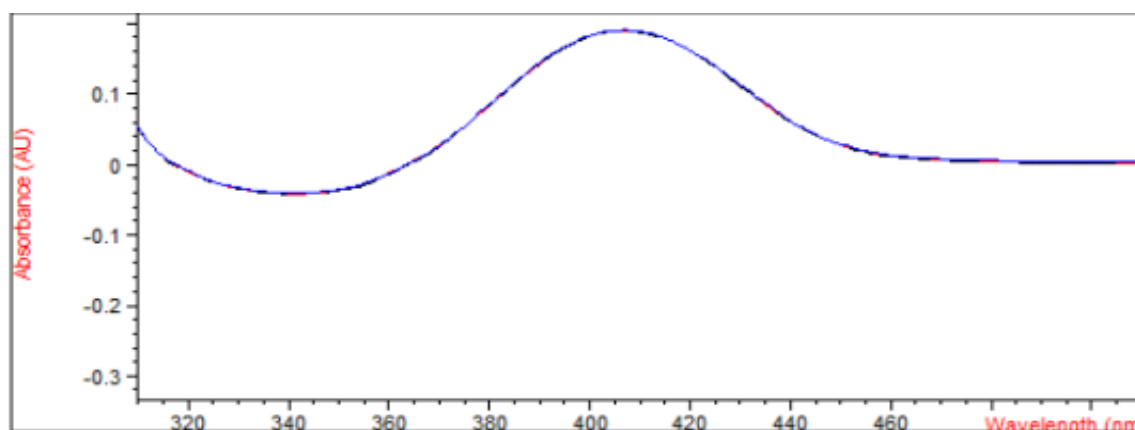


Рис. 3.8 Типовий спектр поглинання випробовуваного розчину кореневищ лепехи звичайної після взаємодії з сумішшю борна – щавлева кислоти в середовищі мурашина – оцтова кислоти вміст суми флавоноїдів у кореневищах знаходився на рівні $0,10$ % (рис. 3.8).

Визначення якісного складу та кількісного вмісту сполук фенольної природи проводили методом ВЕРХ. Шляхом порівняння часу утримання та спектральних характеристик піків на хроматограмах випробовуваних розчинів із хроматограмами розчинів порівняння ідентифіковано 13 сполук у листі та 7 сполук у кореневищах лепехи звичайної (табл. 3.6).

Таблиця 3.6

Порівняльна характеристика фенольних сполук листя та кореневищ (n = 3)

Сполука	Вміст мкг/г	
	Листя	Кореневища
1	2	3
Галова кислота	$28,52 \pm 0,61$	$29,31 \pm 0,65$

1	2	3
Неохлорогенова кислота	$4,01 \pm 0,08$	$4,12 \pm 0,11$
Хлорогенова кислота	$7,63 \pm 0,15$	$7,84 \pm 0,24$
Кофейна кислота	$4,25 \pm 0,12$	$4,37 \pm 0,22$
Ізоорієнтін	$298,53 \pm 1,26$	—
Робінін	$749,26 \pm 3,43$	—
Трифолін	$86,42 \pm 1,42$	—
Апігенін-7-глюкозид	$1,18 \pm 0,03$	—
Апігенін	$22,19 \pm 0,91$	—
Рутин	$216,36 \pm 8,10$	—
β -Азарон	$2155,53 \pm 71,57$	$2286,78 \pm 41,34$
Акацетин	$19,66 \pm 0,63$	$69,39 \pm 2,55$
α -Азарон	$240,52 \pm 2,34$	$18,56 \pm 0,29$
Сума ідентифікованих сполук	3834,06	2420,37

Примітка. (—) – не ідентифіковано.

Як видно з результатів порівняльного дослідження, листя лепехи звичайної має значно багатший якісний склад сполук фенольної природи. Якщо не враховувати ізомери азарону, які накопичуються приблизно в однаковій кількості в надземній ($2396,05$ мкг/г) та підземній ($2305,34$ мкг/г) частинах рослини, то вміст ідентифікованих речовин у листі рослини практично в 13 разів вище, що підтверджують результати, отримані при спектрофотометричному дослідженні. Із 13 ідентифікованих сполук у листі рослини 4 припало на органічні кислоти, з яких 3 на гідроксикоричні. Методом ВЕРХ підтверджено наявність кофейної кислоти, яку ідентифіковано методом ТШХ. Варто відзначити, що вміст кислот в листі та кореневищах знаходився практично на одному рівні. В підземній частині рослини ідентифіковано один флавоноїд – акацетин. При цьому його вміст у 3 рази вищий ніж у листі ($69,39 \pm 2,549$ проти $19,66 \pm 0,627$ мкг/г). У листі лепехи звичайної, крім акацетину, ідентифіковано ще 6 флавоноїдів, серед яких рутин, що

підтверджує дані ТШХ досліджень. Домінували ізоорієнтін ($298,53 \pm 1,259$ мкг/г), робінін ($749,26 \pm 3,43$ мкг/г), та рутин ($216,36 \pm 8,101$ мкг/г). Слід зазначити, що вміст α -азарону значно вищий у надземній частині рослини, ніж у кореневищах ($240,52 \pm 2,341$ проти $18,56 \pm 0,286$ мкг/г).

3.1.6 Дослідження антирадикальної активності листя та кореневищ

Дослідження антирадикальної активності проводили відповідно до методик, описаних у розділі 2.2.1. Результати наведено в табл. 3.7.

Таблиця 3.7

Порівняльна характеристика антирадикальної активності листя та кореневищ лепехи звичайної

№ серії	Значення ТЕАЄ*, мкг/г	
	Листя	Кореневища
F,R -1	$4468,70 \pm 28,14$	$10095,18 \pm 45,22$
F,R -3	$9041,35 \pm 41,88$	$10597,58 \pm 49,38$
F,R -5	$9446,05 \pm 37,23$	$9501,25 \pm 12,47$
F,R -7	$9738,49 \pm 22,96$	$11508,22 \pm 33,41$
F,R -8	$7822,20 \pm 30,54$	$11027,88 \pm 30,08$

Примітка. * – ТЕАЄ – Тролокс–еквівалент антирадикальної ємності (мкг) у зразках (г) сухої маси.

За результатами визначення антирадикальної активності в різних серіях листя та кореневищ лепехи звичайної виявлено, що, на відміну від надземної частини рослини, всі серії кореневищ за своєю антирадикальною активністю мали досить схожі результати. Так, значення ТЕАЄ у кореневищах знаходилося в межах від 9501 до 11508 мкг/г сухої сировини, у листі варіював від 4468 до 9738,49 мкг/г сухої сировини. Це може вказувати на більшу чутливість надземної частини до зовнішніх факторів, що впливають на накопичення БАР [193].

Із проаналізованих 5 серій сировини для подальшого дослідження

антиоксидатної активності методом ВЕРХ (розд. 2.2.1) обрано серію F-7 листя та R-7 кореневищ рослини. Отримані в результаті дослідження хроматограми наведено в додатку А (рис. А.1-2). У результаті визначено індивідуальні речовини фенольної природи, що мають антирадикальні властивості (табл. 3.8).

Таблиця 3.8

Дослідження якісного складу сполук фенольної природи, що виявляють антирадикальні властивості в листі та кореневищах лепехи звичайної

Листя			Кореневища		
Сполука	t _R , хв	ТЕАЄ*, мкг/г	Сполука	t _R , хв	ТЕАЄ*, мкг/г
Хлорогенова к-та	9,254	22,94	н/і	1,900	18,99
н/і	13,460	7,33	н/і	2,149	25,77
н/і	15,203	10,60	н/і	3,307	45,12
Ізоорієнтин	16,794	38,84	н/і	6,275	74,19
Робінін	18,020	73,46	н/і	13,446	19,58
н/і	19,418	78,57			
Рутин	21,996	103,17			
н/і	22,638	9,89			
н/і	23,526	40,26			
н/і	25,315	87,98			

Примітки:

- 1) t_R – час утримування;
- 2) ТЕАЄ * – Тролокс-еквівалент антирадикальної ємності (мкг) у зразках (г) сухої маси.;
- 3) н/і – не ідентифіковано.

За результатами дослідження, у листі лепехи звичайної виявлено 10 сполук, що виявляють антирадикальну активність, із них ідентифіковано хлорогенову кислоту, ізоорієнтин, робінін та рутин. Сумарне значення ТЕАЄ на рівні 473,03 мкг/г сухої сировини. Найбільший внесок до загальної антирадикальної активності зробив рутин (103,17 мкг/г) і неідентифіковані сполуки з часом утримання 25,315 хв (87,98 мкг/г) та 19,418 хв (78,57 мкг/г). Сумарне значення ТЕАЄ для кореневищ в 2,5 рази менше (183,64 мкг/г), ніж у листі. Виявлено 5 сполук, проте жодна з них не ідентифікована. Найбільше значення антирадикальної

активності у неідентифікованої сполуки з часом утримання 6,275 хв (74,19 мкг/г).

Значні відмінності між значеннями отриманими при визначенні антирадикальної активності УФ-СФ і ВЕРХ методами можна пояснити кількома причинами. По-перше, за спектрофотометричною методикою визначають загальну активність розчину, тоді як за ВЕРХ методикою можна визначити лише ті сполуки, що утримуються за певних умов на певній колонці (в нашому випадку сполук фенольної природи). По-друге, визначення хроматографічним методом активності окремих компонентів обмежене чутливістю приладу, який може виявити речовини в концентрації вище межі. Потрібно брати до уваги можливий синергізм між речовинами в суміші, що проявляє антиоксидантну активність, залежить не тільки від концентрації, а й від структури та взаємодії між ними.

3.1.7 Вітаміни

Дослідження вітамінного складу ЛРС має велике значення, адже більшість вітамінів не синтезуються в організмі людини, а надходять до організму з їжею, при цьому мають велике значення для підтримки життєздатності та здоров'я [194]. Результати порівняльного дослідження вітамінного складу наведено в табл. 3.9.

Таблиця 3.9

Порівняльна характеристика вітамінного складу листя та кореневищ лепехи звичайної

Вітамін	Вміст у сировині, (мг/%)	
	Листя	Кореневища
1	2	3
Вітамін В ₁	3,98	0,74
Вітамін В ₂	1,18	0,31
Вітамін РР	1,21	0,42
Вітамін Е	1,98	0,90
Каротиноїди*	2,07	1,10

Примітка. * – вміст каротиноїдів наведено в мкг/%.

Установлено, що в листі лепехи звичайної найбільше накопичується вітаміну

B_1 – 3,98 мг/%, а в кореневищах – лише 0,74 мг/%, що практично в 5 разів менше. Вміст вітамінів B_2 і РР у листі був практично на одному рівні (1,18 і 1,21 мг/% відповідно), і перевищував значення в кореневищах (0,31 та 0,42 мкг/% відповідно). Сума токоферолів склала 1,98 мг/%, каротиноїдів – 2,07 мкг/% для надземної частини та 0,90 та 1,10 мкг/% для підземної [194, 195].

3.1.8 Стероїди

За літературними даними лепеха звичайна здатна накопичувати β -ситостерин, який має різні види фармакологічної дії [38, 196].

Ідентифікацію цієї сполуки в сировині проводили за фармакопейною методикою, описаною в розділі 2.2.1 [168]. Для хроматографування як рухому фазу використовували суміш *оцтова кислота льодяна Р – етилацетат Р – толуол Р* (1 : 30 : 70). Переглядали при денному світлі після обробки хроматограми *розчином анісового альдегіду Р*. Результати ідентифікації β -ситостерину в листі та кореневищах лепехи звичайної наведено на рис. 3.9.

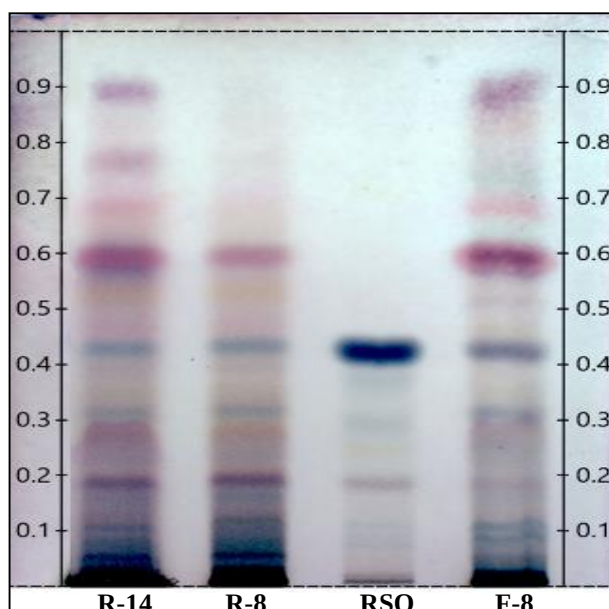


Рис. 3.9 Хроматограма ідентифікації β -ситостерину в сировині лепехи звичайної, де: R-8, 14 – випробовувані розчини з кореневищ лепехи; F-8 – випробовуваний розчин з листя лепехи; RSO – розчин ФСЗ ДФУ β -ситостерину.

Після проявлення хроматографічної пластинки виявлено, що всі

досліджувані розчини сировини лепехи звичайної містять характерні хроматографічні зони синього кольору з $R_f \approx 0,42$, що відповідає хроматографічній зоні β -ситостерину на хроматограмі розчину порівняння.

3.2 Елементний склад листя та кореневищ лепехи звичайної

Елементний склад рослин значною мірою залежить від багатьох факторів, наприклад, від біологічних особливостей виду, типу ґрунту, кліматичних умов та антропогенних чинників.

Враховуючи екологічну ситуацію на території України, а саме аварію на Чорнобильській АЕС, дослідження кількісного вмісту важких металів та інших потенційно небезпечних елементів у складі ЛРС є актуальним питанням.

Якісний склад та кількісний елементний вміст визначали методом АЕС (розд. 2). Установлено накопичення макро- та мікроелементів, а вміст важких металів у зразках листя та кореневищ лепехи звичайної. Отримані результати наведено у табл. 3.10 [197, 198].

Таблиця 3.10

Порівняльна характеристика елементного складу зразків листя і кореневищ лепехи звичайної

Елемент	Вміст елементів, мг / 100 г									
	F-1	R-1	F-8	R-8	F-5	R-5	F-3	R-3	F-7	R-7
Макроелементи										
Na	21	13	112	75	187	110	370	110	235	140
Mg	47	22	199	95	242	110	128	67	490	210
Si	12	9	195	150	36,4	28	218	56	655	280
P	459	270	332	195	380	190	105	95	130	87
K	743	450	2195	1330	3622	1960	2320	1680	2050	1050
Ca	297	135	506	230	905	335	720	280	655	260

Продовж. табл. 3.10

Елемент	Вміст елементів, мг / 100 г									
	F-1	R-1	F-8	R-8	F-5	R-5	F-3	R-3	F-7	R-7
Мікроелементи										
Al	0,72	0,45	30,40	19,00	11,76	5,60	20,05	14,10	55,00	70,00
Mn	2,32	2,00	5,45	4,70	3,08	2,80	4,60	4,20	20,50	17,50
Fe	0,28	0,20	63,00	45,00	22,95	17,00	25,43	22,07	33,00	35,00
Ni	<0,03	<0,03	<0,03	0,04	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
Cu	0,47	0,10	0,97	0,90	0,72	0,40	2,10	1,90	0,41	0,35
Zn	2,43	0,45	1,10	0,90	1,69	1,70	4,10	2,80	2,40	1,70
Pb	<0,03	<0,03	0,26	0,36	0,12	0,44	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
Mo	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03

Примітка. Co < 0,03 мг/100 г; Cd < 0,01 мг/100 г; As < 0,01 мг/100 г; Hg < 0,01 мг / 100 г.

При дослідженні листя та кореневищ лепехи звичайної ідентифіковано 18 елементів, з яких 6 макро- та 8 мікроелементів. У ході дослідження виявлено певні закономірності накопичення елементного складу в сировині лепехи звичайної. З отриманих результатів можна зробити висновок, що сумарний вміст елементів у півтора-два рази вищий у листках лепехи звичайної. Так, сумарна кількість макро- та мікроелементів у листі коливалася в межах від 1585 до 5413 мг / 100 г, тоді як у кореневищах цей показник склав від 902 до 2760 мг / 100 г. Відсоткове співвідношення та порядок накопичення елементів у листі та кореневищах схожі.

Серед макроелементів у значній кількості накопичувався калій. Його вміст у досліджуваних зразках коливався від 743 до 3622 мг / 100 г (у листі) і від 450 до 1960 мг / 100 г (у кореневищах). На частку калію в усіх досліджуваних зразках припадало 49 – 72 % від загального вмісту елементів. З макроелементів у значній кількості в серіях F, R – 1, 2, 3 виявлено кальцій та фосфор. У серіях F, R – 13

кальцій наявний в відносно великій кількості, проте фосфору накопичувалося дещо менше, ніж силіцію. В листі та кореневищах серії F, R–13 кремнію виявлено в найбільшій кількості. Значно менший вміст визначений у листі та кореневищах серії F, R – 1, де вміст більшості елементів був в рази нижчим. Так, наприклад, вміст феруму в листі був практично у 100 разів нижче від середнього значення вмісту в надземній частині, а кореневищах в 120 разів від середнього показника для підземної частини, тоді як вміст фосфору був найбільший серед усіх досліджуваних зразків: у листі – 459 мг / 100 г, у кореневищах – 270 мг / 100 г.

Відповідно до регламентації статті «Лікарська рослинна сировина» ДФУ 2.0, якщо немає інших зазначень або обґрунтувань та дозволів, то встановлені такі вимоги до граничної концентрації важких металів: кадмій – не більше 1,0 ppm (0,1 мг/100г); свинець – не більше 5,0 ppm (0,5 мг/100г); ртуть – не більше 0,1 ppm (0,01 мг/100г). Згідно з отриманими даними всі зразки листя та кореневищ лепехи звичайної відповідали вимогам ДФУ.

Висновки до розділу 3

1. Уперше проведено порівняльний аналіз хімічного складу вітчизняних зразків листя та кореневищ лепехи звичайної.

2. Визначено, що якісний склад полісахаридних фракцій українських зразків сировини лепехи звичайної практично однаковий: у фракції ВПРС ідентифіковано галактозу, глюкозу і фруктозу. Пектинові речовини представлені галактозою, глюкозою, ксилозою і рамнозою. При дослідженні фракцій геміцелюлози А і Б виявлено лише глюкозу. Вміст водорозчинних полісахаридів в листі складає 2,96 %, у кореневищах – 3,41 %. Вміст усіх фракцій полісахаридів був більший у кореневищах, ніж листі.

3. Уперше проведено порівняльний аналіз амінокислотного складу листя та кореневищ лепехи звичайної, заготовлених на території України. Ідентифіковано по 17 амінокислот, серед яких 7 сполук незамінні і 10 замінні амінокислоти. При ідентичному якісному складі кількісний вміст амінокислот був майже вдвічі вищий

у надземній частині рослини (10,29 %), ніж у кореневищах (5,67 %).

4. Уперше проведено порівняльний аналіз якісного складу та кількісного вмісту летких речовин вітчизняних зразків листя та кореневищ лепехи звичайної. Якісний склад карбонових кислот був схожий, із 29 ідентифікованих сполук у кореневищах та 30 сполук у листі 25 речовин є спільними. Кількісний вміст летких речовин значно вищий у надземній частині рослини (15757,88 мкг/г), ніж (10501,47 мкг/г) у кореневищах. Дослідження якісного складу ефірної олії показало, що багатшими у цьому плані є листя лепехи, в яких виявлено та ідентифіковано 42 сполуки, тоді як у підземній частині рослини – 33. При цьому кількісний вміст усіх ідентифікованих сполук знаходився практично на одному рівні.

5. Уперше проведено дослідження фенольних сполук листя та кореневищ лепехи звичайної. Методами ТШХ та ВЕРХ у листі ідентифіковано 13 сполук, у кореневищах – 7. Уперше в листі ідентифіковано неохлорогенову та кофейну кислоти, ізоорієнтин, робінін, трифолін, апігенін-7-глюкозид, апігенін, акацетин; в кореневищах – неохлорогенову та кофейна кислоти, акацетин. Спектрофотометричним методом у листі визначено кількісний вміст суми флавоноїдів у перерахунку на гіперозид ($0,96 \pm 0,01\%$) та кількісний вміст гідроксикоричних кислот у перерахунку на хлорогенову кислоту ($0,82 \pm 0,01\%$). Домінуючим компонентом серед сполук фенольної природи був β -азарон, вміст якого у листі та кореневищах був практично однаковий – $2155,53 \pm 71,57$ та $2286,78 \pm 41,34$ мкг/г відповідно.

6. Визначено антирадикальну активність у 5 серіях сировини лепехи звичайної, яка для листя була в межах від 9501 до 11508 мкг/г, для кореневищ – від 4468 до 9738,49 мкг/г. Ідентифіковано 4 із 10 сполук фенольної природи, що виявляли антирадикальну активність у листі рослини, а саме хлорогенову кислоту, ізоорієнтин, рутин та робінін. У кореневищах виявлено 5 сполук.

7. Проведено дослідження вітамінного складу листя та кореневищ лепехи. Установлено, що вміст вітамінів групи В, РР, каротиноїдів і токоферолів вищий у надземній частині рослини.

8. Уперше ідентифіковано β -ситостерин у вітчизняних зразках лепехи звичайної.

9. Встановлено, що сумарний вміст неорганічних речовин практично вдвічі вищий у надземній частині (від 1585 до 5413 мг / 100 г), ніж у підземній (від 902 до 2760 мг / 100 г). Дослідження елементного складу зразків листя і кореневищ показали, що домінуючим елементом є калій (49 – 72 % від загальної кількості елементів). Окрім цього, значною мірою накопичуються кальцій, фосфор та силіцій. Вміст важких металів знаходився в межах норми.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Руденко В. П. Дослідження кількісного вмісту водорозчинних полісахаридів листя лепехи звичайної. *Сучасні проблеми фармакології, косметології та ароматології* : матеріали наук.-практ. конф., м. Одеса, 4 жовт. 2019 р. Одеса, 2019 р. С. 74–80.

2. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Гапоненко В. П. Дослідження кількісного вмісту полісахаридних фракцій листя лепехи звичайної. *Актуальні питання клінічної фармакології та клінічної фармації* : матеріали наук.-практ. internet-конф., м. Харків, 22-23 жовт. 2019 р. / редкол. : А. А. Котвіцька та ін. Х. : НФаУ, 2019. С. 341–347.

3. Яременко М. С. Изучение аминокислотного состава корневищ аира болотного / *Внедрение достижений медицинской науки в клиническую практику* : сб. материалов X науч.-практ. конф. молодых ученых и студентов ТГМУ им. Абуали ибни Сино с международным участием. Душанбе, 2015. С. 371.

4. Яременко М. С., Гонтова Т. М. Порівняльний аналіз амінокислотного складу листя та кореневищ лепехи звичайної. *Промислова фармація: Етапи становлення та майбутнє* : зб. наук. пр. Харків : Вид-во НФаУ, 2017. С. 137–140.

5. Гонтова Т. М., Яременко М. С. Хромато-мас-спектрометричне вивчення летких сполук кореневищ лепехи звичайної. *Збірник наук. праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупика*. Київ, 2015, № 24, кн. 5. С. 77–82.

6. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Сіра Л. М. До питань використання та ідентифікації неофіцінальної сировини – листя *Acorus Calamus* L. *Медична та клінічна хімія*. 2018. № 0 (1). С. 105–110.

7. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Котова Е. Е. Кількісне визначення суми поліфенолів у кореневищах та листі лепехи звичайної. *Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин* : матеріали III Міжнар. наук.–практ. internet–конф., м. Харків, 26–28 листоп. 2018 р. Харків, 2018. С. 276–277.

8. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Котова Е. Е. Використання фармакопейних методик при вивченні флавоноїдів в сировині лепехи звичайної. *Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій* : тези доп. Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяч. 80-річчю з дня народж. д-ра. фармац. наук, проф. О.М. Гайдукевича (12-13 квіт. 2018 р.). Харків : НФаУ, 2018. С. 313–314.

9. Yaremenko, M. S. Perspective for using *Acorus Calamus* leaves in medicine / M. S. Yaremenko, T. M. Gontova, E. E. Kotova. *Sciences and Pharmacy Practice 2018* : book of abstracts 9th International Conference dedicated to the 100-th anniversary of independent Lithuania's pharmacy, Kaunas, November 9, 2018. P. 60.

10. Визначення антирадикальної активності кореневищ лепехи звичайної / М. С. Яременко, Т. М. Гонтова, І. В. Безрук, В. О. Грудько. *PLANTA+. Досягнення та перспективи* : матеріали Міжнар. наук.-практ. конф., присвяч. пам'яті д. хімічних наук, проф. Ніни Павлівни Максютіної до 95-річчя від дня народження, м. Київ, 20–21 лют. 2020 р. Київ : ПАЛИВОДА А. В., 2020. С. 144–146.

11. Yaremenko M. S., Gontova T. M. Research of vitamin composition in leaves *Acorus Calamus*. *Topical issues of new drugs development* : Abstracts of XXIII International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student (April 21, 2016). In 2 vol. Vol.1. Kharkiv : Publishing Office NUPh, 2016. 433 P.

12. Яременко М. С., Гонтовая Т. Н. Витаминный состав отечественного сырья корневищ аира обыкновенного. *Наука и медицина: современный взгляд молодежи* : сб. материалов IV междунар. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых Алматы, 20-21 апр. 2017 г. Алмата, 2017. С. 300–301.

РОЗДІЛ 4. СТАНДАРТИЗАЦІЯ СИРОВИНИ ЛЕПЕХИ ЗВИЧАЙНОЇ

Проведений аналіз аналітично-нормативної документації дозволив встановити (розд. 1.4), що загальний підхід до контролю якості кореневищ лепехи звичайної схожий. Це дає можливість взяти за основу монографію ДФ XI видання та доопрацювати її за сучасними вимогами Європейської фармакопеї до якості сировини та рекомендацій Управління продовольства і медикаментів (Food and Drug Administration) США та Європейського агентства з лікарських засобів (EMA) щодо аналізу ЛРС [44, 161]. Відповідно до порядку розробки монографій до ДФУ проведено вивчення серій сировини лепехи – кореневищ, заготовлених у різних регіонах України [199, 200].

4.1 Макро- та мікроскопічний аналіз листя та кореневища

Шляхом макроскопічного аналізу листя лепехи звичайної, заготовлених на території України, встановлено, що значні відмінності вітчизняних зразків надземної частини у порівнянні із закордонними відсутні. Свіже листя яскраво-зеленого кольору, м'ясисте, з характерним духмяним запахом і гірким присмаком. Розташоване зближено, двома рядами на горизонтальному кореневищі, орієнтоване вертикально. За формою листки лінійно-мечоподібні, близько 3 см завширшки, 60-120 см завдовжки, поверхня гола, шкіряста, краї цілі, злегка гофровані. Відмітна ознака листової пластинки полягає в тому, що вона сплюснена не у спинно-черевній площині, а з боків, має жолобок і гостре ребро – киль. Це виглядає так, нібито пластинка була складена навпіл, а потім випрямлена. Біля основи пластинка світліша, у місці прикріплення розширена, утворює листову піхву рожевого кольору. Піхви охоплюють все або майже все коло кореневища і залишаються на ньому у вигляді півчастих лусочок [189].

Через те, що листя лепехи звичайної сплюснене з боків, вся поверхня листової пластинки є лише морфологічно нижньою, а структура листової пластинки амфістоматичною уніфаціальною (радіальною), тобто однобічною.

Структура півчастих піхв біацифальна (двобічна), тобто хлоренхіма розташовується на абаксіальному боці і відсутня на адаксіальному. В піхвах добре розвинена склеренхіма. Наростає листкова пластинка завдяки поділу інтеркалярної меристеми основи пластинки. Площа збільшується через відсутність маргінального (крайового) зростання, як це відбувається у сплюснених листках завдяки антиклінальному поділу крайової меристеми [189].

Висушене листя (рис. 4.1) зморшкувате, гофроване по краю, поверхня бурувато-зелена, буро-коричнева, жовто-зелена, внутрішня частина біло-рожева, горбкувата.



Рис. 4.1 Свіже соковите (1) та висушене (2) листя лепехи зовні та у поперечному розрізі (1а, 2а).

Мезофіл пластинки неоднорідний (рис. 4.2). Субепідермальна хлоренхіма щільніша, складає 4-6 шарів, рівномірно розвинених по всьому колу пластинки. Клітині округлі, містять хлорофілові й крохмальні зерна, поділяються і ростуть зі швидкістю, близькою до зростання епідерми, тому трохи відриваються одна від одної. Під хлоренхімою багато шарів клітин аеренхіми, які у поперечному розрізі округлі, а у повздовжньому – видовжені (рис. 4.2). Вони припиняють поділ і зростання раніше хлоренхіми, відділяються, утворюючи великі міжклітинники. Серед клітин аеренхіми рівномірно розподілені більші за розміром, округлі клітини-ідіобласти з блискучою, кремуватою ефірною олією. Раніше встановлено, а нами підтверджено, що кількість ідіобластів і вміст ефірної олії взаємопов'язані і залежать від фази розвитку та дії чинників навколишнього середовища. У листі найбільша кількість ідіобластів та ефірної олії виявляється у фазі цвітіння, активної

асиміляції і цитохімічних перетворень [189].

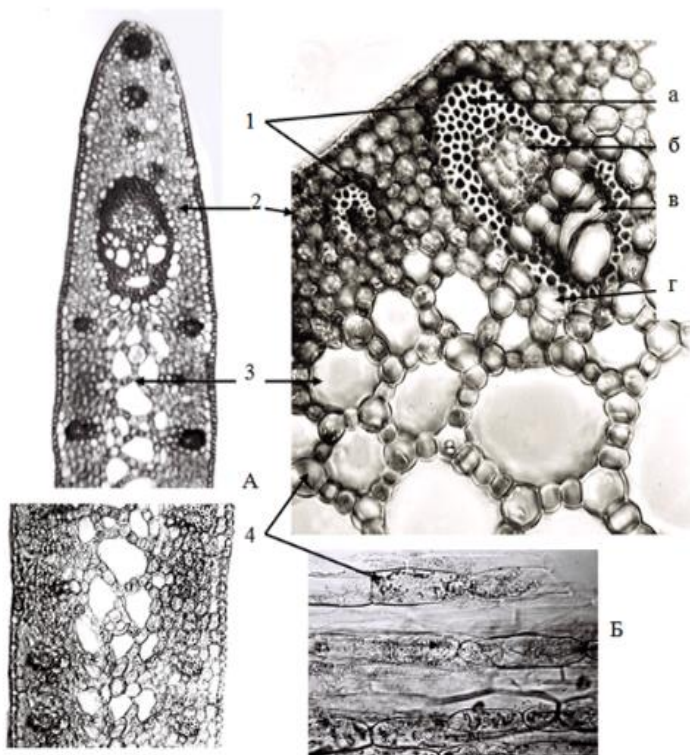


Рис. 4.2 Поперечні (А) і поздовжні (Б) зрізи листкової пластинки:

- 1 – маленькі і великі закриті колатеральні провідні пучки: а – склеренхіма, б – флоема, в – ксилема, г – паренхімна обкладка; 2 – хлоренхіма; 3 – аеренхіма; 4 – ідіобласти з ефірною олією

Провідна система листків представлена жилками, які йдуть уздовж листкової пластинки, зближуються біля верхівки, на якій досить часто знаходиться гідатода. Провідні пучки відрізняються розмірами, за складом можуть бути повними, неповними і простими. Пучки зазвичай не примикають до клітин мезофілу, але оточені обкладкою з паренхіми, яка забезпечує контакт між основними тканинами та провідними елементами ксилеми і флоєми. Великі колатеральні пучки чергуються з дрібними пучечками, що проходять під палісадною паренхімою, у верхньому шарі аеренхіми (рис. 4.2). У великих пучках є судини, а у флоємі – ситоподібні трубки. У дрібних пучках судини змінюються трахеїдами, а ситоподібні трубки флоєми – паренхімними клітинами. Прості пучки є закінченнями жилок листка і найчастіше складаються з однієї-двох трахеїд [189].

На зрізах пластинки в ділянці кіля серед провідних пучків хлоренхіми виділяється більший за розмірами колатеральний судинно-волокнистий пучок

прокамбіального походження і 3-4 (іноді 6-8) дрібних пучечків. Ксилема орієнтована до абаксiальної поверхні, обкладка пучків паренхімна. Базисні клітини епідерми листової пластини (рис. 4.3) видовжені внаслідок того, що рано припиняють поділ, але поступово розтягуються. Бічні оболонки клітин тонкі, зовнішні – вкриті тонким шаром кутикули. Деякі клітини містять дрібні друзи.

Продихи (рис. 4.3) парацитні або тетрацитні, знаходяться на одному рівні з епідермальними клітинами, розміщуються рядами вздовж осі листка між жилками, які супроводжуються кристалами кальцію оксалату.

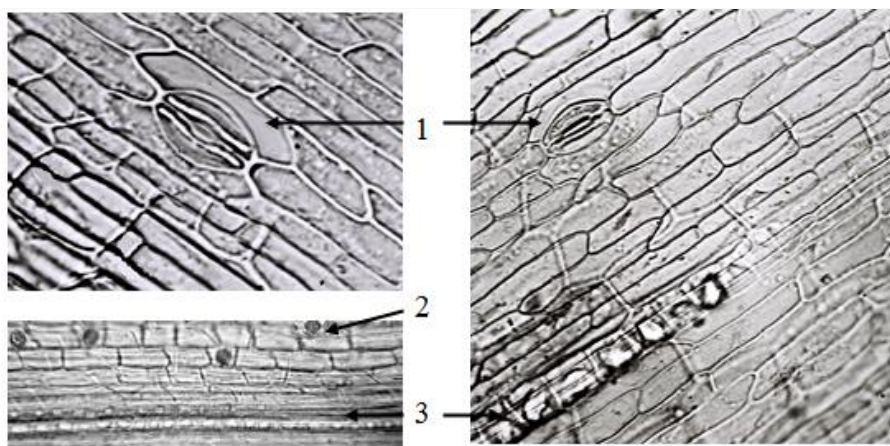


Рис. 4.3. Мікропрепарати листової пластинки лепехи звичайної з поверхні:

1 – продихи; 2 – друзи; 3 – кристали кальцію оксалату вздовж жилок

Свіжі кореневища (рис. 4.4) світло-зеленого кольору з бурими (в місцях кріплення кореня) та рожевими (в місцях кріплення листя) ділянками, на зламі – рожевуваті.



Рис. 4.4 Кореневище лепехи звичайної під час заготівлі

При сушінні кореневища буріють, а на зламі стають білувато-рожевими або жовтуватими. Злам утворюється нерівний, їх виразною зернистістю, можуть

проглядатися дрібні пори. Кореневища циліндричної та змієподібної форми, трохи сплюснуті горизонтально. На верхньому боці помітні півмісяцеві рубці від листя; на нижньому – численні кратероподібні виїмки залишків коренів (рис. 4.5).



Рис. 4.5 Кореневище лепехи звичайної після сушіння

На поперечних зрізах кореневищ розпізнається епідерма (рис. 4.6) з потовщеними, частково коркоподібними зовнішніми оболонками.

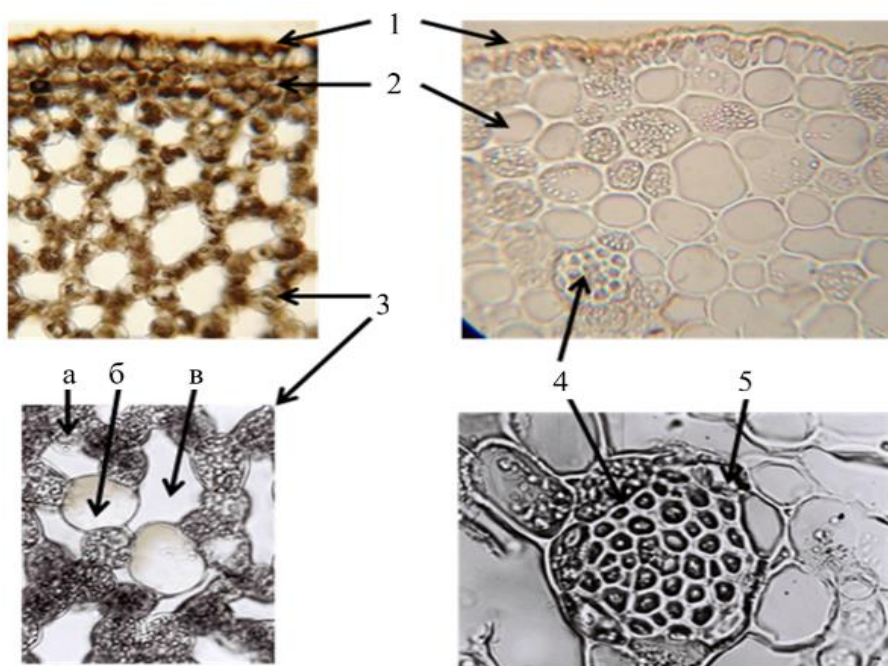


Рис 4.6 Фрагменти поперечних зрізів кореневищ: 1 – епідерма; 2 – субепідермальна запасуюча паренхіма; 3 – аеренхіма: а – клітини з крохмальними зернами, б – ідіобласти з ефірною олією, в – міжклітинники; 4 – тяжі склеренхіми з кристалічною обкладкою; 5 – кристали кальцію оксалату

Під епідермою – декілька шарів округлих клітин з рівномірно потовщеними оболонками і дрібними міжклітинниками. Решта основної тканини – запасуюча

аеренхіма з великими повітроносними порожнинами. Клітини з крохмальними зернами округлі або овальні. Більші за розмірами кулясті клітини-ідіобласти містять золотаво-оранжеву ефірну олію.

Поперечні зрізи кореневища представлено на рис. 4.7. Кору від центрального циліндра відділяє ендодерма (рис. 4.7, 6). У корі ближче до периферії є маленькі пучки однорідної склеренхіми (рис. 4.6, 4) з кристалічною обкладкою (рис. 4.6, 5), або з флоемою усередині (рис. 4.7, 7). Ближче до осевого циліндра провідні пучки неповні чи колатеральні (рис. 4.7, 8) зі склеренхімною обкладкою.

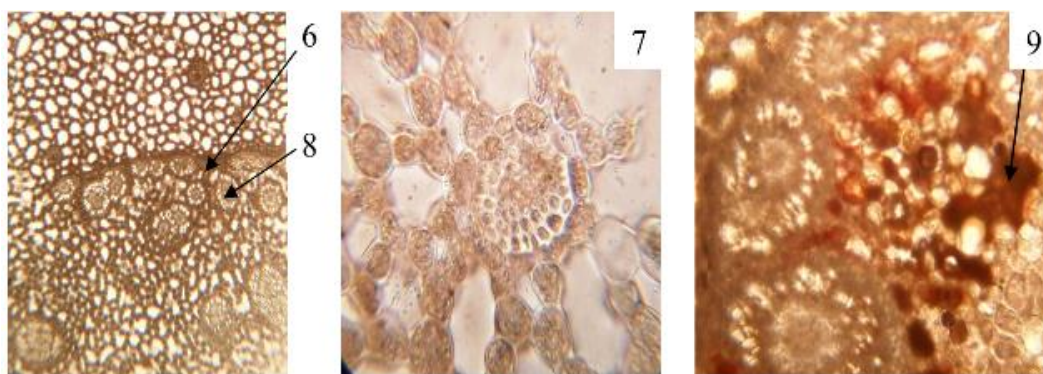


Рис 4.7 Фрагменти поперечних зрізів кореневищ: 6 – ендодерма; 7 – флоемні пучки зі склеренхімною обкладкою; 8 – колатеральні пучки зі склеренхімною обкладкою; 9 – клітини з флобафенами

За рекомендаціями ДФУ проведено мікроскопічне дослідження порошку кореневищ лепехи звичайної (4.8-10). Для чого сировину подрібнено та просіяно крізь сито 355 (2.9.12). Подальше дослідження проводили відповідно до ст. 2.8.23

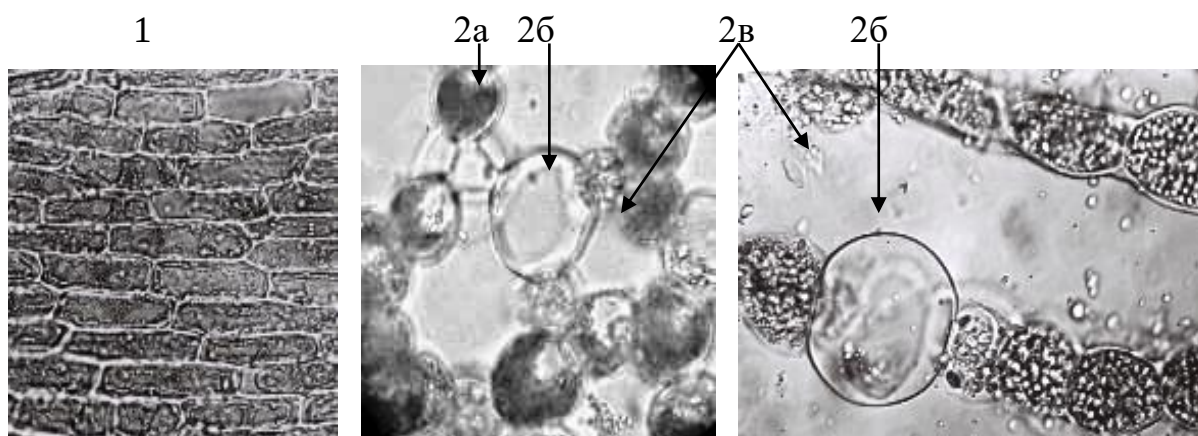


Рис 4.8. Фрагменти мікроскопії порошку кореневищ лепехи: 1 – епідерма з поверхні; 2 – аеренхіма: а – клітини з крохмальними зернами, б – ідіобласти з ефірною олією, в – міжклітинники.

«Мікроскопічне дослідження лікарської рослинної сировини» ДФУ 2.0. У порошку розпізнаються фрагменти епідерми з поверхні (рис. 4.8, 1), аеренхіми (рис. 4.8, 2), що включає клітини з крохмальними зернами (рис. 4.8, 2.а), більші за розміром ефірноолійні клітини-ідіобласти (рис. 4.8, 2.б) і мережу повітроносних порожнин (рис. 4.8, 2.в).

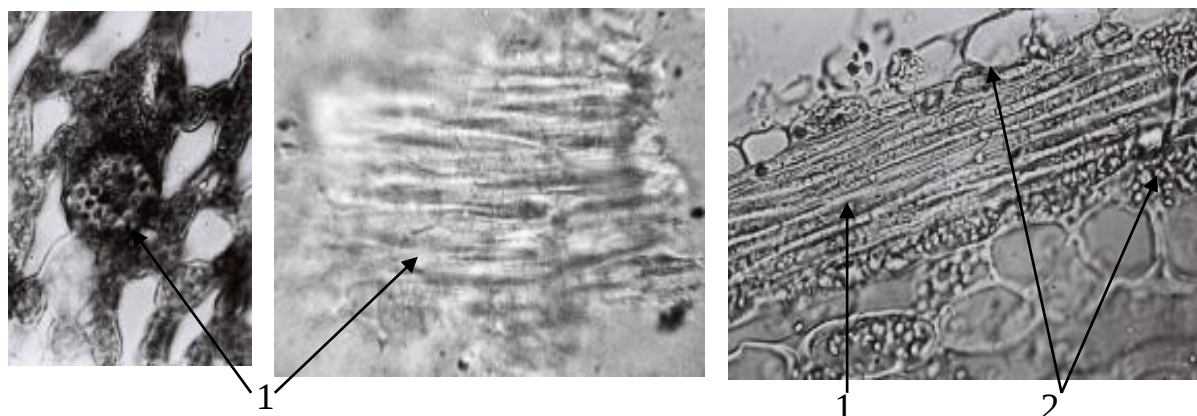


Рис 4.9. Фрагменти мікроскопії порошку кореневищ лепехи: 1 – тяжі склеренхіми; 2 – кристали кальцію оксалату в обкладинкових клітинах.

Зустрічаються шматочки поперечних і поздовжніх перерізів кореневища, фрагменти склеренхімних волокон із кристалами кальцію оксалату в обкладкових клітинах, спіральних і драбинчастих судин, темні клітини з флобафенами і велика кількість крохмальних зерен.

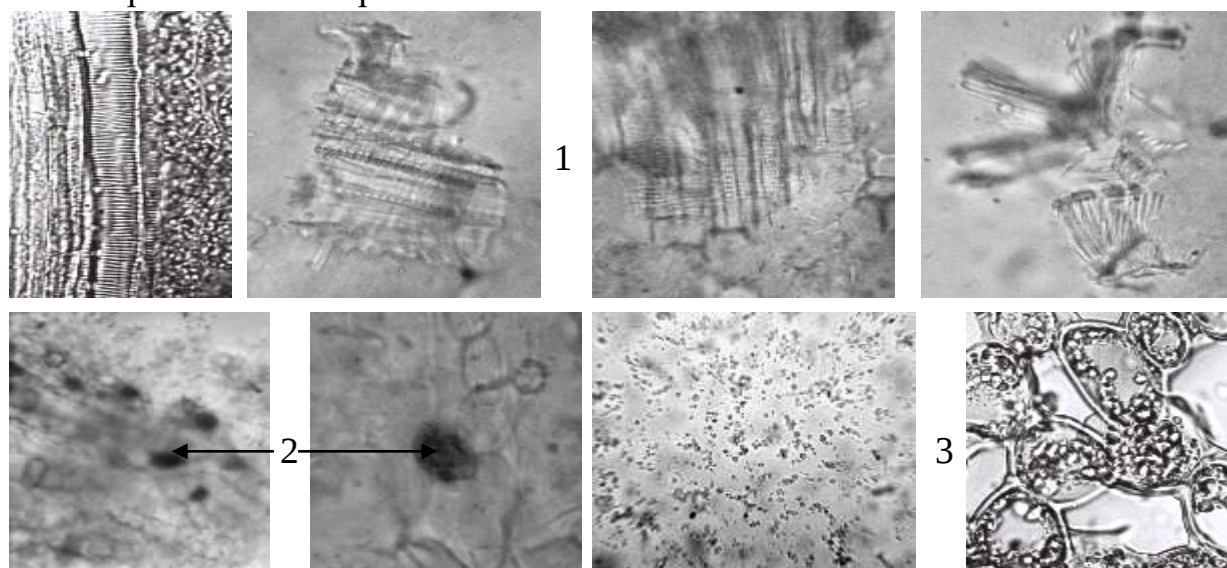


Рис 4.10 Фрагменти мікроскопії порошку кореневищ лепехи: 1 – уривки спіральних і драбинчастих судин; 2 – клітини з флобафенами; 3 – крохмальні зерна.

Отримані результати морфолого-анатомічної будови надземної та підземної частин лепехи звичайної використано при розробці проєкту монографії ДФУ «Лепехи кореневище^N» та проєкту МКЯ листя лепехи звичайної.

4.2 Визначення показників якості, обов'язкових для ЛРС

Для підтвердження якості та безпечності сировини проведено дослідження за загальними показниками якості, що є обов'язковими для сировини відповідно до регламентації ДФУ. Дослідження проводили за уніфікованими фармакопейними методиками, що детально описані в розділі 2.

4.2.1 Кореневища лепехи звичайної

Визначення основних показників якості проводили на 7 серіях кореневищ лепехи звичайної, заготовлених у різні роки на території Харківської, Сумської, Полтавської, Київської, Чернігівської та Житомирської областей, відповідно до вимог ДФ СРСР XI видання, монографія «Кореневища лепехи» [162]. Додатково визначено показник золи, нерозчинної в кислоті хлоридній.

Зразки кореневищ лепехи звичайної зареєстровано в ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів» (табл. 4.1).

Таблиця 4.1

Зареєстровані серії кореневищ лепехи звичайної

Реєстраційний номер	№ серії	Місце заготівлі
464	R-2	Харківська обл., с. Мартове
465	R-4	Сумська обл., с. Чернетчина
466	R-1	Полтавська обл., м. Гадяч
467	R-8	Київська обл., м. Ірпінь
468	R-5	Чернігівська обл., м. Чернігів
469	R-3	Харківська обл., м. Куп'янськ
470	R-7	Житомирська обл., м. Житомир

Дослідження показників якості сировини проводили за методиками ДФУ 2.0, описаних у розділі 2.2.2 [167]. Отримані в ході досліджень результати наведено в табл. 4.2.

Таблиця 4.2

Показники якості кореневищ лепехи звичайної

Показник	Нормування	Серія сировини №						
		R-1	R-2	R-3	R-4	R-5	R-7	R-8
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Сторонні домішки: кореневища, недостатньо очищені від коренів і залишків листя	$\leq 5\%$	4,3	2,3	4,0	3,6	1,8	2,5	2,5
Кореневища, побурілі на зламі	$\leq 5\%$	1	2,5	3,9	2,8	3,2	2,0	2,5
Органічні домішки	$\leq 1\%$	0,75	1,5	—	—	1,0	0,5	—
Мінеральні домішки	$\leq 2\%$	—	0,5	1,3	0,55	1,3	0,5	—
Втрата в масі при висушуванні	$\leq 14\%$	10,89	10,26	9,38	10,08	10,55	9,94	10,02
Загальна зола	$\leq 6\%$	4,16	3,52	5,25	3,60	5,04	4,62	3,42
Зола нерозчинна в HCl	Не регламентується	1,85	1,41	1,91	0,85	2,16	2,39	1,75
Кількісний вміст ефірної олії в перерахунку на суху сировину	Ціла сировина $\geq 2,0\%$	2,18	2,23		2,45	2,73	2,22	
	Подрібнена сировина $\geq 1,5\%$			1,94				1,61

Примітка. (—) – не виявлено.

Як видно з отриманих результатів, за винятком серії R-2, усі досліджувані зразки відповідали вимогам, що регламентуються монографією «Кореневище лепехи» ДФ СРСР XI видання [162]. Зразок кореневищ R-2 не відповідав вимогам за вмістом органічних домішок. Для подальших досліджень ця серія була додатково очищена від домішок інших рослин.

Визначено вміст золи, що не розчиняється в кислоті хлоридній, виявлено, що цей показник у досліджуваних зразках кореневищ лепехи звичайної знаходився в межах 1,41–2,39 %. Показник загальної золи знаходився на рівні 3,42–5,25 %, що відповідає вимогам ДФ СРСР XI видання [162]. Найбільший кількісний вміст ефірної олії, у перерахунку на абсолютно суху сировину, спостерігався в зразку R-5 – 2,73 %, найменший – у зразку R-8, де ефірна олія накопичувалася на рівні 1,61 %

Результати внесені до проєкту монографії ДФУ «Кореневища лепехи».

4.2.2 Листя

Листя лепехи звичайної, на відміну від кореневищ, не є фармакопейною сировиною і не використовується до цього часу в офіційній медицині. Тому для стандартизації сировини вирішено провести дослідження таких числових показників, як: сторонні домішки (листки, що втратили колір, органічні домішки, мінеральні домішки); втрата в масі при висушуванні; загальна зола; зола, нерозчинна в хлористоводневій кислоті; кількісний вміст ефірної олії. Враховуючи відносно значний вміст флавоноїдів, вирішено регламентувати кількісний вміст не тільки ефірної олії, як основної групи БАР, а й флавоноїдів.

Дослідження динаміки накопичення флавоноїдів та ефірної олії проводили на зразках сировини, відібраних за основними вегетаційними фазами рослини: вегетативна, бутонізації, цвітіння (понад 60%) та кінець цвітіння, відповідно до методики, описаної в розділі 2.2.2 [201]. Результати визначення кількісного вмісту флавоноїдів у листі лепехи звичайної показали, що максимальне накопичення суми БАР спостерігалось у фазі цвітіння (табл. 4.3), дослідження проводили за уніфікованою методикою ДФУ, описаною в монографії «Глоду листя та квітки^N»,

у перерахунку на гіперозид і абсолютно суху сировину [168].

Таблиця 4.3

Динаміка накопичення БАР у листі лепехи з звичайної (n = 3)

Фаза вегетації	Вміст	
	Суми флавоноїдів, %	Ефірної олії, %
Веgetативна	0,50 ± 0,01	0,64 ± 0,01
Бутонація	0,60 ± 0,02	0,92 ± 0,04
Цвітіння (понад 60%)	1,30 ± 0,02	1,04 ± 0,02
Кінець цвітіння (менше 10%)	0,45 ± 0,01	1,15 ± 0,04

Відповідно до отриманих результатів заготовлено та відібрано 7 серій сировини, в яких досліджено числові показники якості сировини (табл. 4.4).

Таблиця 4.4

Показники якості листя лепехи звичайної

Показник	Серія зразка						
	1(F)	2(F)	3(F)	3-d.f.	F-9	F-14	F-8
1	2	3	4	5	6	7	8
Сторонні домішки: листки, що втратили колір	1,2	4,1	2,3	2,8	2,6	3,4	1,9
Органічні домішки	1,6	1,2	1,7	0,5	1,0	1,2	1,4
Мінеральні домішки	—	—	0,2	—	0,2	0,1	—
Втрата в масі при висушуванні	14,1	10,9	8,3	13,4	11,2	12,2	9,7
Загальна зола	9,22	8,58	9,88	6,54	8,32	7,71	8,79
Зола, нерозчинна в HCl	3,62	3,78	4,71	2,54	4,10	3,98	4,59
Кількісний вміст ефірної олії в перерахунку на суху сировину	1,22	1,07	0,84	1,04	0,92	0,97	1,93
Кількісний вміст флавоноїдів у перерахунку на гіперозид	0,87	1,00	1,05	1,30	0,85	0,96	0,96

Примітка. (—) – не виявлено.

Значення втрати в масі при висушуванні знаходилися в межах 8,3 –14,1 %, що дозволяє встановити регламентацію відповідного числового показника якості – не більше 14 %. У порівнянні з кореневищами лепехи, листя мають значно вищі показники кількості загальної золи та золи, нерозчинної в хлористоводневій кислоті – від 6,54 до 9,88 % та від 2,54 до 4,10 % відповідно. Найбільша кількість ефірної олії визначена для зразка F-8 – 1,93 %. У середньому серед інших серій цей показник знаходився в межах 1,0 %. Кількісний вміст суми флавоноїдів мав середнє значення близько 1,0 %, найбільше виявлено флавоноїдів у серії 3-d.f – 1,30 %, найменше у серії F-9 – 0,85 %.

Отримані результати будуть використані при встановленні вимог до сировини листя лепехи звичайної під час розробки методів контролю якості.

4.3 Розробка методики ідентифікації сировини лепехи звичайної за наявністю азарону методом ТШХ

Азарон є одним із основних біологічно активних компонентів рослини і специфічним маркером для виду *Acorus calamus*, особливо для триплоїдного цитотипу поширеного на території України. Враховуючи світові доробки в цьому напрямку, за основу була взята методика описана в проєкті № 2456 монографії до Європейської фармакопеї [161]. Згідно з яким як рухома фаза використовується система *толуол R* – *етилацетат R* у співвідношенні 93 : 7, хроматографічна пластинка TLC silica gel 60 F₂₅₄, що попередньо обробляється протягом 4 с у 55,5 г/л розчині *кофеїну R* у *метилен хлориді R*. Відповідно до проєкту монографії ЄФ, проявником слугує розчин *анісового альдегіду R*.

Попередня обробка хроматографічної пластинки потрібна для розділення азарону на цис- і транс-ізомери, але оскільки обидва ізомери виявляють токсичні властивості та враховуючи результати попередніх досліджень, за якими у вітчизняних зразках сировини α -азарон виявлено в незначній кількості, для спрощення й економічності методики вирішено проводити експеримент без обробки пластинки розчином кофеїну, визначаючи суми α - і β -азаронів у сировині

лепехи звичайної.

Для апробації методики приготовано випробовуваний розчин кореневищ лепехи звичайної у концентрації 0,1 г/мл. 1,0 г свіжоподрібнених на порошок (355) кореневищ поміщали в круглодонну колбу на 25 мл, додавали 10 мл *метанолу Р*, після чого нагрівали протягом 1 хв на водяній бані зі зворотнім холодильником при температурі 60 °С, охолоджували та фільтрували крізь паперовий фільтр «синя стрічка». Як розчин порівняння використовували 1,5 мг/мл метанольний розчин стандартного зразка α -азарону (α -Asarone) фірми «Sigma-Aldrich» (серія VCBJ9108V).

На хроматографічну пластинку наносили два випробовувані розчини аліквотою 15 і 30 мкл та розчин порівняння аліквотою 10 мкл. Досліджувані зразки наносили смугами по 1,0 см. Після чого пластинку опускали в насичену хроматографічну камеру з рухомою фазою *толуол Р – етилацетат Р (93 : 7)*. Після елюювання пластинку сушили на повітрі та, після обприскування *розчином анісового альдегіду Р*, нагрівали в сушильній шафі протягом 5-10 хв при температурі 105 °С.

Результати хроматографування наведено на рис. 4.11.

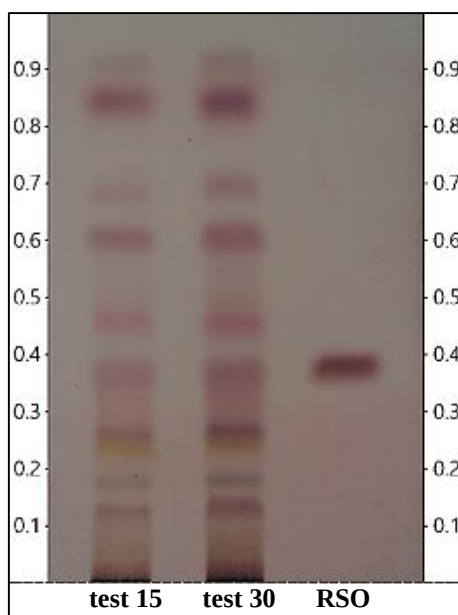


Рис. 4.11 Хроматограма ідентифікації азарону в кореневищах лепехи звичайної: test 15 – 15 мкл досліджуваного розчину; test 30 – 30 мкл досліджуваного розчину; RSO – 10 мкл розчину стандарту α -азарону

Як видно з наведених результатів, після обробки хроматограм розчином проявника порівняно із зонами розчину стандартного зразка α -азарону випробовувані розчини мають хроматографічні зони (R_f близько 0,38) з рожево-фіолетовим забарвленням, що з часом змінюється на сіро-зелене, що можна виділити як додатковий аналітичний ефект для ідентифікації α -азарону в таких умовах аналізу. Отримані результати свідчать про працездатність цієї методики.

Наступним етапом стало дослідження зразків листя та кореневищ лепехи звичайної, заготовлених у різних регіонах України, на наявність азарону. Для цього відібрано по 7 серій підземної (рис. 4.12) та надземної (рис. 4.13) частин рослини з одного місця заготівлі. Приготування випробовуваних розчинів та розчину порівняння відбувалося за вищеописаною методикою. Випробовувані розчини наносили в аліквоті 30 мкл.

Додатково приготовлено і нанесено розчин *ФСЗ ДФУ цинеолу в метанолі Р* у концентрації 2,5 мг/мл (аліквота 10 мкл).

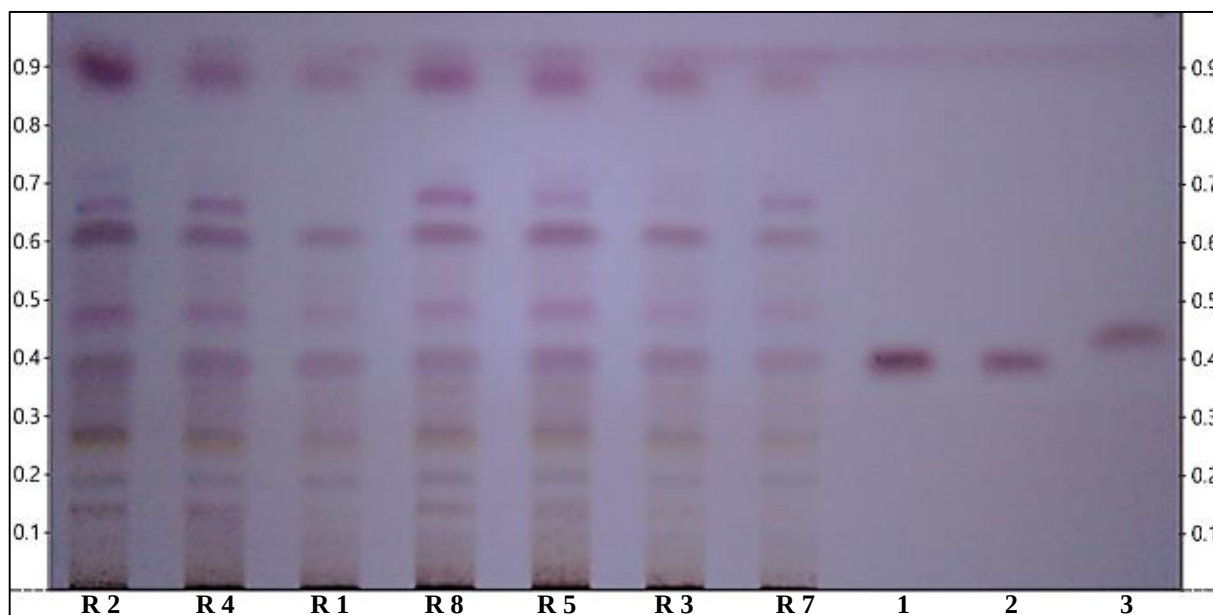


Рис. 4.12 Хроматограма ідентифікації азарону в 7 серіях кореневищ лепехи звичайної: R 1-5, 7, 8 – 30 мкл досліджуваних розчинів; 1 – 10 мкл розчину СЗ азарону; 2 – 5 мкл розчину СЗ азарону; 3 – розчин ФСЗ ДФУ цинеолу

Як видно з хроматограми, усі серії сировини кореневищ лепехи звичайної містять азарон. Зони досліджуваної речовини чітко ідентифікуються, що дає можливість стверджувати про працездатність цієї методики.

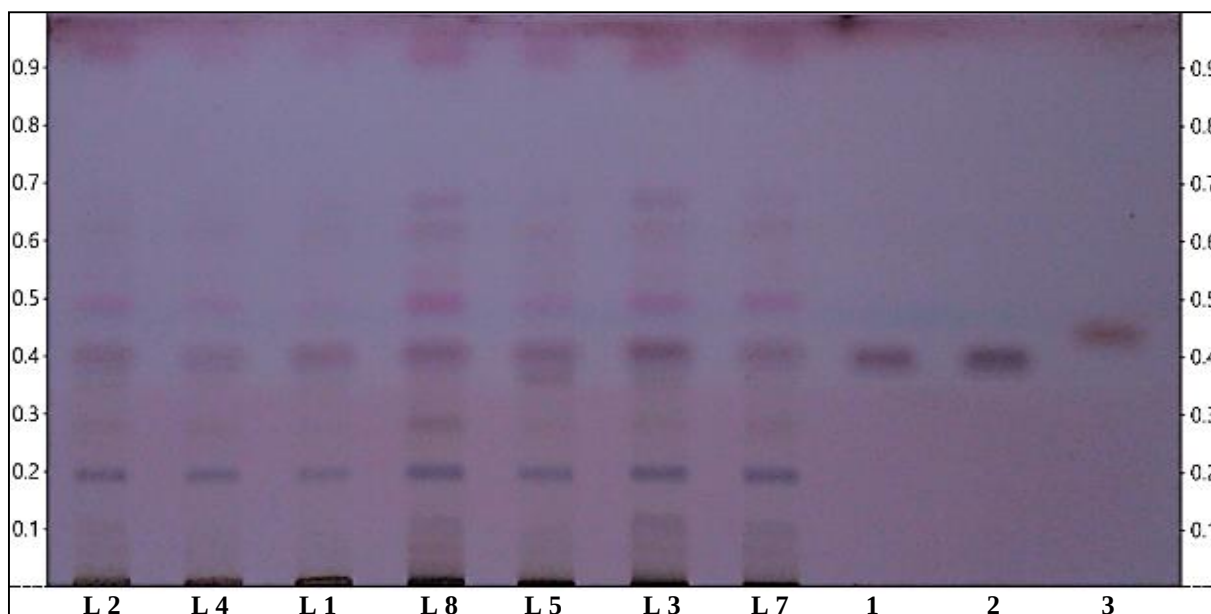


Рис. 4.13 Хроматограма ідентифікації азарону в 7 серіях листя лепехи звичайної: L 1-5, 7, 8 – 30 мкл досліджуваних розчинів; 1 – 5 мкл розчину СЗ азарону; 2 – 10 мкл розчину СЗ азарону; 3 – розчин ФСЗ ДФУ цинеолу

Схожі результати отримано при дослідженні випробовуваних розчинів отриманих з листя лепехи звичайної. Крім того, досліджено та підтверджено можливість використовувати розчин СЗ цинеолу для ідентифікації азарону та сировини лепехи звичайної, оскільки в таких умовах зона цинеолу знаходиться відразу над зоною азарону.

4.4 Розробка методики кількісного визначення вмісту азарону

Враховуючи численні публікації щодо токсичних ефектів азарону та беручи до уваги рекомендації Європейського агентства з лікарських засобів та інших профільних організацій, щодо питання регламентації гранично допустимого кількісного вмісту азарону в сировині, наступним кроком була розробка методик кількісного визначення азарону в сировині лепехи звичайної [202].

4.4.1 Розробка методики кількісного визначення азарону методом ВЕТШХ

Враховуючи результати, отримані при розробці методики ідентифікації

азарону в сировині лепехи звичайної, вирішено на її основі розробити методику кількісного визначення. На першому етапі розробки запропоновано розрахувати вміст цієї сполуки у досліджуваних зразках за інтенсивністю забарвлення хроматографічної зони азарону з використанням програмного забезпечення Sorbfil TLC Videodensitometer. Для цього за попередньою методикою був приготований випробовуваний розчин кореневищ лепехи звичайної та розчин порівняння. На хроматографічну пластинку випробовуваний розчин наносили аліквотою у 30 мкл, що відповідає концентрації 3,0 мг/мл. Розчин порівняння наносили аліквотами в 5, 10 та 15 мкл, що відповідає концентраціям 0,0075, 0,015 та 0,0225 мг/мл, тобто 0,25, 0,5 та 0,75% азарону в сировині. Після чого на хроматографічну пластинку TLC plates silica gel 60 F₂₅₄ (Merck), 10x10 см нанесено зразки. Хроматографування проводили в аналогічних умовах раніше розробленої методики ідентифікації азарону (розд. 4.3).

Результати хроматографування наведено на рис. 4.14.

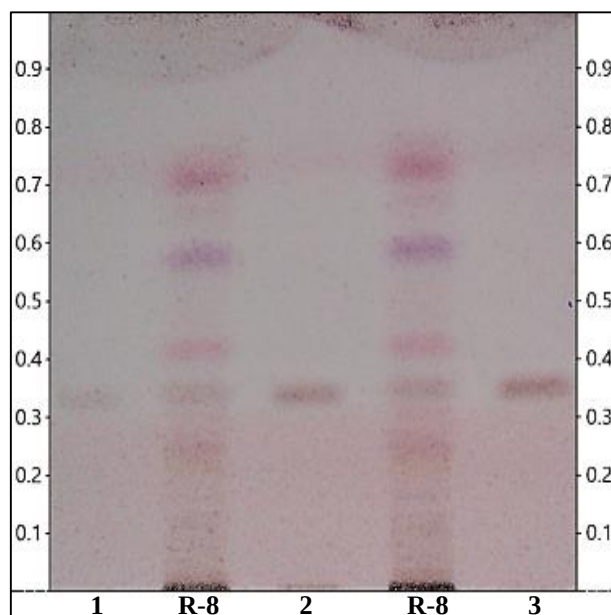


Рис. 4.14 Хроматограма кількісного визначення азарону в сировині:

1 – 0,25% розчин СЗ азарону азарону, R-8 – 30 мкл досліджуваного розчину; 2 – 0,5% розчин СЗ азарону; 3 – 0,75% розчин СЗ азарону азарону

При візуальному контролі хроматограми помітно, що хроматографічні профілі, незважаючи на їх теоретичну ідентичність, дещо відрізнялися за інтенсивністю забарвлення. Різницю можна пояснити нерівномірністю при

обприскуванні розчином проявника. При спробі обробити отримані результати з використанням Sorbfil TLC Videodensitometer програмний алгоритм не зміг зчитати правильно дані, що пов'язано з недостатньо чіткими зонами на хроматограмі.

Отже, нанесення проявника методом обприскування не підходить для кількісного визначення азарону методом ТШХ. Подальшу розробку методики кількісного визначення вирішено проводити з використанням приладу для високоефективної тонкошарової хроматографії фірми «Camag» (Швейцарія). Насамперед, вирішено змінити метод дериватизації з обприскування розчином *анісового альдегіду Р* на занурення в розчин проявника. Занурення хроматографічної платинки здійснювали з використанням «Immersion Device» (Camag) при швидкості занурення 50 мм/с і часом імерсії 3 с (рис. 4.15).

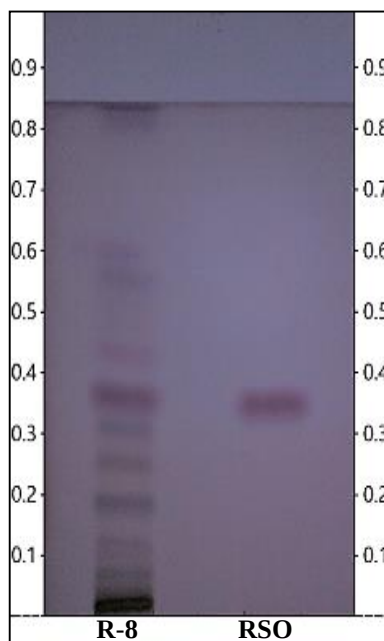


Рис. 4.15 Хроматограма досліджуваного розчину (R-8) і розчину стандартного зразка (RSO) після нанесення проявника методом занурення

Метод занурення дозволяє рівномірно в однаковій кількості нанести проявник на хроматографічну пластину, що значно покращує чіткість хроматографічних зон і відтворюваності. На пластинку 5x10 см наносили зразок досліджуваного розчину (30 мкл) і розчину порівняння (10мкл). Хроматографування проводили за умов описаних вище.

У результаті хроматографування з наступним нанесення проявника методом

занурення отримано чіткі зони. Проте через зміщення лівого краю хроматографічного профілю випробовуваного розчину вверх отримані результати після обробки програмним забезпеченням Sorbfil TLC Videodensitometer не могли вважатися достовірними. Викривлення, що спостерігається на хроматограмі (рис. 4.15), пов'язано з крайовим ефектом при елююванні.

Для подальшої розробки методики вирішено використовувати хроматографічну пластину HPTLC plates silica gel 60 F₂₅₄ (Merck), 10x10 см. Для покращання відтворюваності нанесення проб здійснювали з використанням аплікатора напівавтоматичного Linomat 5 (Camag) та програмного забезпечення winCATs. Швидкість нанесення проб 150 нл/с. Після хроматографічну дериватизацію проводили методом занурення у розчин *анісового альдегіду P* із використанням Immersion Device (Camag). Результати наведено на рис. 4.16.

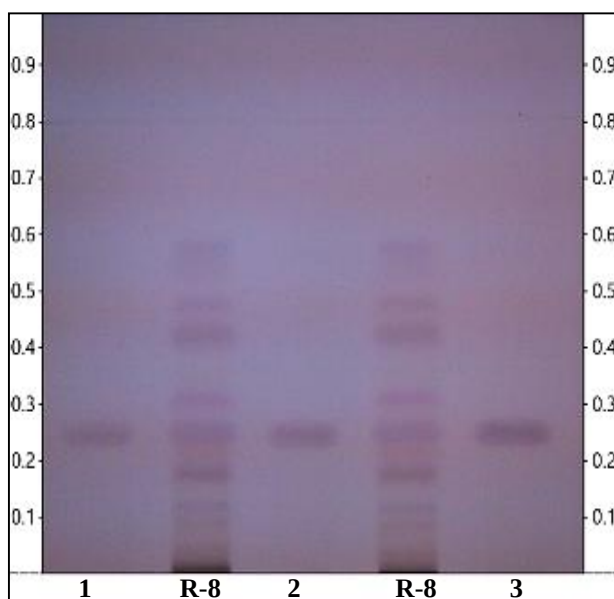


Рис. 4.16 Хроматограма кількісного визначення азарону в кореневищах лепехи звичайної: 1 – 0,25% розчину СЗ азарону; R-8 – досліджувані розчини; 2 – 0,5% розчин СЗ азарону; 3 – 0,75% розчин СЗ азарону

Як видно з результатів хроматографування, була досягнута значно вища ефективність порівняно з попередніми спробами. Обидва хроматографічні профілі випробовуваних розчинів є ідентичними. Всі зони на хроматограмі чіткі. Простежується чітка послідовність збільшення інтенсивності забарвлення хроматографічних зон розчинів порівняння зі збільшенням їх концентрації. На основі візуальної інтенсивності забарвлення зон досліджуваної речовини на

хроматограмах випробовуваних зразків із хроматограмами розчинів стандартного зразка, нами зроблено припущення, що вміст азарону в досліджуваному розчині практично не відрізняється від концентрації азарону в розчині порівняння 1 і складає приблизно 0,25%.

Для підтвердження візуальних спостережень після хроматографування інтенсивність поглинання хроматографічних зон визначали при довжині хвилі 550 нм із використанням TLC Scanner 3 (Camag), з наступною обробкою даних за допомогою програмного забезпечення winCats, розрахунком методом поліноміальної калібрувальної площі піків. Результати сканування отриманих хроматографічних профілів випробовуваного розчину кореневищ лепехи звичайної та розчинів порівняння наведено на рис. 4.17.

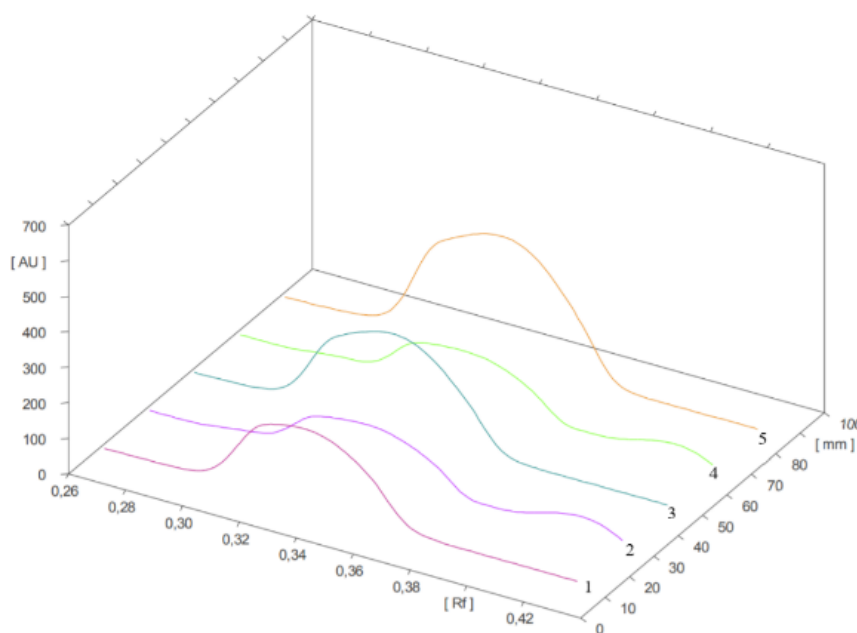


Рис. 4.17 УФ-спектри зони азарону, отримані при денситометрії хроматограми, наведеної на рис. 4.14, де: 1 – 0,25% розчину СЗ азарону; 2, 4 – досліджувані розчини; 2 – 0,5% розчин СЗ азарону; 3 – 0,75% розчин СЗ азарону

За допомогою TLC Scanner 3 отримано цифрові хроматограми хроматографічних профілів досліджуваних зразків. Кількісний вміст азарону у відсотках та перерахунку на суху сировину обчислювали за формулою:

$$X (\%) = \frac{S \cdot m_0 \cdot 10 \cdot 0,01 \cdot p \cdot 100}{S_0 \cdot m \cdot 0,03 \cdot 10 \cdot (100 - W)} = \frac{S \cdot m_0 \cdot 0,01 \cdot p \cdot 100}{S_0 \cdot m \cdot 0,03 \cdot (100 - W)},$$

де: S – площа азарону, розрахована з хроматограм *випробовуваного розчину*;

S_0 – площа азарону, розрахована з хроматограм розчину порівняння 3 (0,5%);

m_0 – маса наважки стандартного зразка СЗ азарону, у г;

m_i – маса наважки препарату, у г;

P – вміст основної речовини в СЗ азарону, у %;

W – втрата в масі при висушуванні сировини, у %.

Відповідно до отриманих результатів визначення кількісного вмісту азарону в кореневищах лепехи звичайної вміст у досліджуваному зразку склав $0,26 \pm 0,002$ %. Результати визначення методом ВЕТШХ підтвердило зроблене раніше припущення, що кількісний вміст азарону у випробовуваному розчині практично не відрізняється від 0,25% розчину стандартного зразка. Значення R_f для всіх зразків однакове, тому цю методику можна рекомендувати для кількісного визначення азарону в сировині лепехи звичайної [203].

4.4.2 Розробка спільної методики ідентифікації лепехи звичайної та визначення граничного вмісту азарону в сировині

Розроблений метод кількісного визначення азарону методом ВЕТШХ має певні недоліки, а саме це: висока вартість обладнання та витратних матеріалів, потреба у висококваліфікованих спеціалістах та практична відсутність необхідного обладнання на фармацевтичних підприємствах України. Тому, нами запропоновано спрощену методику визначення азарону, що дозволяє провести ідентифікацію рослини за наявністю азарону та визначити його граничний вміст.

Для визначення граничного вмісту азарону в зразках використано метод порівняння інтенсивності забарвлення зон стандартних розчинів азарону і досліджуваних зразків. Як і при кількісному визначенні методом ВЕТШХ, на хроматографічну пластинку наносили 3 розчини 1,5 мг/мл стандартного зразку в аліквотах, що відповідали 0,25, 0,5 та 0,75 % азарону в сировині.

Визначення граничного вмісту азарону в досліджуваних зразках проводили шляхом візуального порівняння зон азарону з відповідними зонами на хроматограмах стандартних розчинів. Усі випробовувані серії сировини містили

азарон у кількості, що не перевищує 0,5 % [204, 205].

Результати апробації цієї методики наведено на рис. 4.18 та 4.19.

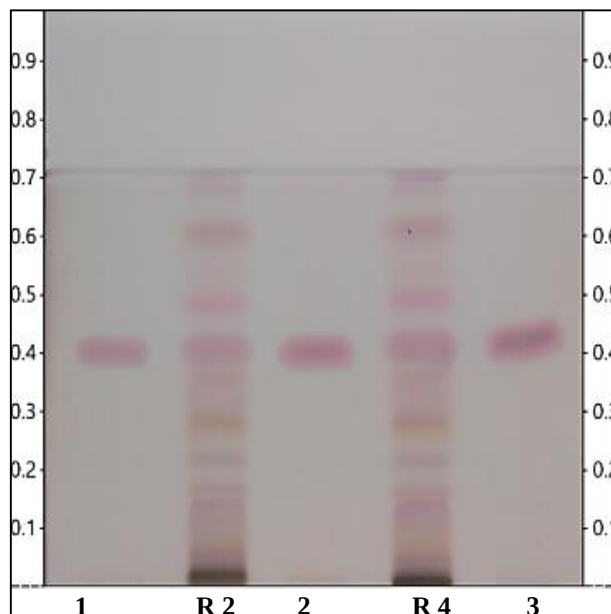


Рис. 4.18 ТШХ хроматограма, дослідження граничного вмісту азарону в кореневищах лепехи: R 2, 4 –досліджувані розчини кореневищ лепехи; 1 – 0,25% розчин СЗ азарону; 2 – 0,5% розчин СЗ азарону; 3 – 0,75% розчин СЗ азарону

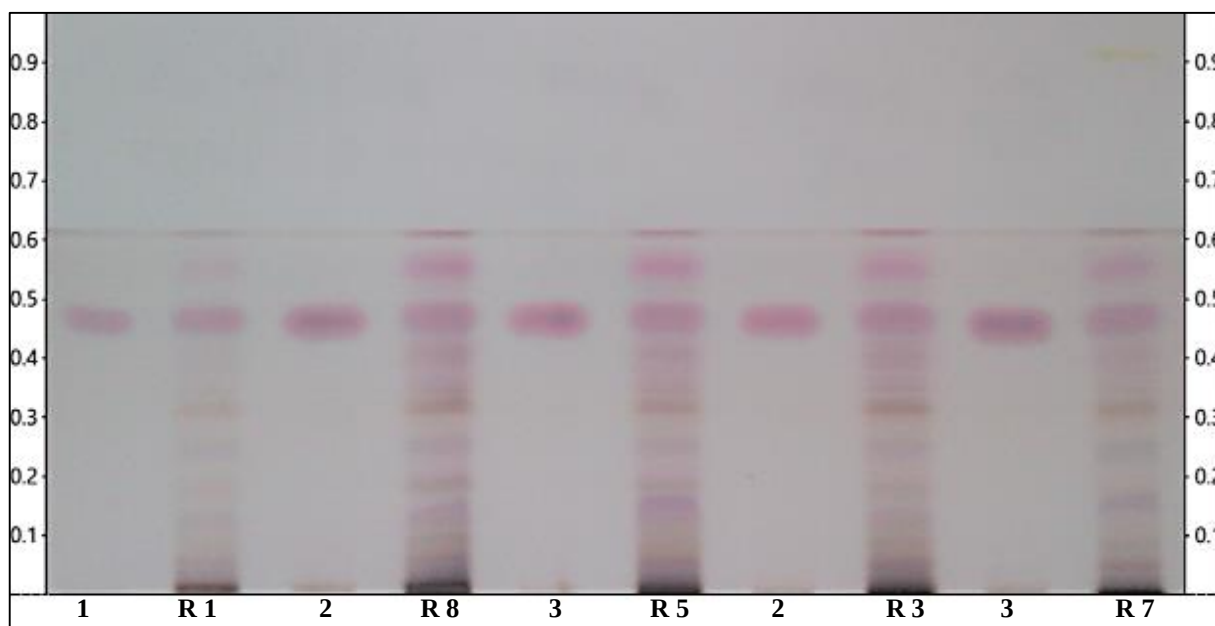


Рис. 4.19 ТШХ хроматограма, дослідження граничного вмісту азарону в кореневищах лепехи звичайної: R 1, 3, 5, 7, 8 –досліджувані розчини кореневищ лепехи; 1 – 0,25% розчин СЗ азарону; 2 – 0,5% розчин СЗ азарону; 3 – 0,75% розчин СЗ азарону

Розроблена методика запропонована для внесення до монографії «Лепехи кореневища» до ДФУ 2.0.

4.4.3 Розробка методики кількісного визначення азарону методом ВЕРХ

Для випадків, коли необхідно визначити точну кількість азарону в сировині або препаратах лепехи звичайної, була розроблена методика кількісного визначення сполуки методом ВЕРХ. Розробку методики в сировині проводили відповідно до вимог ДФУ 2.0, ст. 2.2.29 «Рідинна хроматографія». Визначення кількісного вмісту азарону в сировині лепехи звичайної проводили з використанням вискоєфективного рідинного хроматографа ProStar, укомплектованого діодно-матричним детектором PDA model 330 (фірми «Varian», США). Для визначення вмісту азарону використано колонка Purospher® STAR RT-18e, Hibar (250 x 4,0 мм, розмір частинок 5 мкм), фірми «Merck».

Для аналізу використовували ацетонітрил та метанол виробництва компанії «Sigma-Aldrich» (Німеччина) кваліфікації «gradient grade, for HPLC» та воду для хроматографування *P*.

Як і при кількісному визначенні азарону в сировині методом ВЕТШХ, розрахунок кількісного вмісту вирішено проводити спільно обох ізомерів азарону в перерахунку на стандартний зразок α -азарону фірми «Sigma Aldrich», Німеччина (серія № BCBJ9108V).

Методика кількісного визначення вмісту азарону

Випробовуваний розчин. 200 мг (точна наважка) подрібненої на порошок сировини (710) (2.9.12) поміщають у конічну колбу місткістю 100 мл, додають 60 мл метанолу *P* і витримують на водяній бані зі зворотним холодильником протягом 10 хв. Охолоджують і фільтрують крізь паперовий фільтр «синя стрічка» в мірну колбу місткістю 100 мл, доводять до позначки тим самим розчинником і перемішують

Розчин порівняння. 10,0 мг (точна наважка) *СЗ* α -азарону поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняють у 80 мл метанолу *P*, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки та перемішують.

10,0 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки та перемішують.

Перед хроматографуванням розчини фільтрують крізь мембранний фільтр з розміром пор не більше 0,45 мкм. Хроматографування проводять на рідинному хроматографі зі спектрофотометричним детектором за таких умов:

- колонка розміром 250 x 4,0 мм, заповнена силікагелем для хроматографії октадецилсилільним Р (наприклад, Purospher® STAR RT-18e, Hibar, фірми «Merck») з розміром частинок 5 мкм або аналогічна, для якої виконуються умови придатності хроматографічної системи:

- рухома фаза: вода для хроматографії Р – ацетонітрил Р (40 : 60);
- швидкість рухомої фази: 1,0 мл/хв;
- температура колонки: 25 °С;
- детектування при довжині хвилі 303 нм;
- об'єм інжекції: 20 мкл.

Час хроматографування складає 1,8 від часу утримання β-азарону.

Ідентифікація β-азарону: для ідентифікації β-азарону використовується відносний час утримання характерних піків (α-азарону – 1,00, β-азарону – 0,92).

Хроматографічна система вважається придатною, якщо виконуються наступні умови:

- коефіцієнт розділення для піків α-азарону і β-азарону – не менше 1,2.
- коефіцієнт симетрії піків α-азарону і β-азарону має бути від 0,7 до 1,5.

Вміст (X_1) азарону у відсотках, у перерахунку на α-азарон і суху речовину, обчислюють за формулою:

$$X_1 = \frac{S_{\alpha+\beta} \cdot m_0 \cdot 100 \cdot 10 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot m_1 \cdot 100 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{S_{\alpha+\beta} \cdot m_0 \cdot P \cdot 10}{S_0 \cdot m_1 \cdot (100 - W)},$$

де $S_{\alpha+\beta}$ – середнє значення суми площ піків α-азарону і β-азарону випробовуваного розчину, розраховане з хроматограм випробовуваного розчину;

S_0 – середнє значення площ піків α-азарону, розраховане з хроматограм розчину порівняння;

m_1 – маса наважки сировини, у мг;

m_0 – маса наважки СЗ α-азарону, у мг;

Р – вміст основної речовини в СЗ α-азарону, у %;

W – втрата в масі при висушуванні сировини, у %.

Валідація методики кількісного визначення азарону

При проведенні валідаційних досліджень методики кількісного визначення азарону перевірено такі метрологічні характеристики: робасність, специфічність, лінійність, правильність, прецизійність та внутрішньолабораторна прецизійність.

Невизначеність результатів аналізу виражали як однобічний відносний довірчий інтервал для рівня надійної ймовірності 95 %. Відповідно до вимог ДФУ 2.0, ст. 5.3.N.2. «Валідація аналітичних методик і випробувань», встановлено, що максимальна невизначеність результатів для кількісного визначення азарону в кореневищах лепехи звичайної не має перевищувати 6,4 % (Δ_{AS}) (кількісне визначення, однобічний інтервал «не більше») [167]. Прогноз невизначеності пробопідготовки випробовуваного розчину та розчину порівняння розраховували на основі загальних вимог ДФУ до лабораторного обладнання (табл. 4.5).

Таблиця 4.5

Розрахунок невизначеності пробопідготовки для аналізу азарону (Δ_{sp})

Операція пробопідготовки	Значення	Невизначеність, (Δ),%
1	2	3
<i>Випробовуваний розчин</i>		
Наважка (мг)	200 мг	0,10
Доведення до об'єму	100 мл	0,12
<i>Розчин порівняння</i>		
Наважка (мг)	10 мг	2,00
Доведення до об'єму	100 мл	0,12
Аліквота	10 мл	0,25
Доведення до об'єму	100 мл	0,12
<i>Повна невизначеність пробопідготовки $\Delta_{sp}\%$</i>		2,03
<i>Невизначеність кінцевої аналітичної операції Δ_{FAO} (рідинна хроматографія)</i>		1,35
<i>Повна невизначеність методики аналізу $\Delta_{AS}\%$</i> $\Delta_{AS}\% = \sqrt{(\Delta_{sp}\%)^2 + (\Delta_{FAO}\%)^2}$		2,44

Отже, розрахована повна невизначеність методики аналізу $\Delta_{AS}\%$ менше $\max \Delta_{AS}$ ($2,44\% < \max \Delta_{AS} = 6,4\%$), що відповідає вимогам до цього параметра. Тобто, невизначеність пробопідготовки й аналізу в цілому мають забезпечити достатню точність вимірювання.

Вивчення стабільності

Для визначення стабільності проведено аналіз свіжоприготовлених випробовуваного розчин та розчин порівняння, проведено дослідження використовуючи ті самі розчини через 24 години після приготування (табл.4.6).

Таблиця 4.6

Дослідження стабільності випробовуваного розчину та розчину порівняння

Час приготування	Розчин порівняння	Випробовуваний розчин
	Площа піка	Площа піка
Свіжоприготований	1223394	1820056
Через 24 години	1227482	1815834
Зміна площі піків, %		
	0,33	0,23

Середні значення площ піку азарону на хроматограмах свіжоприготованих розчинів (випробовуваного і порівняння) мають відрізнятися від площ піку азарону на хроматограмах аналогічних розчинів, аналізованих через 24 години, на значення не більше $0,32 \times \Delta_{AS}$ ($6,4\%$) = $1,6\%$, (різниця має бути незначуща порівняно з максимально допустимою невизначеністю результатів аналізу) [167].

Як видно з отриманих результатів, випробовуваний розчин та розчин порівняння стабільні протягом 24 годин, оскільки різниця між площами піків на хроматограмах досліджуваних розчинів через 24 години після приготування від свіжоприготованих розчинів не перевищує $1,6\%$.

Вивчення специфічності

Для підтвердження специфічності методики приготовлено та проаналізовано такі розчини: розчинник (бланк-розчин) (дод. Б, рис. Б.1), розчин порівняння (дод. Б, рис. Б.2) та випробовуваний розчин (дод. Б, рис. Б.3).

Специфічність методики підтверджена шляхом порівняння хроматограм

розчину порівняння, випробовуваного розчину, бланка-розчину.

Час утримування α - і β -азарону на хроматограмах випробовуваного розчину відповідає часу утримування піка стандартного розчину α - і β -азарону (8,2 і 7,5 хв відповідно). На бланк-хроматограмі не виявлено піків, час утримування яких збігався б з часом утримування α - і β -азарону.

Вивчення лінійності, правильності, прецизійності

Вивчено лінійність, правильність і прецизійність одночасно для 7 модельних розчинів, які містять α -азарон у діапазоні 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200% від максимально допустимого. За результатами вимірювань площі піка α -азарону модельних розчинів оцінювали лінійність, правильність та прецизійність.

Критерії прийнятності встановлені відповідно до вимог загальної статті ДФУ 5.3.N.2 «Валідація аналітичних методик і випробувань» та наукових рекомендацій щодо валідації аналітичних методик [167].

Значення, які використано для побудови графіку залежності « $Y_i = b \cdot X_i + a$ », наведені у табл. 4.7.

Таблиця 4.7

Розрахунок параметрів лінійності методики кількісного визначення

Модельні розчини	Середня S_i	C_i	Y_i	X_i	Z_i , %
1	2	3	4	5	6
5	95561	0,0005	5,18	5,0	103,69
10	186826	0,001	10,14	10,0	101,36
25	467947	0,003	25,39	25,0	101,55
50	920085	0,005	49,92	50,0	99,83
100	1820223	0,010	98,75	100,0	98,75
150	2777215	0,015	150,67	150,0	100,45
200	3693528	0,020	200,38	200,0	100,19

На рис. 4.19 зображено графік лінійної залежності аналітичного сигналу від фактичної концентрації розчину, побудований у нормалізованих координатах, виходячи з наведених у таблиці 4.7.

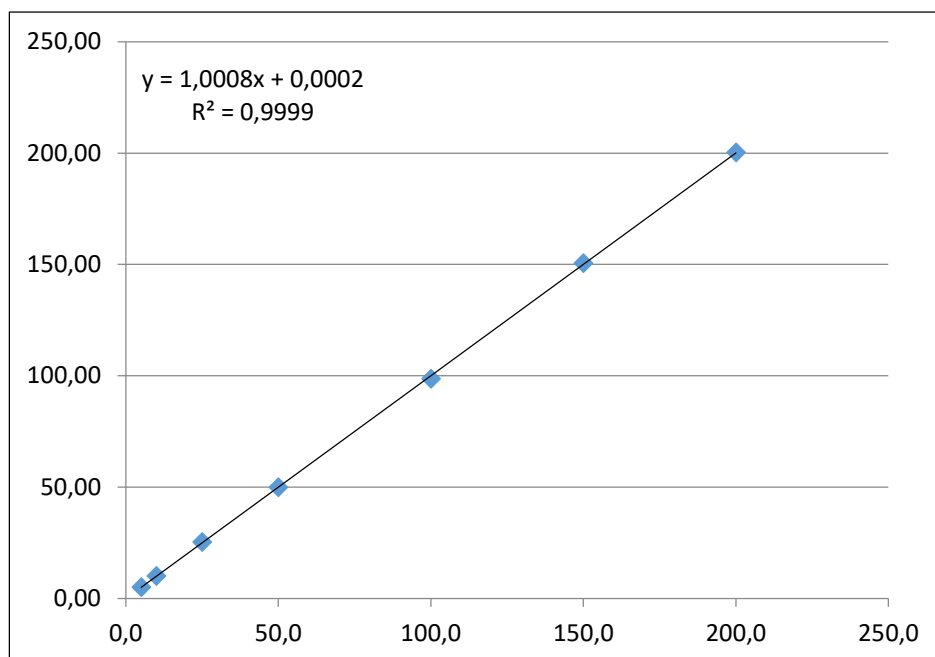


Рис. 4.19 графік лінійної залежності « $Y_i = b \cdot X_i + a$ » для стандартного розчину азарону

У табл. 4.8 наведені отримані параметри лінійності та критерії прийнятності.

Таблиця 4.8

Параметри лінійності та критерії (для наведених значень)

Параметри	Значення	Вимога 1	Вимога 2	Висновок
b	1,0008			
S_b	0,0036	$\leq 0,76 $	$\leq 2,16 $	Витримується за обома критеріями
a	0,0002			
S_a	0,3793			
$S_{o/b}$	$ 0,67272 $	$\leq 3,18 $		Витримуються
S_y	75,44			
r	$ 1,0000 $	$\geq 0,9991 $		Витримуються

Примітка. Значення критерію Стьюдента $(95, 1, 5) = 2,015$.

Як видно з наведених значень, усі критерії прийнятності витримуються, що дозволяє стверджувати про лінійність розробленої методики в діапазоні концентрацій від 5 до 200 % від нормування (не більше 0,5 %).

Параметри прецизійності і правильності розраховано за результатами

отриманими в ході визначення лінійності методики (табл. 4.9).

Таблиця 4.9

Параметри прецизійності і правильності

Валідаційний критерій	Параметри	Значення	Вимога 1	Вимога 2	Висновки
Прецизійність	Δ_z	3,05	$\leq 6,4$		Витримуються
Правильність	$ Z_{cp} - 100 $	0,83	$\leq 1,15$	$\leq 1,6$	Витримуються

Примітка. Відносне стандартне відхилення $S_z (\%) = 1,5721\%$, значення критерію Стюдента $(95, 1, 6) = 1,9432$.

Відповідно до отриманих значень розроблена методика відповідає вимогам до прецизійності та правильності. Визначення внутрішньолaboratorної прецизійності здійснювали використовуючи результати дослідження 4 проб одного зразка двома аналітиками в різні дні протягом одного робочого тижня з використанням різного мірного посуду (табл. 4.10).

Таблиця 4.10

Визначення параметрів внутрішньолaboratorної прецизійності азарону в кореневищах лепехи звичайної

№ зразка	Аналіз № 1	Аналіз № 2
R-14.1	0,319	0,318
R-14.2	0,317	0,319
R-14.3	0,319	0,318
R-14.4	0,319	0,319
Середнє	0,319	0,319
Загальне середнє		0,3186
Відносне стандартне відхилення, RSD%		0,25
Довірчий інтервал, $(\Delta_{intra} = t(95\%, m \cdot n - 1) \cdot RSD, \% = 1,8946 \cdot RSD, \%)$		0,47

Критерій внутрішньолaboratorної прецизійності для визначення азарону в кореневищах лепехи звичайної методом рідинної хроматографії виконується, оскільки значення довірчого інтервалу Δ_{intra} (0,47 %) не перевищує допустимого значення 1,6 %.

Визначення робасності методики

Для визначення робасності методики кількісного визначення проводили дослідження на 4 серіях сировини, використовуючи дві різні колонки: Purosphere Star RT-18 фірми Hibar, розмір 250 x 4 мм, заповнена *силікагелем октадецилсилільним для хроматографії Р* діаметром 5μm, та Symmetry C18, розміром 150 x 4,6 мм, фірми «Waters» заповнена *силікагелем октадецилсилільним для хроматографії Р* діаметром 5 мкм. Отримані результати не мають відрізнятися на значення гранично допустимої невизначеності методики аналізу Δ_{As} (6,4%); вони свідчать про відповідність вимогам визначення робасності (табл. 4.11).

Таблиця 4.11

Результати визначення робасності методики кількісного визначення азарону в кореневищах лепехи звичайної

№ серії	Purosphere Star RT-18	Symmetry C18	Відхилення,%
	Вміст, %		
R-8	0,2750	0,2677	2,64
R-14	0,3185	0,3228	1,35
R-1	0,0392	0,0416	6,15
R-7	0,1073	0,1020	4,97

Всі розраховані параметри відповідали необхідним валідаційним критеріям. Методика вважається валідованою і може бути використана для кількісного визначення азарону в кореневищах лепехи методом рідинної хроматографії. Усі досліджувані зразки містили азарон у кількості не більше 0,5 %. Підтверджено результати кількісного визначення азарону методом ВЕТШХ для зразка R-8 [206].

4.5 Проєкт монографії «Лепехи кореневища^N»

ЛЕПЕХИ КОРЕНЕВИЩА

Acori calami rhisomata

Висушені кореневища *Acorus calamus* L., зібрані восени або ранньої весни,

відмиті від землі, звільнені від коренів, залишків листя і стебел.

Вміст: для цілої сировини – не менше 20 мл/кг ефірної олії, в перерахунку на суху сировину; для подрібненої сировини – не менше 15 мл/кг ефірної олії, в перерахунку на суху сировину.

ВЛАСТИВОСТІ

Сировина має сильний ароматний запах.

Сировина має пряно-гіркий смак.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

А. Кореневища або шматки кореневищ завдовжки до 30 см і завширшки до 2 см, циліндричні, злегка сплюснуті і вигнуті, переважно поздовжньо-розрізані. На верхньому боці кореневища видні трикутні широкі рубці від відмерлих листків, на нижній – численні дрібні круглі коричневі ямки, сліди коренів, які розташовані зигзагоподібно; злам нерівний, зернистий. Зовні кореневища жовтувато-коричневого або червонувато-коричневого кольору, іноді з сірувато-зеленим відтінком, на зламі – білувато-рожеві, іноді жовтуваті або зеленуваті.

В. На поперечних зрізах кореневища розпізнається епідерма з потовщеними, частково коркоподібними зовнішніми оболонками. Під епідермою – декілька шарів округлих клітин із рівномірно потовщеними оболонками і дрібними міжклітинниками. Решта основної тканини – запасаюча аеренхіма з великими повітроносними порожнинами. Клітини з крохмальними зернами округлі або овальні. Більші за розмірами кулясті клітини-ідіобласти містять золотаво-оранжеву ефірну олію. Кору від центрального циліндра відділяє ендодерма. У корі ближче до периферії зустрічаються маленькі пучки однорідної склеренхіми з кристалічною обкладкою або з флоемою усередині. Ближче до осевого циліндра провідні пучки закриті колатеральні, зі склеренхімною обкладкою. Пучки осевого циліндра центрофлоемні, без механічної обкладки. Розташовані безладно, під ендодермою щільно зближені або з'єднані по декілька.

У порошку розпізнаються фрагменти епідерми з поверхні аеренхіми, що містить клітини з крохмальними зернами, більші за розміром ефіроолійні клітини-ідіобласти і мережу дрібних паренхімних клітин з повітроносними порожнинами.

Зустрічаються шматочки поперечних і поздовжніх перерізів кореневища, фрагменти склеренхімних волокон з кристалами кальцію оксалату в обкладкових клітинах, обривки спіральних і драбинчастих судин, темні клітини з флобафенами і велика кількість крохмальних зерен.

С. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

Перегляд хроматограми у випробуванні «Азарон»

Результати: нижче наведено послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися й інші слабкі зони.

Верхня частина пластинки	
декілька рожево-червоних зон 	
декілька рожево-фіолетових зон	
<i>Азарон:</i> рожево-фіолетова зона 	<i>Азарон:</i> інтенсивна червоно-фіолетова зона
декілька жовто-коричневих зон та сіро-зелена зона	
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

ВИПРОБУВАННЯ

Азарон.

Випробовуваний розчин. До 1,0 г порошкоподібного препарату додають 10 мл метанолу Р. Нагрівають на водяній бані при 60 °С протягом 1 хв. Фільтрують.

Розчин порівняння. 15 мг СЗ азарону розчиняють у метанолі Р і доводять тим самим розчинником до 10 мл.

Пластинка: ТШХ-пластинка із шаром силікагелю Р.

Рухома фаза: етилацетат Р – толуол Р (7 : 93).

Нанесення: випробовуваний розчин – 30 мкл, смугами; розчин порівняння

(0,50%), смугами.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 9 см від лінії старту.

Висушування: на повітрі.

Виявлення: обробляють *анісового альдегіду розчином Р*, нагрівають при температурі від 100 до 105 °С протягом 5-10 хв та переглядають при денному світлі.

Результати: на хроматограмі випробовувана зона азарону має бути не інтенсивнішою за відповідну зону на хроматограмі розчину порівняння (не більше 0,5 %).

Сторонні домішки (2.8.2). Кореневищ, погано очищених від коренів і залишків листя – не більше 5 %; кореневищ, побурілих на зламі – не більше 5 %; органічних домішок – не більше 1 %; мінеральних домішок – не більше 2%.

Втрата в масі при висушуванні (2.2.32). Не більше 14 %. 1,000 г здрібненої на порошок (1000) (2.9.12) сировини сушать при температурі 105 °С.

Загальна зола (2.4.16). Не більше 6 %.

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Визначення проводять, як зазначено у статті (2.8.12).

Наважку подрібнених кореневищ лепехи (355) у кількості близько 10 г поміщають у круглодонну колбу на 500 мл із притертим шліфом, додають 200 мл *води Р* як дистиляційну рідину, приєднують устаткування для перегонки ефірних олій та додають 0,5 мл *ксилолу Р* у градуйовану трубку. Контролюють температуру постійного повільного кипіння суміші, час перегонки складає близько 1,5 год.

2) Випробування проводять методом рідинної хроматографії відповідно до вимог ДФУ 2.0, монографія 2.2.29.

Випробовуваний розчин. 200 мг (точна наважка) екстракту поміщають у конічну колбу місткістю 100 мл, розчиняють у 60 мл *метанолу Р*, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки та перемішують.

Розчин порівняння. 10,0 мг (точна наважка) *СЗ α-азарону* поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняють у 80 мл *метанолу Р*, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки та перемішують.

10,0 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки та перемішують.

Перед хроматографуванням розчини фільтрують крізь мембранний фільтр з розміром пор не більше 0,45 мкм. Хроматографують поперемінно розчин порівняння і випробовуваний розчин.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі зі спектрофотометричним детектором за таких умов:

– колонка розміром 250 x 4,0 мм, заповнена *силікагелем для хроматографії октадецилсилільним P* (наприклад, Purospher® STAR RT-18e, Hibar, фірми «Merck») з розміром частинок 5 мкм, або аналогічна, для якої виконуються умови придатності хроматографічної системи:

рухома фаза: *вода для хроматографії P – ацетонітрил P* (40 : 60);

швидкість рухомої фази: 1,0 мл/хв;

температура колонки: 25°C;

детектування при довжині хвилі 303 нм;

об'єм інжекції: 20 мкл.

Час хроматографування складає 1,8 від часу утримання β-азарону.

Ідентифікація β-азарону: для ідентифікації β-азарону використовується відносні часи утримання характерних піків (α-азарону – 1,00, β-азарону – 0,92).

Хроматографічна система вважається придатною, якщо виконуються такі умови:

- коефіцієнт розділення піків α-азарону і β-азарону – не менше 1,2;
- коефіцієнт симетрії для піків α-азарону і β-азарону має бути від 0,7 до 1,5.

Вміст (X_1) азарону у відсотках, у перерахунку на α-азарон, обчислюють за формулою:

$$X_1 = \frac{S_{\alpha+\beta} \cdot m_0 \cdot 100 \cdot 10 \cdot P}{S_0 \cdot m_1 \cdot 100 \cdot 100} = \frac{S_{\alpha+\beta} \cdot m_0 \cdot P}{S_0 \cdot m_1 \cdot 10},$$

де $S_{\alpha+\beta}$ – середнє значення суми площ піків α-азарону і β-азарону випробовуваного розчину, розраховане з хроматограм випробовуваного розчину;

S_0 – середнє значення площ піків α-азарону, розраховане за хроматограмами

розчину порівняння;

m_1 – маса наважки екстракту, в мг;

m_0 – маса наважки ФСЗ α -азарон, взята для приготування розчину порівняння, у мг;

P – вміст основної речовини у ФСЗ α -азарон, взятий для приготування розчину порівняння, у %.

Вміст азарону має бути не більше 0,5 %.

4.6 Проєкт методу контролю якості «Лепехи листя»

Відповідно до отриманих результатів (розд. 4.2.2) розроблено проєкт МКЯ «Лепехи листя», що наведено в табл. 4.12.

Таблиця 4.12

Проєкт МКЯ «Лепехи листя»

Показник	Допустимі межі	Методи контролю
1	2	3
Опис	Частково порізане до розміру 2-3 см та висушене листя, з незначними домішками стебел та квіток.	За п. 1 Візуально, органолептично
Ідентифікація	А. Сегменти листка мають лінійну форму. Частинки зморшкуваті, гофровані по краю. Листова пластинка сплюснута з боків, має жолобок і гостре ребро – кіль. Колір: поверхня бурувато-зелена, буро-коричнева, жовто-зелена, внутрішня частина біло-рожева, горбкувата. Запах характерний духмянний, смак гіркий.	За п. 2.1 Візуально, органолептично
	В. На поперечних зрізах розрізняються округлі клітини субепідермальної хлоренхіми, що містять хлорофілові й крохмальні зерна. Під хлоренхімою багато шарів клітин аеренхіми, які у поперечному розрізі округлі, а в поздовжньому – видовжені. Серед клітин	За п. 2.2 ДФУ*, 2.8.23 Мікроскопія

Продовж. табл. 4.12

1	2	3
	аеренхіми рівномірно розподілені більші за розміром округлі клітини-ідіобласти з блискучою кремуватою ефірною олією. Провідна система представлена жилками, які йдуть уздовж листової пластинки, зближуються біля її верхівки. Пучки оточені обкладкою з паренхіми. Більшість пучків супроводжують склеренхіма і дрібні кристалики кальцію оксалату. Великі колатеральні пучки чергуються з дрібними пучечками, у верхньому шарі аеренхіми. У великих пучках є судини, а у флоємі – ситоподібні трубки. На зрізах пластинки в ділянці кіля серед провідних пучків хлоренхіми виділяються більший за розмірами колатеральний судинно-волокнистий пучок прокамбіального походження і 3-4 (іноді 6-8) дрібних пучечків. Ксилема орієнтована до абаксальної поверхні, обкладка пучків паренхімна. Бічні оболонки клітин тонкі, зовнішні – вкриті тонким шаром кутикули. Продихи парацитні або тетрацитні, знаходяться на одному рівні з епідермальними клітинами, розміщуються рядами вздовж осі листка між жилками, які супроводжуються кристалами кальцію оксалату.	
	С. На хроматограмі випробовуваного розчину, отриманого при випробуванні «Азарон», зона азарону має відповідати відповідній зоні на хроматограмі розчину порівняння	За п. 3 ДФУ*, 2.2.27 Метод ТПХ
Випробування		
Азарон	На хроматограмі випробовувана зона азарону має бути не інтенсивнішою за відповідну зону на хроматограмі розчину порівняння (не більше 0,5%)	За п. 3 ДФУ*, 2.2.27 Метод ТПХ

Продовж. табл. 4.12

1	2	3
Сторонні домішки – листки, що втратили колір – органічні домішки – мінеральні домішки	Не більше 5% Не більше 2% Не більше 1%	За п. 4 ДФУ*, 2.8.2
Втрата в масі при висушуванні	Не більше 14,0 %	За п. 5 ДФУ*, 2.2.32
Загальна зола	Не більше 10,0 %	За п. 6 ДФУ*, 2.4.16
Зола, нерозчинна в HCl	Не більше 5,0 %	За п. 7 ДФУ*, 2.8.1
Вміст ефірної олії	Не менше 10 мл/кг у перерахунку на суху сировину	За п. 8.1 ДФУ*, 2.8.12
Вміст суми флавоноїдів	Не менше 1,0 % у перерахунку на гіперозид і суху сировину	За п. 9.1 ДФУ*, 2.2.25

Примітка. * – Державна фармакопея України чинного видання.

Висновки до розділу 4

1. Досліджено морфолого-анатомічну будову надземних та підземних вегетативних органів лепехи звичайної. Виявлено основні мікроскопічні діагностичні ознаки листя вітчизняної сировини: основна тканина – аеренхіма з рівномірно розподіленими округлими клітинами-ідіобластами з блискучою кремуватою ефірною олією; великі колатеральні пучки чергуються з дрібними пучечками, що проходять у верхньому шарі аеренхіми; продиhi парацитні або тетрацитні, знаходяться на одному рівні з епідермальними клітинами,

розміщуються рядами вздовж осі листка між жилками, які супроводжуються кристалами кальцію оксалату.

2. Визначено показники якості кореневищ лепехи, заготовлених у різних регіонах України відповідно до вже існуючих монографій на цю ЛРС. Отримані дані використані при розробці монографії ДФУ «Лепехи кореневища^N». Розроблено МКЯ «Лепехи звичайної листя».

3. Встановлено оптимальні терміни заготівлі листя лепехи звичайної, виходячи з динаміки накопичення БАР – період масового цвітіння.

4. Визначено основні показники якості надземної частини лепехи звичайної.

5. Розроблено методику ідентифікації лепехи звичайної за наявністю азарону методом ТШХ. Підтверджено наявність цієї сполуки в усіх вітчизняних зразках листя і кореневищ рослини.

6. Розроблено методики кількісного визначення азарону методом ВЕТШХ.

7. Уперше розроблено методику ідентифікації сировини лепехи звичайної та визначення граничного вмісту азарону в лікарській сировині та лікарських рослинних засобах методом ТШХ. За матеріалами дослідження оформлено патент України на корисну модель № 133674 «Спосіб ідентифікації кореневищ лепехи звичайної з подальшим визначенням граничного вмісту азарону».

8. Розроблено та валідовано методику кількісного визначення азарону в сировині лепехи звичайної та лікарських рослинних засобах методом ВЕРХ. За результатами визначення валідаційних характеристик установлено, що методику можливо використати для контролю якості сировини.

9. Визначено, що вміст азарону в усіх досліджуваних зразках сировини вітчизняних зразків лепехи не перевищує 0,5 %.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Підходи до розробки монографії «Лепехи звичайної кореневища^N» для включення у Державну фармакопею України / М. С. Яременко, Т. М. Гонтова, Л. М. Сіра, Е.Е. Котова, А.Г. Котов. *Управління, економіка та забезпечення якості в*

фармації. 2017. № 1 (49). С. 22–26.

2. Yaremenko M. S., Gontova T. M., Mashtaler V. V., Kotova E. E., Kotov A. G. Development of method for identification and determination of limit content of asarone in *Acorus Calamus* rhizomes. *Research J. Pharm. and Tech.* 2018. Vol. 11 (6). P. 2263–2266.

3. Спосіб ідентифікації кореневищ лепехи звичайної з подальшим визначенням граничного вмісту азарону : пат. 133674 України. № u201805081 ; заявл. 05.08.2018 ; опубл. 25.04.2019, бюл. №8.

4. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Котова Е. Е. Терміни заготівлі листя лепехи звичайної (*Acorus Calamus* L.) : інформ. лист № 367-2018 / Український центр наукової медичної інформації та патентоліцензійної роботи (Укрмедпатентінформ). Київ, 2018. Вип. 40. (Рішення ЕПК “Фармація” Протокол № 104 від 24.10.2018 р.).

5. Яременко М. С., Гонтова Т. М. Контроль якості препаратів на основі лепехи звичайної. *Матеріали V науково-практичної конференції Школи молодих науковців ПАТ «Фармак»*. Київ, 2017 С. 49–51.

6. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Котова Е. Е. Використання фармакопейних методик при вивченні флавоноїдів в сировині лепехи звичайної. *Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій* : тези доп. Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяч. 80-річчю з дня народж. д-ра. фармац. наук, проф. О.М. гайдукевича (12-13 квіт. 2018 р.). Харків : НФаУ, 2018. С. 313–314.

7. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Котова Е. Е. Перспективи застосування денситометрії при визначенні кількісного вмісту азарону в кореневищах лепехи звичайної. *Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку* : матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяч. 20-й річниці заснування Дня фармац. працівника України, м. Харків, 19-20 верес. 2019 р. : у 2 т. / редкол. : А. А. Котвіцька та ін. Харків : НФаУ, 2019. Т. 1. С. 281–282.

8. Yaremenko M. S., Gontova T. M. Quantification of asarone in *Acorus calamus* by RP-HPLC. *Science and modern pharmaceutical manufacturing* : VII Annual scientific and practical conference of Farmak's School of young scientists with international

involvement, Kyiv, 21 November, 2019. Укр. Мед. Часопис. 2019. Т. 2, № 6 (134). P.16–17.

РОЗДІЛ 5. РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ ЕКСТРАКТІВ ІЗ СИРОВИНИ ЛЕПЕХИ ЗВИЧАЙНОЇ. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ БІОЛОГІЧНОЇ ДІЇ ЕКСТРАКТІВ

Розробка технології отримання екстрактів із рослинної сировини є складним і багатогранним процесом. Кожен з аспектів технології напряду впливає на якість кінцевого продукту.

5.1 Розробка технології отримання екстракту з кореневищ лепехи звичайної

Першим етапом розробки технології отримання екстракту з кореневищ лепехи звичайної був добір оптимальних умов екстрагування БАР із сировини. У ході дослідження обрано критерії і тип екстрагенту, ступінь подрібнення сировини, температуру екстракції, співвідношення сировини й екстрагенту, час екстракції та її тип. Усі умови добирали з використанням стандартизованої серії кореневищ рослини заготовленої в Київській обл. (серії № R-8) у 2015 році.

Для визначення суми екстрактивних речовин у кореневищах лепехи звичайної, як екстрагенти використовували *воду Р* та водно-етанольні розчини різної концентрації. Результати наведено на рис. 5.1.

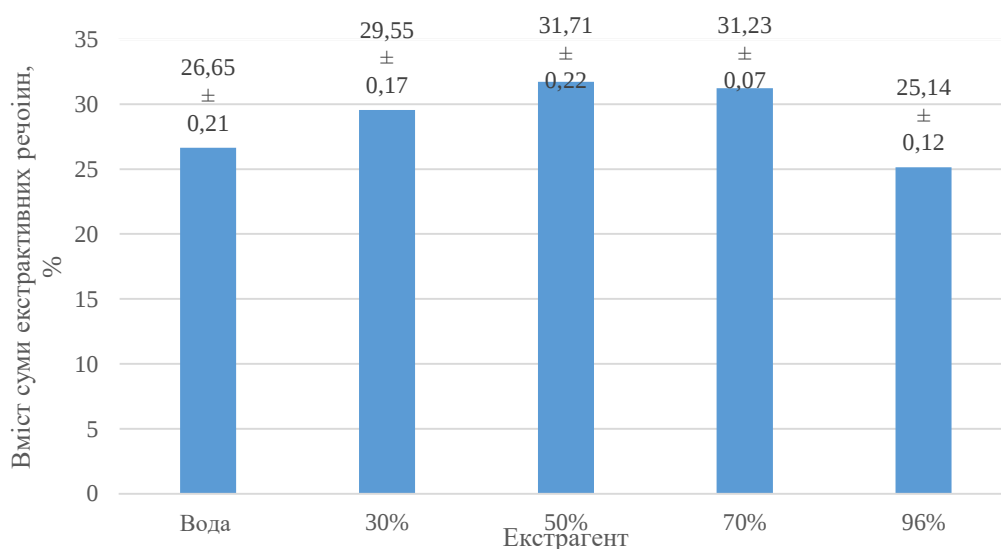


Рис. 5.1 Вміст суми екстрактивних речовин у кореневищах
залежно від виду екстрагенту (n = 3)

Екстрагування проводили при кімнатній температурі в захищеному від прямого сонячного проміння місці для максимального збереження компонентів ефірної олії. У результаті експерименту встановлено, що найбільшу кількість суми екстрактивних речовин вилучає 30, 50 та 70 % етанол ($29 \pm 0,17$; $31,71 \pm 0,22$ та $31,23 \pm 0,07$ % відповідно). Щоб визначити найбільш оптимальний екстрагент, проведено дослідження якісного складу витяжок за допомогою ТШХ методики (розд. 4.4.2), використовуючи рухому фазу толуол Р – етилацетат Р (93 : 7), що дозволяє оцінити вилучення азарону та інших компонентів ефірної олії лепехи звичайної. Для цього 1,0 мл витяжки розводили 10,0 мл *метанолу Р* та наносили на хроматографічну пластинку в аліквоті 30 мкл. Результати хроматографування наведено на рис. 5.2.

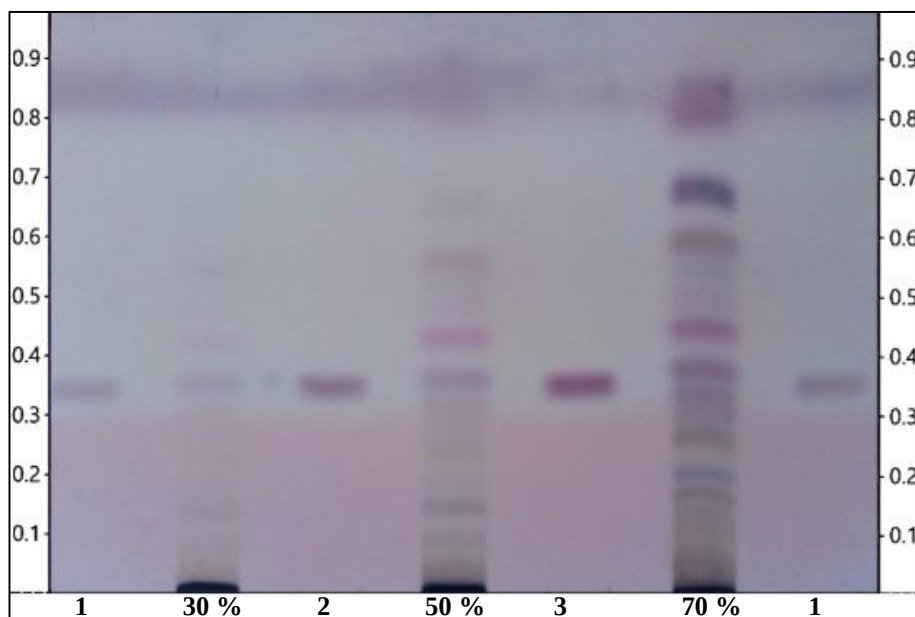


Рис. 5.2 Хроматограма дослідження якісного складу витягів з кореневищ лепехи звичайної: 1 – 0,25% розчин СЗ азарону; 2 – 0,5% розчин СЗ азарону; 3 – 0,75% розчин СЗ азарону; 30, 50, 70 % – досліджувані розчини відповідних витяжок

Як видно з результатів хроматографування, серед обраних витяжок зберігається чітка тенденції до збільшення кількісного вмісту індивідуальних речовин разом зі збільшенням концентрації етилового спирту. Хроматограма витяжки з 70 % спирту етилового має найбільшу кількість хроматографічних зон зі значно вищою інтенсивністю забарвлення, що свідчить про більшу концентрацію

виявлених речовин. Варто відзначити, що вміст азарону в усіх витяжках не перевищує 0,5 %. У подальшому як екстрагент використовували 70 % етанол.

При визначенні оптимального ступеня подрібнення кореневищ лепехи звичайної отримано 5 серій витяжок. Сировину подрібнювали та за допомогою сит розділяли залежно від ступеня подрібнення на 5 фракцій: від 5 до 10 мм (4 фракція), від 2 до 5 мм (3 фракція), від 1 до 2 мм (2 фракція), менше 1 мм (1 фракція). 5 фракція складалась із сировини різного розміру (але не більше 15 мм), імітуючи фасовані подрібнені кореневища лепехи звичайної, які можна придбати на фармацевтичному ринку України. Витяжки отримували шляхом настоювання наважки сировини протягом 1 години при кімнатній температурі з наступною фільтрацією крізь паперовий фільтр «синя стрічка». Співвідношення сировина-екстрагент 1:5. Після чого в отримуваних фільтрах визначали сухий залишок за методикою ДФУ 2.8.16 «Визначення сухого залишку екстрактів» [167]. Результати наведено на рис. 5.3.

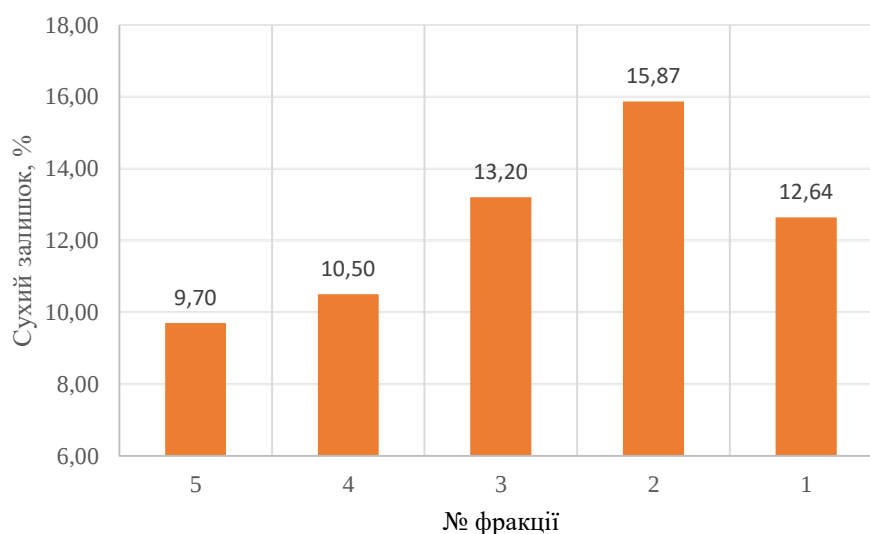


Рис. 5.3 Сухий залишок витяжок при використанні сировини різного ступеня подрібнення

Відповідно до результатів експерименту можна зробити висновок, що зі зменшенням розміру частинок сировини збільшується екстракція БАР речовин за рахунок збільшення поверхні контакту екстрагенту із сировиною та легшою екстракцією речовин. Найменшу кількість сухого залишку витяжок виявлено у 5 серії (9,70 %), в якій розмір частинок був найбільший (не більше 15 мм). Показник

сухого залишку був максимальний у серії 2 (розмір частинок від 1 до 2 мм) – 15,87 %. При подальшому зменшенні розміру частинок сировини спостерігалось значне зменшення показника сухого залишку витяжок.

Дослідження впливу часу екстрагування на вихід БАР проводили за наступних умов: розмір часток сировини від 1,0 до 2,0 мм, співвідношення сировина-екстрагент 1:5, екстрагент – 70 % етанол. Для дослідження оптимального часу екстрагування обрано 6 часових проміжків: 1, 2, 4, 8, 12 і 24 години. Результати наведено на рис. 5.4.

Як видно з отриманих результатів, при збільшенні часу екстрагування

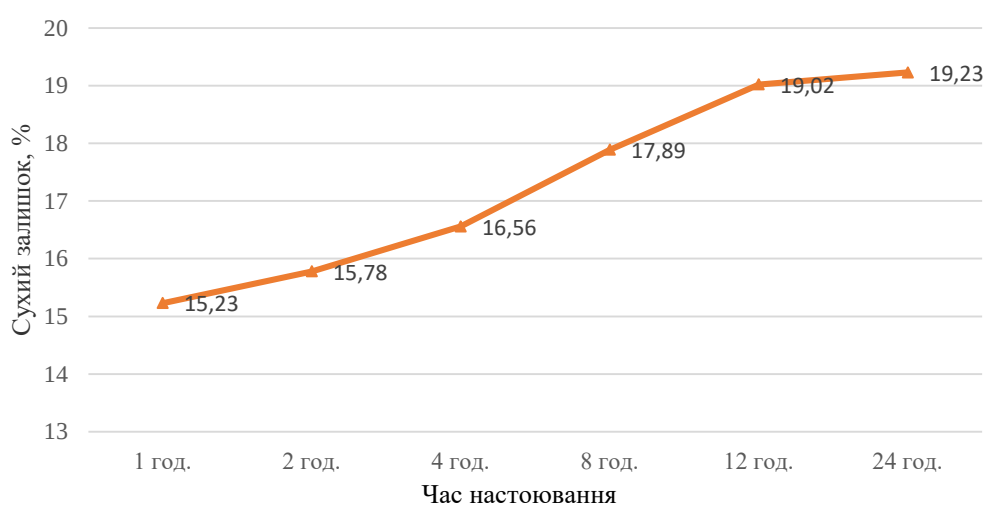


Рис. 5.4 Сухий залишок витяжок при різному часі екстрагування

збільшується і показник сухого залишку витяжок. При цьому варто відзначити, що після 12 годин екстрагування значно уповільнюється ріст досліджуваного показника. Так, при екстрагуванні БАР 70 % етиловим спиртом протягом 12 годин сухий залишок складає 19,02 %, а протягом 24 годин – всього 19,23 %, що при збільшенні часу екстрагування вдвічі дало приріст всього на 0,19 %. Враховуючи отримані результати, настоювання сировини з екстрагентом вирішено проводити протягом 12 годин, що при невеликому зменшенні виходу БАР дозволить значно пришвидшити час отримання екстракту.

Завершальним етапом розробки технології отримання екстракту з кореневищ лепехи звичайної було визначення оптимального методу екстракції. Отримання рідкого екстракту кореневищ лепехи звичайної проводили методом реперколяції,

оскільки цей метод дозволяє отримувати рідкий екстракт у співвідношенні 1 : 1 без додаткового упарювання проміжних витяжок, що сприяє збереженню максимальної кількості компонентів ефірної олії. Як екстрагент використовували 70 % етанол. Екстрагування проводилось з використанням трьох перколяторів. У кожний із перколяторів завантажено однакову кількість подрібнених кореневищ лепехи звичайної. Ступінь подрібнення – від 1 до 2 мм.

Процес екстракції проводили в декілька етапів. На першому етапі в перший перколятор заливався екстрагент у десятикратному обсязі від маси завантаженої сировини. Далі йшов етап настоювання, що тривав 12 годин. На цьому етапі для мінімізації втрат екстрагенту чи легколетких діючих речовин настоювання проводили при температурі 20-25 °С у щільно закупореному перколяторі. Після чого зливу витяжку з першого перколятора переносили в другий перколятор. У перший перколятор заливали свіжий екстрагент в об'ємі, що становило півтори маси завантаженої сировини. Далі відбувався етап настоювання. Екстрагування закінчували після того, як отримували три витяжки з останнього перколятора. Витяжки відстоювали при температурі 4–8 °С протягом доби та об'єднували шляхом декантування у відповідну тару з темного скла. Таким чином була отримана спиртова витяжка у співвідношенні сировина – екстрагент 1 : 1 [207].

5.2 Розробка технології отримання екстракту з листя лепехи звичайної

Для визначення оптимальних умов екстрагування та розробки технології отримання рідкого екстракту з листя лепехи звичайної використовували сировину, заготовлену в Харківській обл., сел. Камплиця (серія № 3-d.f). Вміст флавоноїдів у сировині був на рівні $1,30 \pm 0,02$ % у перерахунку на гіперозид та суху сировину. Вміст ефірної олії – $1,04 \pm 0,02$ % у перерахунку на суху сировину.

При розробці технології отримання екстракту з листя використовували напращування, отримані при розробці екстракту з кореневищ. Екстракцію проводили в перколяторі при співвідношенні сировина-екстрагент 1 : 5. Після додавання екстрагенту перколятор щільно закривали та залишали в захищеному від

прямих сонячних променів місці за кімнатної температури. Після екстрагування витяжки відстоювали протягом 24 годин при температурі 8 °С, після чого фільтрувалися крізь паперовий фільтр «синя стрічка».

Ступінь вилучення діючих речовин визначали за двома параметрами: сухим залишком витяжки після випарювання і кількісним вмістом суми флавоноїдів у перерахунку на гіперозид.

На першому етапі роботи визначено вміст суми флавоноїдів та сухий залишок залежно від типу екстрагенту. Як екстрагенти використовували воду та етанол у концентрації 30, 50, 70 та 96 %. Ступінь подрібнення сировини був у межах 3-5 мм. Час екстрагування – 30 хв. Результати наведено на рис. 5.5-6.

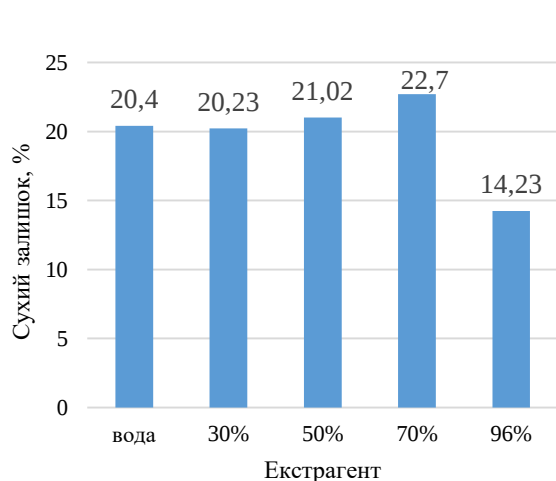


Рис. 5.5 Сухий залишок витяжок при використанні різних типів екстрагенту

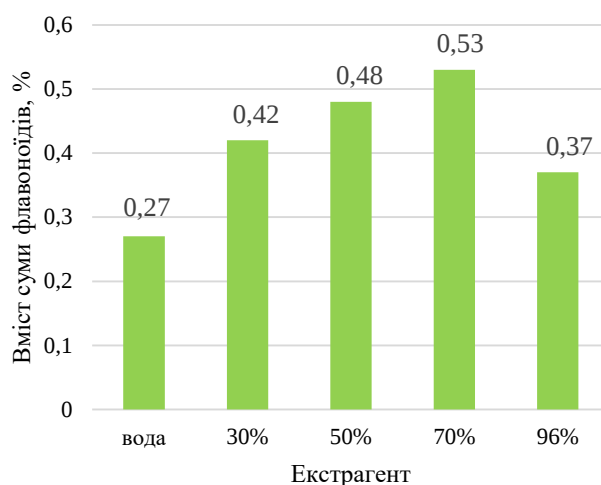


Рис 5.6 Вміст суми флавоноїдів витяжок при використанні різних типів екстрагенту

Примітка. 30, 50, 70, 96 % – концентрація етилового спирту.

У ході проведення досліджень з визначення оптимального екстрагенту виявлено, що за вилученням суми флавоноїдів, безперечно, кращим екстрагентом був 70 % етанол (0,53 % флавоноїдів у перерахунку на гіперозид). Тому в подальшому як екстрагент обрано саме 70 % етанол [208].

На другому етапі роботи досліджено вплив подрібнення сировини на екстракцію біологічно активних речовин. Сировина була подрібнена та просіяна через набір сит для відокремлення 5 фракцій: менше 0,5, 0,5-1, 1-2, 2-3 та 3-5 мм. Екстрагент – 70 % етанол. Час екстрагування – 30 хв (рис. 5.7 і 5.8).

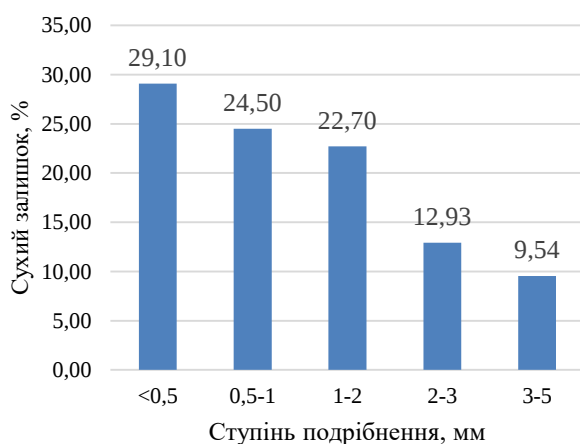


Рис. 5.7 Сухий залишок витяжок, отриманих із сировини різного розміру

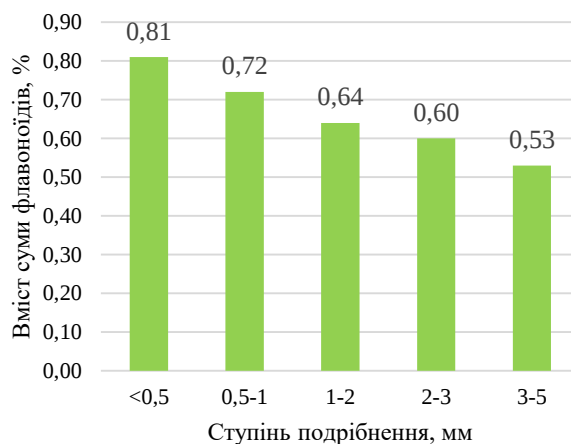


Рис 5.8 Вміст суми флавоноїдів витяжок, отриманих із сировини різного розміру

При розмірах частинок сировини менше 0,5 мм спостерігали найбільше значення кількісного вмісту суми флавоноїдів – 0,81 % і найбільший вміст сухого залишку – 29,10 %. Проте використання сировини з розміром частинок менше 0,5 мм супроводжується деякими технологічними проблемами. По-перше, за рахунок високої щільності при укладанні сировини погіршується її змочуваність у внутрішніх та нижніх шарах. По-друге, крім біологічно активних речовин, у витяжки у значній кількості переходять баластні речовини та частинки сировини. Це зумовлює потребу в додатковому очищенні витяжки. Тому, на нашу думку, оптимальним є використання сировини з розміром частинок від 0,5 до 1,0 мм [208].

Визначення оптимального часу настоювання проводили у таких часових проміжках: 30 хв, 1, 2, 4, 8, 12 та 24 год. Результати наведено на рис. 5.9.

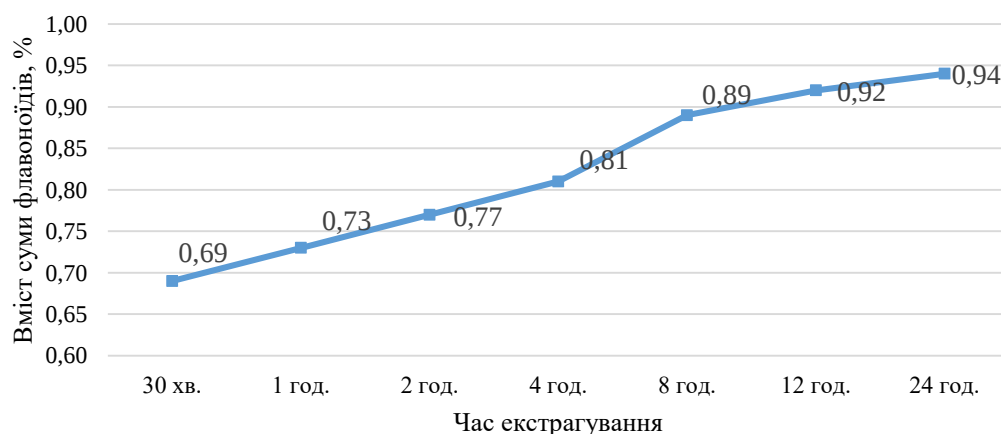


Рис. 5.9. Вміст суми флавоноїдів залежно від часу екстракції

Як видно з отриманих результатів, максимальна екстракція спостерігається при режимі настоювання 24 годин і складає 0,94 %. Після 8-годинного настоювання спостерігали значне зменшення виходу БАР.

Наступним етапом нашої роботи була розробка оптимальної методики отримання екстракту листя лепехи звичайної. За досвідом, отриманим при розробці технології одержання рідкого екстракту кореневищ, оформлено патент на корисну модель № 133674 від 25.11.2019 р. (додаток В) та заявку винахід № а201906407 від 10.06.2019 р. «Спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу на основі рослинної сировини з протизапальною дією», де викладено технологічні прийоми отримання рідкого екстракту листя лепехи звичайної [210]. На завершальному етапі нашої роботи визначено технологічних параметрів сировини лепехи звичайної листя (табл. 5.1).

Таблиця 5.1

Результати визначення технологічних параметрів листя лепехи звичайної

Технологічний параметр	Значення
Ступінь подрібнення, мм	0,5-1,0
Питома маса, г/см ³	1,03
Об'ємна маса, г/см ³	0,24
Насипна маса, г/см ³	0,10
Пористість	0,69
Порізність	0,74
Вільний об'єм шару	0,92
Втрата в масі при висушуванні, %	9,70
Коефіцієнт поглинання екстрагенту, мл/г	3,30

Результати будуть використані при наступному масштабуванні технології отримання екстракту листя лепехи звичайної.

5.3 Вивчення якісного складу та кількісного вмісту основних БАР

Першим етапом дослідження отриманих екстрактів було визначення основних технологічних параметрів, таких, як: відносна густина, рН екстрактів, сухий залишок екстрактів, вміст етанолу і температура кипіння [167] (табл. 5.2).

Таблиця 5.2

Технологічні властивості рідких екстрактів листя та кореневищ (n = 5)

Параметр	Значення в екстракті	
	Листя	Кореневища
Відносна густина, г/см ³	0,8375 ± 0,0017	0,8629 ± 0,0010
pH	5,47 ± 0,05	5,71 ± 0,07
Сухий залишок, %	26,14 ± 0,15	21,65 ± 0,29
Вміст етанолу, %	62,80 ± 0,08	66,50 ± 0,05
Температура кипіння, °C	76,8 ± 0,2	77,5 ± 0,4

В ході дослідження виявлено, що загалом отримані значення за усіма досліджуваними параметрами для обох екстрактів досить схожі, що пояснюється схожістю технології отримання та подібним хімічним складом надземної та підземної частин рослини. Варто відзначити, що вміст етанолу в екстракті листя менший, ніж в екстракті кореневищ (62,80 і 66,50 % відповідно), що, ймовірно, пов'язано з більш тривалим часом отримання екстракту. Відсоток сухого залишку в екстракті листя був вище – 26,14 %, ніж в екстракті з кореневищ – 21,65 % [207].

5.3.1 Сполуки фенольної природи

Попереднє дослідження кількісного вмісту суми флавоноїдів у перерахунку на гіперозид проводили відповідно до методики, описаної в розд. 2.2.1. Визначити цей показник в екстракті кореневищ не вдалося через відсутність характерного максимуму поглинання при довжині хвилі 410 нм (рис. 5.10).

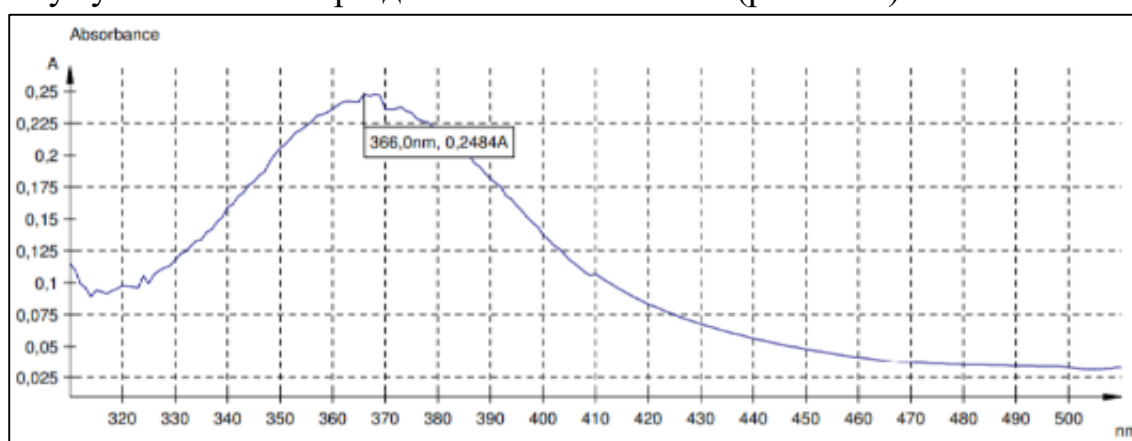


Рис. 5.10 Спектр поглинання випробовуваного розчину екстракту кореневищ при дослідженні вмісту суми флавоноїдів

За отриманими результатами вміст суми флавоноїдів був на рівні $0,83 \pm 0,03$ ($n = 3$, $p \leq 0,05$) в екстракті листя.

З огляду на отримані результати подальше дослідження якісного складу та кількісного вмісту сполук фенольної природи проводили методом ВЕРХ (розд. 2.1) в екстракті листя рослини. У ході дослідження ідентифіковано 10 речовин (додаток В, рис. В.1). Результати наведено в табл. 5.3

Таблиця 5.3

**Якісний склад та кількісний вміст сполук фенольної природи в екстракті
листя лепехи звичайної ($n = 3$)**

Сполука	Вміст, мкг/мл
1	2
Хлорогенова кислота	$0,541 \pm 0,001$
Кофейна кислота	$3,108 \pm 0,125$
Ізоорієнтін	$164,427 \pm 5,728$
Робінін	$391,787 \pm 10,952$
Трифолін	$68,880 \pm 1,573$
Апігенін-7-глюкозид	$4,732 \pm 0,173$
Рутин	$105,335 \pm 2,754$
β -Азарон	$1188,321 \pm 20,415$
Акацетин	$15,474 \pm 0,374$
α -Азарон	$134,864 \pm 4,726$
Сума всіх ідентифікованих сполук	2077,469

Серед ідентифікованих речовин визначено дві гідроксикоричні кислоти: кофейна та хлорогенова; 6 флавоноїдів: акацетин, апігенін-7, трифолін, рутин, робінін, ізоорієнтин та фенольні сполуки – α - і β -азарони. Домінували: β -азарон (1188,321 мкг/мл), робінін (391,787 мкг/мл) та ізоорієнтин (164,427 мкг/мл). Кількісний вміст усіх ідентифікованих компонентів – 2077,469 мкг/мл.

5.3.2 Дослідження антирадикальної активності

Визначення антирадикальної активності отриманих екстрактів проводили

відповідно до описаної методики (розд. 2.2.1). Ідентифікацію АРА у випробовуваних розчинах реєстрували при довжині хвилі 650 нм. Антиоксидантну активність екстрактів оцінювали шляхом порівняння їх активності зі стандартом Тролоksom (Trolox), що є водорозчинним аналогом вітаміну С. Результати визначення АРА окремих сполук наведено в табл. 5.4

Таблиця 5.4

Дослідження компонентів екстрактів листя та кореневищ лепехи звичайної, що виявляють антирадикальні властивості

Екстракт кореневищ			Екстракт листя		
Сполука	Час утримання	ТЕАЄ*, мкг/мл	Сполука	Час утримання	ТЕАЄ*, мкг/мл
1	2	3	4	5	6
н/і	3,535	9,77	н/і	2,166	1,29
н/і	4,277	2,01	н/і	3,518	2,73
н/і	6,237	9,53	н/і	4,284	1,04
н/і	7,906	7,69	Хлорогенова к-та	9,244	4,37
н/і	9,220	4,55	н/і	10,025	1,24
н/і	10,470	2,31	н/і	14,080	13,52
н/і	11,472	2,74	Робінін	17,997	32,65
н/і	10,781	3,96	Ізоорієнтин	16,784	19,70
н/і	12,064	4,53	н/і	18,588	8,96
н/і	12,459	2,01	н/і	19,415	38,76
н/і	13,406	24,13	Рутин	21,969	39,35
н/і	14,445	3,92	н/і	23,488	28,46
н/і	15,152	6,94	н/і	25,260	35,95
н/і	16,013	12,00	н/і	26,601	6,45
н/і	17,039	5,87	Трифолін	28,305	3,82
н/і	18,958	6,67	н/і	30,237	1,56
н/і	22,037	2,28	н/і	30,990	2,83
н/і	22,571	1,24	Апігенін-7-глюкозид	32,363	3,15
н/і	24,186	1,82	н/і	38,027	0,94
н/і	29,001	18,18	н/і	42,740	1,34

Продовж. табл. 5.4

1	2	3	4	5	6
н/і	42,620	4,34			
н/і	45,304	1,62			
н/і	46,310	7,78			
н/і	50,964	3,39			
н/і	51,409	1,03			
н/і	51,733	0,30			
н/і	52,369	0,89			
н/і	55,373	1,73			
н/і	55,850	0,76			
н/і	58,483	1,81			
н/і	63,354	2,71			
Сума всіх сполук		158,53			248,13

Примітка. н/і – не ідентифіковано.

У ході дослідження в екстракті кореневищ виявлено 31 сполуку, з антирадикальною активністю, окремі речовини не ідентифіковано (дод. В, рис. В.2). Дослідження екстракту листя лепехи звичайної виявило, що активність стосовно зв'язування вільних радикалів виявили 20 сполук, з яких ідентифіковано 6: хлорогенова кислота, ізоорієнтин, робінін, рутин, трифолін та апігенін-7-глюкозид (дод. В, рис. В.3).

Як видно з наведених результатів аналізу, екстракт листя лепехи звичайної виявляє значно вищу антирадикальну активність порівняно з екстрактом кореневищ (248,13 і 158,53 мкг/мл відповідно). В екстракті надземної частини рослини найбільший внесок у АРА зробили рутин (39,35 мкг/мл), робінін (32,65 мкг/мл), та неідентифіковані речовини з часом утримання 19,415, 23,488 та 25,260 хв (38,76, 28,46 та 35,95 мкг/мл відповідно). У 31 сполуки, що виявляють АРА, лише три мають значення ТЕАЄ вище 10 мкг/мл: неідентифікована речовина з часом утримання 13,406, 16,013 та 29,001 хв (24,13, 12,00 та 18,18 мкг/мл відповідно).

5.3.3 Визначення летких речовин

Визначення якісного складу летких речовин в екстрактах листя та кореневищ лепехи звичайної проводилося методом ГХ-МС детектуванням відповідно до методики, описаної в розділі 2.2.1 (метод 2). Результати дослідження якісного складу летких компонентів, наявних в екстрактах лепехи звичайної, наведено в табл. 5.5 (додаток В, рис. В.4-5).

Таблиця 5.5

Дослідження якісного складу летких речовин в екстрактах листя та кореневищ лепехи звичайної

Сполука	Екстракт	
	Листя	Кореневищ
1	2	3
Ліналоол	+	—
(+)-2-Борнанон	+	+
Ізоборнеол	+	—
Аромадрен	+	—
Спіро[4,5]декан-7-он, 1,8-диметил-4	+	—
Лінолелаїдова кислота	+	—
Арахідиловий спирт	+	—
β-Маалієн (1,1,3а,7-тетраметил-1а,2,3,3а,4,5,6,7b-октагідро-1H-циклопропа[а]нафтален)	—	+
β-Калакорон (4-ізопропіл-6-метил-1-метилен-1,2,3,4-тетрагідронафтален)	—	+
Епішиобунон ((2R,3R,6S)-6-ізопропіл-3-метил-2-(проп-1-ен-2-іл)-3-вінілциклогексанон)	—	+
Ізошиобунон ((3S,6S)-6-ізопропіл-3-метил-2-(пропан-2-іліден)-3- вінілциклогексанон)	—	+
Неролідол	—	+
(-)-Спатуленол	—	+
γ-Азарон	—	+

Примітка. (+) – ідентифіковано; (–) – не ідентифіковано.

В результаті дослідження летких речовин в екстракті листя лепехи звичайної ідентифіковано 7 сполук: ліналоол, (+)-2-борнанон, ізоборнеол, аромадрен, спіро[4,5]декан-7-он, 1,8-диметил-4, лінолелаїдова кислота та арахідиловий спирт. В екстракті кореневищ лепехи ідентифіковано 8 сполук: (+)-2-борнанон, β -маалієн, β -калакорон, епішиобунон, ізошиобунон, неролідол, (-)-спатуленол та γ -азарон.

5.3.4 Ідентифікація, визначення граничного та кількісного вмісту азарону

Приготування випробовуваного розчину відбувалося таким чином: 1,00 г (точна наважка) випробовуваного екстракту кореневищ або листя лепехи звичайної поміщали у мірну колбу місткістю 5 мл, розчиняли у *метанолі Р* і доводили об'єм розчину тим самим розчинником до позначки. Наносили розчини на хроматографічну пластинку смугами по 15 мкл. Після хроматографування пластинки обробляли розчином *анісового альдегіду Р*, нагрівали за температури 100 – 105 °С та переглядали за денного світла (рис. 5.11).

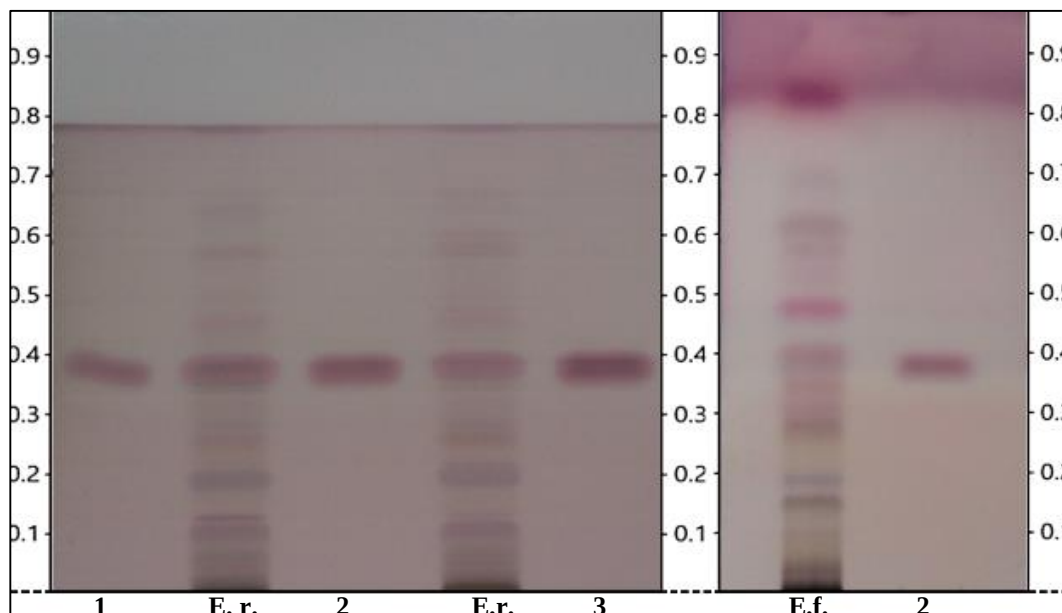


Рис. 5.11 Хроматограми ідентифікації та визначення граничного вмісту азарону в екстрактах: E.r – досліджуваний розчин екстракту кореневищ;

E.f – досліджуваний розчин екстракту листя; 1 – 0,25% розчину СЗ

азарону; 3 – 0,5% розчин СЗ азарону; 5 – 0,75% розчин СЗ азарону

Як видно з наведених результатів хроматографування рідких екстрактів

лепехи звичайної, інтенсивність забарвлення та розмір зони азарону на хроматограмах випробовуваного розчину не перевищувала інтенсивності забарвлення та розмір зони азарону розчину стандарту (0,5 %).

Дослідження кількісного вмісту азарону в отриманих екстрактах проводилося методом ВЕРХ відповідно до розробленої та валідованої методики (розд. 4.4.3). Отримані в ході дослідження хроматограми наведені в додатку Г (рис. Г.6-7). За отриманими результатами кількісний вміст азарону (у перерахунку на α -азарон) в екстракті кореневищ лепехи звичайної знаходився на рівні 0,352 %. Вміст азарону (у перерахунку на α -азарон) в екстрактах листя лепехи звичайної – 0,16 %.

5.4 Стандартизація екстрактів

Відповідно до отриманих результатів дослідження якісного складу та кількісного вмісту БАР рідких екстрактів листя та кореневищ лепехи звичайної, ідентифікацію отриманих ЛРП вирішено проводити за наявності азарону [211].

5.4.1 Проєкт МКЯ рідкого екстракту кореневищ лепехи звичайної

Стандартизацію вирішено проводити за основними показниками, які використовуються для стандартизації кореневищ (табл. 5.6.).

Таблиця 5.6

Специфікація до проєкту МКЯ «Екстракт кореневищ лепехи звичайної»

Найменування показника	Допустимі межі	Методи контролю
1	2	3
Опис	Темно-коричнева в'язка рідина зі сильним специфічним ароматом та виражено пряно-гірким смаком	За п. 1 Візуально, органолептично
Ідентифікація	А. На хроматограмі випробовуваного розчину зона азарону має відповідати відповідній зоні на хроматограмі розчину порівняння.	За п. 2.1 ДФУ*, 2.2.27 Метод ТШХ

Продовж. табл. 5.6

1	2	3
	В. На хроматограмі випробовуваного розчину отриманого при випробуванні «Азарон» зона азарону має відповідати відповідній зоні на хроматограмі розчину порівняння.	За п. 2.2 ДФУ*, 2.2.29 Метод ВЕРХ
Випробування		
Етанол	Від 65 % (об/об) до 69 % (об/об).	За п. 3 ДФУ*, 2.9.10
Сухий залишок	Не менше 18,0 %	За п. 4 ДФУ*, 2.8.16 ^N
Вміст азарону	Не більше 0,5 % у перерахунку на α-азарон	За п. 5 ДФУ*, 2.2.29 Метод ВЕРХ

Примітка. ДФУ* – Державна фармакопея України діючого видання.

5.4.2 Проєкт МКЯ рідкого екстракту листя лепехи звичайної

За основу взято МКЯ для екстракту кореневищ рослини. Специфікація наведено в табл. 5.7.

Таблиця 5.7

Специфікація до проєкту МКЯ «Екстракт листя лепехи звичайної»

Найменування показника	Допустимі межі	Методи контролю
1	2	3
Опис	Рідина коричневого кольору із сильним специфічним ароматом та виражено пряно-гірким смаком.	За п. 1 Візуально, органолептично
Ідентифікація	А. На хроматограмі випробовуваного розчину зона азарону має відповідати відповідній зоні на хроматограмі розчину порівняння.	За п. 2.1 ДФУ*, 2.2.27 Метод ТШХ

Продовж. табл. 5.6

1	2	3
	В. На хроматограмі випробовуваного розчину отриманого при випробуванні «Азарон» зона азарону має відповідати відповідній зоні на хроматограмі розчину порівняння.	За п. 2.2 ДФУ*, 2.2.29 Метод ВЕРХ
Випробування		
Етанол	Від 60 % (об/об) до 69 % (об/об).	За п. 3 ДФУ*, 2.9.10
Сухий залишок	Не менше 20,0 %	За п. 4 ДФУ*, 2.8.16 ^N
Вміст суми флавоноїдів	Не менше 0,5 % у перерахунку на гіперозид і суху сировину	За п. 5.1 ДФУ*, 2.2.25
Вміст азарону	Не більше 0,5 % у перерахунку на α -азарон	За п. 5.2 ДФУ*, 2.2.29 Метод ВЕРХ

Примітка. ДФУ* – Державна фармакопея України діючого видання.

5.5 Дослідження біологічної дії

Попереднє дослідження біологічної дії отриманих з сировини лепехи звичайної проводили на базі кафедри фармакології Національного фармацевтичного університету під керівництвом д. мед. н., проф. Л. В. Деримедвідь.

З огляду на те, що сировина лепехи звичайної відповідно до літературних джерел може проявляти токсичні властивості, першочерговим завданням було визначення показників безпечності отриманих екстрактів. Проведено дослідження показника цитотоксичності екстрактів листя та кореневищ лепехи звичайної МТТ методом на клітини кісткового мозку. Оцінку цитотоксичності проводили шляхом визначення порушення клітинних мембран в тесті з трипановим синім. Виявлено, що екстракт кореневищ лепехи звичайної проявляє цитотоксичну дію в

концентраціях 0,03-1,65 г/мл, при контакті з клітинами червоного кісткового мозку щурів протягом 15 хв, збільшуючи кількість загинувих клітин на $0,48 - 1,56 \cdot 10^6$ у розрахунку на мл ($p < 0,05$). Результати дослідження токсичності екстракту листя лепехи звичайної свідчать, що екстракт не чинить негативного впливу на життєздатність клітин кісткового мозку щурів у всіх вивчених концентраціях [212].

Проведені додаткові дослідження зі дослідження напівлетальної дози екстракту листя лепехи звичайної встановило, LD_{50} даного фармакологічного препарату більше 5 г/кг. З огляду на це, екстракт можна віднести до V класу токсичності – практично нетоксичні речовини. В ході проведення морфологічних досліджень змін внутрішніх органів не встановлено [213].

В умовах експериментального субхронічного гепатиту проведено дослідження жовчогінних властивостей екстракту листя лепехи. Субхронічний гепатит викликали шляхом 4 денного введення суміші етанолу та тетрахлорметану. Жовчогінні властивості підтверджено, зокрема введення екстракту підвищує в 2,1 рази швидкість секреції жовчі (у порівнянні з контрольною групою). Відзначалося збільшення кількісного вмісту жовчних кислот та холестеролу жовчі в 1,3 та 1,4 разу відповідно [214].

Проведені дослідження психотропних та нейротропних властивостей екстракту листя лепехи виявили помірні актопротекторні та аналептичні властивості. Дослідження впливу екстракту в дозах 1 та 5 мл/кг на реакції лабораторних тварин (мишей) у тесті відкритого поля, іммобілізаційному тесті, перебіг тіопенталового наркозу та фізичну витривалість у тесті «плавання з навантаженням» виявили дозозалежний вплив на локомоторну, орієнтовно-дослідницьку активність та на м'язовий тонус мишей [215].

Дослідження протизапальної активності отриманого екстракту з листя рослини проводили на моделях карагенінового та гістамінового набряку лап щурів. При проведенні досліджень використовуючи карагенінову модель, всі піддослідні тварини розділено на 4 групи по 6 особин. Перша група – контрольна патологія, щури отримували дистильовану воду. У другій групі тваринам вводили екстракт у дозі 0,5 мл/кг. Тварини з третьої та четвертої групи отримували препарати

порівняння (диклофенак натрію у дозі 8 мг/кг та кверцетин у дозі 11 мг/кг відповідно) [209].

Карагеніновий набряк відтворювали шляхом субплантарного уведення 0,1 мл 1 % карагеніну («Fluka», Швейцарія) в праву задню лапу щурів. Набряк сприймався як ознака запалення, за розвитком якого спостерігали в динаміці через 30, 60, 90, 120, 180 та 240 хв, а також через 24 год, для чого вимірювали об'єм лап у см³ за допомогою цифрового плетизмометра Panlab (Іспанія) моделі LE 7500 версії V29/10/2014 [209].

Досліджуваний екстракт та препарати порівняння застосовували в лікувально-профілактичному режимі: внутрішньошлунково одноразово щоденно протягом 5 діб до моделювання запалення, останній раз за 1 год до ін'єкції карагеніну. Екстракт у досліджуваній дозі для зручності дозування попередньо розводили водою й вводили із розрахунку 0,5 мл на 100 г щура. Вибір диклофенаку натрію, як препарату порівняння був обумовлений тим, що це є класичний протизапальний засіб неселективного впливу, основним механізмом дії якого є гальмування біосинтезу простагландинів, що обумовлено його антициклооксигеназною активністю [217]. Тоді як для кверцетину (флавоноїд флавонового класу) домінантним механізмом протизапальної активності є інгібування 5-ліпооксигенази (антилейкотриєнова дія). Крім цього, встановлено, що кверцетин чинить пряму пригнічувальну дію на секрецію гістаміну, функціональну активність алоантигенспецифічних цитотоксичних Т-лімфоцитів, інтерлейкіну 8 (ІЛ-8), фактору некрозу пухлин α (ФНП- α) [217].

Протизапальний ефект (ПЗЕ) досліджуваного екстракту та препаратів порівняння визначали за формулою [218]:

$$\text{ПЗЕ (\%)} = \frac{(V_{\text{кп}} - V_{\text{д}}) \cdot 100}{V_{\text{кп}}}$$

де: $V_{\text{кп}}$ (см³) – медіанна об'єму стопи у тварин з групи контрольної патології;

$V_{\text{д}}$ (см³) – медіанна об'єму стопи у тварин, які отримували препарат.

Отриманий масив даних обробляли методами варіаційної статистики (медіана, верхній та нижній кuartилі) з використанням непараметричних методів

аналізу (критерій Крускала-Уолліса, Манна-Вітні (табл. 5.8)) [218].

Таблиця 5.8

**Дослідження протизапальної властивості екстракту з листя лепехи звичайної
на моделі карагенінового набряку (n = 6)**

Досліджуванні групи	$V_{30 \text{ хв}} - V_{\text{вих}}$	ПЗЕ, %	$V_{60 \text{ хв}} - V_{\text{вих}}$	ПЗЕ, %	$V_{120 \text{ хв}} - V_{\text{вих}}$	ПЗА, %
1	0,30 (0,26; 0,37)	—	0,45 (0,41; 0,59)	—	0,90 (0,59; 0,95)	—
2	0,27 (0,19; 0,39)	10,0	0,39 (0,26; 0,70)	13,3	0,28* (0,20; 0,52)	68,9
3	0,17 (0,14; 0,31)	43,3	0,31 (0,17; 0,47)	31,1	0,19* (0,17; 0,32)	78,9
4	0,14* (0,05; 0,15)	53,3	0,16* (0,15; 0,28)	64,4	0,28* (0,21; 0,37)	68,9
Досліджуванні групи	$V_{180 \text{ хв}} - V_{\text{вих}}$	ПЗА, %	$V_{240 \text{ хв}} - V_{\text{вих}}$	ПЗА, %	$V_{24,0 \text{ год}} - V_{\text{вих}}$	ПЗА, %
1	1,51 (1,4; 1,55)	—	0,87 (0,84; 1,32)	—	1,70 (1,63; 1,83)	—
2	0,30* (0,06; 0,48)	79,5	0,47* (0,38; 0,59)	46,0	0,74* (0,53; 0,81)	56,5
3	0,30* (0,30; 0,46)	80,1	0,62* (0,52; 0,66)	28,7	0,95* (0,89; 1,12)	44,1
4	0,31* (0,00; 0,44)	80,1	0,83 (0,20; 1,07)	4,6	0,81 (0,74; 0,89)	52,3

Примітки:

1. * – достовірно відносно контрольної патології, $p < 0,05$;
2. # – достовірно відносно кверцетину, $p < 0,05$.

Як свідчать отримані дані, екстракт листя лепехи звичайної виявляє протизапальну активність в межах 10,0–79,5 %, що практично не відрізняється від результатів отриманих для препаратів порівняння (диклофенаку натрію –28,7–80,1 %, кверцетину – 4,6–80,1%) протягом всього періоду дослідження. Антиексудативна активність екстракту на піку запалення становила 68,9% ($p < 0,05$) на 120 та 79,5% ($p < 0,05$) на 180 хв [209].

Пригнічення розвитку набряку на 120 хв (2 год) карагенін-індукованого запалення, ймовірно, обумовлено інгібуванням медіаторів ранньої фази запального процесу, таких як гістамін, 5-гідрокситриптамін та брадикінін, тоді як антиексудативна дія екстракту листя лепехи звичайної на 180 хв (3 год) пов'язана з пригніченням під його впливом синтезу простагландинів, вільних радикалів і виробленням ЦОГ-2 [209].

Для моделювання гістамінового набряку використовували гістамін виробництва фірми «Sigma-Aldrich» [209]. При проведенні досліджень піддослідні тварини розділено на групи по 6 особин у кожній: 1 – контрольна патологія (тварини з гістаміновим набряком, які отримували дистильовану воду); 2 – щури з гістаміновим набряком, яким вводили екстракт у дозі 0,5 мл/кг; 3, 4 та 5 групи – тварини з гістаміновим набряком, які отримували препарати порівняння: диклофенак натрію у дозі 8 мг/кг, кверцетин у дозі 11 мг/кг та класичний антигістамінний препарат лоратадин у дозі 1 мг/кг відповідно [209].

Досліджуваний екстракт та препарати порівняння вводили внутрішньо-шлунково у лікувально-профілактичному режимі (1 раз на добу протягом 5 діб та на 6 добу за 1 год до ін'єкції 0,1% розчину гістаміну субплантарно у задню стопу щура в об'ємі 0,1 мл). За розвитком набряку спостерігали в динаміці через 30, 60 та 90 хв, для чого вимірювали об'єм лап у см^3 за допомогою цифрового плетизмометра Panlab (Іспанія) моделі LE 7500 версії V29/10/2014 [209].

Обчислення протизапального ефекту та статистичну обробку результатів проводили аналогічно як і при карагеніновій моделі. Прийнятий рівень значущості $p < 0,05$. Для отримання статистичних висновків використовували стандартний пакет програм Statistica (версія 6). Результати дослідження наведено у табл. 5.9.

Таблиця 5.9

**Дослідження протизапальних властивостей екстракту листя лепехи
звичайної на моделі гістамінового набряку (n = 6)**

Досліджуванні групи	V _{30 хв} - V _{вих}	ПЗА, , %	V _{60 хв} - V _{вих}	ПЗА, %	V _{90 хв} - V _{вих}	ПЗА, %
1	1,20 (1,13; 1,27)	—	0,65 (0,49; 0,77)	—	0,48 (0,26; 0,51)	—
2	0,59* (0,47; 0,72)	50,8	0,47* (0,30; 0,49)	27,7	0,24* (0,20; 0,32)	50,0
3	0,72* (0,31; 0,71)	40,0	0,44* (0,33; 0,57)	32,3	0,37 (0,33; 0,42)	22,9
4	0,38* (0,24; 0,51)	68,3	0,30* (0,24; 0,31)	58,3	0,13* (0,03; 0,20)	72,9
5	0,34* (0,27; 0,49)	71,7	0,35* (0,12; 0,48)	46,1	0,17* (0,11; 0,23)	64,6

Примітка. * – достовірно відносно контрольної патології.

За умов гістамін-індукованого набряку екстракт листя лепехи виявляє протизапальну дію на рівні 50,8, 27,7 та 50,0 % відповідно на 30, 60 та 90 хв набряку. За вираженістю протизапальної активності досліджуваний екстракт поступався в незначній мірі препаратам порівняння, що свідчить про здатність досліджуваного екстракту чинити гальмівний вплив на медіатори ранньої фази запального процесу.

Отримані результати досліджень підтверджують, що екстракт листя лепехи звичайної виявляє виражену протизапальну дію з полівалентним механізмом реалізації: гальмівним впливом на медіатори ранньої фази запального процесу, ПГ,

процеси ПОЛ, стабілізацію клітинних і субклітинних мембран і опосередковане або пряме пригнічення ЦОГ.

Висновки до розділу 5

1. Визначено оптимальні умови екстрагування та розроблено технологію отримання екстракту кореневищ лепехи звичайної. Оптимальним екстрагентом є 70 % етанол, розмір частинок сировини – від 1,0 до 2,0 мм, час настоювання – 12 годин, співвідношення сировина-екстрагент – 1 : 5. Отримання екстракту кореневищ здійснювали методом перколяції з використанням батареї з трьох перколяторів.

2. Проведено дослідження оптимальних умов екстрагування БАР з листя лепехи звичайної. Уперше розроблено методику отримання рідкого спиртового екстракту з листя лепехи звичайної, на яку отримано патент на корисну модель та зареєстровано заявку на винахід.

3. Проведено визначення таких технологічних властивостей рідких екстрактів: в'язкість, показник рН, сухий залишок екстрактів, вміст етанолу та температура кипіння.

4. Досліджено якісний склад та кількісний вміст сполук фенольної природи в екстракті листя лепехи звичайної. Ідентифіковано 10 сполук. Кількісний вміст усіх ідентифікованих компонентів складав 2077,469 мкг/мл, з яких домінантними компонентами були: β -азарон (1188,321 мкг/мл), робінін (397,787 мкг/мл) та ізоорієнтин (164,427 мкг/мл).

5. Досліджено якісний склад сполук, що виявляють антирадикальну активність в екстрактах листя та кореневищ рослини. В екстракті кореневищ виявлено 31 сполуку зі здатністю зв'язувати вільні радикали. В екстракті листя виявлено 20 сполук. Ідентифіковано хлорогенову кислоту, апігенін-7-глюкозид, трифолін, рутин, робінін, ізоорієнтин.

6. Методом газорідинної хроматографії в екстракті листя лепехи звичайної ідентифіковано 7 сполук і 8 сполук в екстракті кореневищ (зокрема γ -азарон).

7. Ідентифіковано та визначено кількісний вміст азарону в отриманих екстрактах: в екстракті кореневищ лепехи звичайної – 0,16 %, в екстракті листя – 0,35 %.

8. Розроблено проекти МКЯ на отримані екстракти листя та кореневищ лепехи звичайної.

9. Уперше проведено дослідження біологічної дії екстрактів з листя та кореневищ лепехи звичайної. Підтверджено протизапальні, жовчогінні, помірні актопротекторні та аналгетичні властивості екстракту з листя рослини.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Yaremenko M., Gontova T., Boryak L., Mala O., Andryushayev O. Determination of optimal extraction conditions of phenolic compounds from *Acorus calamus* leaves. *EUREKA: Health Sciences*. 2020. № 3 P. 63–70.

2. Yaremenko M., Gontova T. The technology of production and quality assessment of the *calamus* liuid extract. *International independent scientific journal*. 2020. № 12 P. 47–51.

3. Спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу на основі рослинної сировини з протизапальною дією : пат. 138526 України. № u201906408 ; заявл. 10.06.2019 ; опубл. 25.11.2019, бюл. № 22.

4. Яременко М. С., Гонтова Т. М. Контроль якості препаратів на основі лепехи звичайної. *Матеріали V науково-практичної конференції Школи молодих науковців ПАТ «Фармак»*. Київ, 2017 С. 49–51.

5. Корган Л. А., Яременко М. С. Питання безпеки спиртового екстракту листя лепехи звичайної. *Фармакоекономіка в Україні: стан та перспективи розвитку* : матеріали X наук.-практ. конф., м. Харків, 21 трав. 2018 р. Харків : Вид-во НФаУ, 2018. С. 44.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено результати теоретичного узагальнення і практичного вирішення поставленого завдання, що полягає у комплексному фармакогностичному вивченні листя та кореневищ лепехи звичайної дикорослої флори України, визначенні критеріїв стандартизації сировини, розробці відповідної сучасної аналітично-нормативної документації на сировину: лепехи листя та лепехи кореневища, стандартизації рослинних екстрактів та попередньому вивченні фармакологічних властивостей.

1. Проаналізовано наукові першоджерела щодо систематичного положення лепехи звичайної та близьких до неї видів, морфолого-анатомічної будови і хімічного складу, існуючих підходів до стандартизації кореневищ рослини. Досліджено стан вивченості надзведеної частини лепехи звичайної та окремі можливі перспективи її вивчення та застосування. Визначено сучасний стан поширення та сировинні запаси рослини на території України.

2. Встановлено макро- та мікроскопічні діагностичні ознаки листя та кореневища лепехи звичайної. Уперше визначено мікроскопічні діагностичні ознаки лепехи звичайної листя та узагальнено мікроскопічні діагностичні ознаки офіційної сировини – лепехи кореневища.

3. Проведено фітохімічний аналіз вітчизняних зразків сировини лепехи звичайної листя та кореневищ. У листя ідентифіковано та встановлено кількісний вміст: 30 карбонових кислот (з них 5 одноосновних, 5 двоосновних, 1 триосновну, 13 жирних кислот і 6 ароматичних); 17 амінокислот (з них 7 незамінних і 10 замінних), 5 вітамінів (вітаміни B₁, B₂, PP, E, каротиноїди), 5 моносахаридів, 14 макро- та мікроелементів, β-ситостерин; 42 компоненти ефірної олії, 13 сполук фенольної природи (з них уперше ідентифіковано: неохлорогенову та кавову кислоти, апігенін, апігенін-7-глюкозид, акацетин, трифолін, робінін, ізоорієнтин). У кореневищах виявлено: 29 карбонових кислот (5 одноосновних, 5 двоосновних, 1 триосновна, 12 жирних і 6 ароматичних), 17 амінокислот (з них 7 незамінних і 10 замінних), 5 вітамінів (вітаміни B₁, B₂, PP, E, каротиноїди), 5 моносахаридів, β-

ситостерин, 33 компоненти ефірної олії, 7 сполук фенольної природи (вперше ідентифіковано: неохлорогенову та кавову кислоти, акацетин), 14 макро- та мікроелементів.

4. Вивчено особливості накопичення БАР у сировині лепехи звичайної листя та запропоновано оптимальні терміни її заготівлі – період масового цвітіння, в ході якого накопичується найвищий вміст суми флавоноїдів ($1,30 \pm 0,01$ %) і вміст ефірної олії ($1,04 \pm 0,02$ %).

5. Розроблено оптимальну методику ідентифікації сировини лепехи звичайної та визначення граничного вмісту азарону методом ТШХ, на основі раніше розробленої методики ВЕТШХ кількісного визначення азарону. Розроблено та валідовано методику кількісного визначення α - та β -азарону в перерахунку на α -азарон методом ВЕРХ. Розроблено проєкт монографії «Лепехи кореневища^N» для ДФУ та проєкт кількісного визначення азарону для цієї монографії. Розроблено МКЯ «Лепехи звичайної листя». Встановлено, що граничний вміст азарону для обох видів сировини – становить не більше 0,5 %. У листі рослини регламентовано вміст флавоноїдів – не менше 1,0 %, у перерахунку на гіперозид та суху сировину, та вміст ефірної олії – не менше 10 мл/кг у перерахунку на суху сировину.

6. Розроблено технологію одержання рідких екстрактів із лепехи звичайної листя та кореневищ, вивчено їх хімічний склад та показники якості. В екстракті листя лепехи звичайної ідентифіковано 10 сполук, серед яких домінували β -азарон – 1188,321 мкг/мл, робінін – 397,787 мкг/мл та ізоорієнтин – 164,427 мкг/мл. У листі виявлено 20 сполук з антирадикальними властивостями, з яких ідентифіковано хлорогенову кислоту, ізоорієнтин, робінін, рутин, трифолін та апігенін-7-глюкозид. В екстракті лепехи звичайної кореневищ виявлено 31 сполуку з антирадикальними властивостями. Проведено дослідження з вмісту азарону в отриманих екстрактах та визначено, що вміст азарону не перевищує регламентоване значення (не більше 0,5 %).

7. Розроблено проєкти МКЯ на лепехи звичайної листя рідкий екстракт та лепехи звичайної кореневищ.

8. Досліджено токсикологічні властивості отриманих екстрактів.

Встановлено, що LD_{50} лепехи звичайного листя рідкого екстракту знаходиться у діапазоні понад 5000 мг/кг, тобто цей екстракт належить до V класу токсичності – практично нетоксичні речовини (за класифікацією І. К. Сидорова). Встановлено протизапальну, жовчогінну, помірну актопротекторну та аналептичну дію отриманого лепехи звичайної листя рідкого екстракту.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. The Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2016. № 181. P. 1–21.
2. Chen Yong-Yan, Li De-Zhu, Wang Hong. Infrageneric phylogeny and systematic position of the Acoraceae inferred from ITS, 18S and rbcL sequences. *Acta Botanica Yunnanica*. 2002. №24 (6). С. 699–706.
3. The Plant List. *A working list of all plant species*. URL : <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=acorus> (Date of access: 02.09.2020).
4. World Checklist of Selected Plant Families. *Kew Science*. URL : <https://wcsp.science.kew.org/qsearch.do> (Date of access : 02.09.2020).
5. Wu Z. Y., Raven P. H. Flora of China (Acoraceae through Cyperaceae) / ed. by – D. Y. Hong. Beijing ;St. Louis: Science Press & Missouri Botanical Garden Press, 2010. 461 p.
6. Каталог декоративних трав'янистих рослин ботанічних садів і дендропарків України : довідниковий посіб. / ред. С. П. Машковська. Київ, 2015. 282 с.
7. Acorus. *Tropicos*. URL : <https://www.tropicos.org/name/Search?name=acorus> (Date of access: 02.09.2020).
8. Смик Г. К. Корисні та рідкісні рослини України Словник-довідник народних назв. Киев : «Українська Радянська Енциклопедія» імені М. П. Бажана, 1991. 416 с.
9. Runkel S. T., Bull A. F. Wildflowers of Iowa Woodlands. Iowa City : University of Iowa Press, 2009. P. 119.
10. Флора УРСР. Київ : АН УРСР, 1950. Т. 3. С. 6–7.
11. Никитина А. А., Панкова А. А. Анатомический атлас полезных и некоторых ядовитых растений. Ленинград : Наука, 1982. С. 56–59.
12. Ботаника. Энциклопедия «Все растения мира» / пер. с англ.; ред. Д. Григорьев и др. Москва : Könenmann, 2006 (русское издание). 1020 с.
13. Sweet flag / J. Hilty Wetland. *Wildflowers of Illinois*. URL :

<http://www.illinoiswildflowers.info/wetland/plants/sweetflag.htm> (Date of access : 02.09.2020).

14. Грудзинская И. А. Семейство аронниковые, или ароидные (Araceae). Жизнь растений. В 6 т. Москва : Просвещение, 1981. Т. 6. Цветковые растения / под ред. А. Л. Тахтаджяна. С. 466–493.
15. Виноградова Ю. К. Изменчивость биологических признаков аира обыкновенного (*Acorus calamus* L.) в естественных и инвазионных популяциях. *Бюл. Гл. ботан. сада РАН*. 2004. № 187. С. 23–31.
16. Kirtikar K. R., Basu B. D. Indian medicinal plants. 2nd ed., Allahabad : Pharmaceutical Press, 1989. Vol. II. P. 2389.
17. Wichtl M. Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals: A Handbook for Practice on a Scientific Basis. 3rd ed. Berlin: Medpharm GmbH Scientific Publishers, 2004. P. 115–117.
18. Morphological characterization of diploid and triploid *Acorus calamus* (Acoraceae) from southern Western Siberia, parthenocarpy in sterile plants and occurrence of aneuploidy / D. D. Sokoloff et al. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2020. Vol. XX. P. 1-27.
19. Мінарченко В. М. Ресурсознавство. Лікарські рослини : навч. посіб. ; Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Інститут ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України. Київ : Фітосоціоцентр, 2014. С. 248.
20. Мінарченко В. М. Ресурсознавство. Лікарські рослини : навч. посіб. Київ : Фітосоціоцентр, 2013. 215 с.
21. Охримович В. Н. Распространение и запасы некоторых лекарственных растений Волынской области. *Фл. и растит. Украины*. Киев : Наук. думка, 1986. С. 96–98.
22. Козьяков О. С., Зиль І. П. Ресурси *Acorus calamus* L. на рівнинній частині Правобережної України. *Укр. ботан. журн*. 1990. № (47) 5. С. 91–95.
23. Козьяков А. С., Ловелиус О. Л. Распространение и запасы сырья *Acorus calamus* L. на Украине. *Растит. ресурсы*. 1984. № (20) 4. С. 496–502.
24. Козюк В.П. Поширення та динаміка ресурсів *Acorus calamus* L. на території Волинської області. *Укр. ботан. журн*. 1997. № 54 (3). С. 283–288.

25. Essential oil safety: A guide for health care professionals / R. Tisserand et al. 2nd ed. Edinburgh, 2013. P. 784.
26. Gildemeister E., Hoffmann Fr. The volatile oils. Transl. by Ed. Kremers. London : Longmans, Green and Co., 1900. P. 301.
27. Molecular and chemical profiling of 'sweet flag' (*Acorus calamus* L.) germplasm from India / T. S. Rana et al. *Physiology and molecular biology of plants : an international journal of functional plant biology*. 2013. № 19 (2). P. 231–237.
28. Variation in essential oil yield of *acorus calamus* L. Across india. / J. Butola et al. *Progressive Research - An International Journal*. 2015. № 10. P. 4004–4006.
29. Raal A., Orav A., Gretchushnikova T. β -Asarone content and essential oil composition of *Acorus calamus* L. rhizomes from Estonia. *Journal of Essential Oil Research*. 2016. Vol. 28, № 4. P. 299–304.
30. Morphological and chemical variations of sweet flag (*Acorus calamus* L.) in the Czech and Finnish gene bank collection / K. Dušek et al. *Horticultural Science*. 2007. №34 (1). P. 17–25.
31. Comparison of Volatile Constituents of *Acorus calamus* and *Asarum europaeum* Obtained by Different Techniques / A. Wilczewska et al. *The Journal of Essential Oil Research*. 2008. № 20. P. 390–395.
32. Essential oil composition and antimicrobial assay of *Acorus calamus* leaves from different wild populations / J. Radusiene, et al. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*. 2007. № 5. P. 37–44.
33. Comparative Study of Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oil Extracted from *Acorus calamus* L. Leaves / P. Chaubey et al. *Journal of Herbal Drugs*. 2018. № 8 (4). P. 203–211.
34. Pharmacognostical Evaluation of Leaves of *Acorus calamus* Linn / A. S.Bisht et al. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 2013. № 5 (4). P. 278–281.
35. Venskutonis R., Dagilyte A. Composition of Essential Oil of Sweet Flag (*Acorus calamus* L.) Leaves at Different Growing Phases. *The Journal of Essential Oil Research*. 2003. № 15. P. 313–318.

36. Алякин А. А., Качин С. В., Ефремов А. А. Компонентный состав и физико-химические характеристики эфирных масел некоторых дикорастущих растений Сибири. 7 Конференция «Аналитика Сибири и Дальнего Востока – 2004» : тез. докладов. Новосибирск, 11-16 окт. 2004 г. Новосибирск, 2004. Т. 2. С. 222.
37. Mehmet N. A., Fikret T. Identification of chemical components from the Rhizomes of *Acorus calamus* L. with gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS\MS). *Journal of the Institute of Science and Technology*. 2018. № 8 (4). P. 181–187.
38. Chandra D., Prasad K. Phytochemicals of *Acorus calamus* (Sweet flag). *Journal of Medicinal Plants Studies*. 2017. № 5 (5). P. 277–281.
39. Giacomo M. Gas chromatographic and mass spectrometric studies of the constituents of the rhizome of *calamus*: I. The volatile constituents of the essential oil. *Journal of Chromatography A*. 1985. № 328. P. 179–194.
40. *Acorus calamus*.: Scientific Validation of Ayurvedic Tradition from Natural Resources / K. M. Pulo et al. *Pharmaceutical Biology*. 2007. Vol. 45, № 8. P. 651–666.
41. Repellant and insecticidal activities of shyobunone and isoshyobunone derived from the essential oil of *Acorus calamus* rhizomes / H. P. Chen et al. *Pharmacognosy Magazine*. 2015. № 11 (44). P. 675–681.
42. Identification of Insecticidal Constituents of the Essential Oil of *Acorus calamus* Rhizomes against *Liposcelis bostrychophila* Badonnel / C. L. Xin et al. *Molecules*. 2013. № 18. P. 5684–5696.
43. Identification of an EcoRI restriction site for a rapid and precise determination of β -asarone-free *Acorus calamus* cytotypes / C. M. Berteau et al. *Phytochemistry*. 2005. № 66 (5). P. 507–514.
44. Public Statement on the use of herbal medicinal products containing asarone / The Committee on Herbal Medicinal Products. URL : http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/04/WC500089956.pdf (Date of access: 03.09.2020).
45. Gong X. L., Dian L. H., Zhang L. J. Study on chemical constituents of volatile oil in rhizome and root of *Acorus calamus* L. (Chinese). *Chinese Pharmaceutical*

Journal. 2007. № 18. P. 176–178.

46. Lin C. L., Lin G. Y., Cai J. Z. Study on the chemical constituents of the volatile oils from the *Acorus calamus* growing in Zhejiang Province. *Chinese Pharmaceutical Journal*. 2012. № 23. P. 640–641.

47. Raina V. K., Srivastava S. K., Syamasunder K. V. Essential oil composition of *Acorus calamus* L. from the lower region of the Himalayas. *Flavour and Fragrance Journal*. 2003. № 18 (1). P. 18–20.

48. Todorova M. N., Ognyanov I. V., Shatar S. Chemical Composition of Essential Oil from Mongolian *Acorus calamus* L. Rhizomes. *Journal of Essential Oil Research*. 1995. № 7 (2). P. 191–193.

49. Indian *calamus* (*Acorus calamus* L.): Not a tetraploid / R. Ogra et al. *Research communications*. 2009. № 97 (11). P. 1644–1647.

50. Essential oil composition of *Acorus calamus* from district-pithoragarh / D. Chandra et al. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 2017. № 4 (9). P. 1158–1166.

51. Гурьев А. М. Фармакогностическое исследование аира болотного и перспективы создания на его основе новых лекарственных средств : автореф. дис. ... канд. фарм. наук: 15.00.02/ ГОУВПО "Сибирский государственный медицинский университет". Томск, 2004. 132 с.

52. Nigam M. C., Ahmad A., Misra L. N. GC-MS examination of the essential oil of *Acorus calamus*. *Indian Perfum*. 1990. № 34. P. 282–285.

53. Gas chromatographic examination of some aromatic plants of Uttar Pradesh hills / V.K. Srivastava et al. *Indian Perfum*. 1997. № 41. P. 129–139.

54. Mukherjee P.K. Quality Control of Herbal Drugs—An Approach to Evaluation of Botanicals. New Delhi: Business Horizons, 2002. P. 692–694.

55. Nawamaki K., Kuroyanagi M. Sesquiterpenoids from *Acorus calamus* as germination inhibitors. *Phytochemistry*. 1996. № 43. P. 1175–1182.

56. Shatar S., Altantsetseg Sh. The essential oil of rhizomes of the some plants from Tibetan and Mongolian traditional medicine. *Проблемы сохранения разнообразия растительного покрова Внутренней Азии* : материалы Всероссийской научной

конференции с международным участием, Улан-Удэ, 7 – 10 сент. 2004. Улан-Удэ, 2004. Ч. 2. С. 62–63.

57. Motley T. J. The ethnobotany of sweet flag, *Acorus calamus*, (Araceae). *Economic Botany*. 1994. № 48. P. 397–412.

58. Venskutonis P. R., Dagilyte A. Composition of essential oil of sweet flag (*Acorus calamus* L.) leaves at different growing phases. *Journal of essential oil research*. 2003. № 15. P. 313–318.

59. Gyawali R., Kim, K. Volatile organic compounds of medicinal values from nepalese *Acorus calamus* L. *Kathmandu university journal of science, engineering and technology*. 2009. № 5. P. 51–65.

60. Essam Y. A.-H., Mikhail A. E. Chromatographic analyse of volatile organic compounds in essential oil of *Acorus calamus* L. rhizome. *Assiut Journal of Agricultural Sciences*. 2012. № 43 (Spec. Is.). P. 126–131.

61. Raja A. E., Vijayalakshmi M., Devalarao G. *Acorus calamus* linn: Chemistry and Biology. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2009. № 2. P. 256–261.

62. Water-soluble polysaccharide obtained from *Acorus calamus* L. classically activates macrophages and stimulates Th1 response / N. V. Belska et al. *International Immunopharmacology*. 2010. № 10 (8). P. 933–942.

63. Nutritional and Anti Nutritional Status of *Acorus calamus* L. Rhizome / S. Manju et al. *Food Science and Technology*. 2014. № 15. P. 51–59.

64. Mariyam A., Siddiqi M., Ahmad M. Fatty Acid and Sugar Composition of *Acorus calamus* Linn. *Fett-lipid*. 1984. № 86. P. 24–25.

65. Ramachandran B., Rajamani K., Kumanan K. *Acorus calamus*: An overview. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2010. № 4 (25). P. 2740–2745.

66. Vashi G., Patel H. C. Chemical constituents and antimicrobial activity of *Acorus calamus* Linn. *Comp. Physiol. Eco*. 1987. № 12. P. 49–51.

67. Chernenko T. V., Glushenkova A. I. Lipids of *Acorus calamus*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2001. № 37. P. 304–306.

68. Rita W., Swantara I. M., Kawuri, R. Total Phenolic and Flavonoid Contents and Antimicrobial activity of *Acorus calamus* L. Rhizome Ethanol Extract. *Research*

Journal of Chemistry and Environment. 2018. № 22. P. 65–70.

69. In vitro Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Rhizome Extracts from *Acorus calamus* Linn. / P. Chaubey et al. *Asian Journal of Chemistry*. 2017. № 29. P. 2357–2360.

70. Atalar M., Karadağ M., Koyuncu M. Identification of phenolic components from the rhizomes of sweet flag (*Acorus calamus* L.) using high pressure liquid chromatography (HPLC). *International Aromatic Plants and Cosmetic Symposium* : Abstract book, 3-6 october. 2019 / Iğdır University. Iğdır, 2019. P. 30–31.

71. Funde S. G. Phytochemicals evaluation, anticancer, antioxidant and antimicrobial activity of *Acorus calamus* different solvent extracts. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2015. № 7 (6). P. 495–504.

72. Bagchi P., Hopper W. Virtual Screening of Active Compounds of *Valeriana wallichii*, *Acorus Calamus* and *Asparagus Racemosus* with Schizophrenic Proteins COMT & GRM3. *2011 International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics* : Abstract book, Singapore 26–28 February, 2011. Singapore, 2011. Vol. 5. P. 15–22.

73. Qualitative and quantitative analysis of gallic acid in *Alchemilla vulgaris*, *Allium ursinum*, *Acorus calamus* and *Solidago virga-aurea* by chip-electrospray ionization mass spectrometry and high performance liquid chromatography / D. Condrat et al. *Central european journal of chemistry*. 2010. № 8 (3). P. 530–535.

74. A Novel Tropoloisoquinoline Alkaloid, Neotatarine, from *Acorus calamus* L. / J. Li et al. *Chemistry biodiversity*. 2017. № 14 (10). P. 1–15.

75. Chemical constituents of *Acori Calami Rhizoma* from Hunan Province / J. Li et al. *Zhong Yao Cai*. 2014. № 37 (9). P. 1587–2590.

76. Muthuraman A., Singh N. Neuroprotective effect of saponin rich extract of *Acorus calamus* L. in rat model of chronic constriction injury (CCI) of sciatic nerve-induced neuropathic pain. *Journal of Ethnopharmacology*. 2012. № 142 (3). P. 723–731.

77. Anti-inflammatory effects of the saponins obtained from the leaves of *Acorus calamus* / N. Tiwaria et al. *Pharmacologyonline*. 2010. № 2. P. 395–400.

78. In vitro Antimicrobial Effect of Essential oil from Leaf and Rhizome of

Various Accessions of *Acorus calamus* Linn., and Its Phytochemical Screening / A. Kasture et al. *European Journal of Medicinal Plants*. 2015. № 9 (2). P. 1–13.

79. Sandeep R., Madan T., Mohan K. S. An overview on traditional uses and pharmacological profile of *Acorus calamus* Linn. (Sweet flag) and other *Acorus* species. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2013. № 21. P. 268–276.

80. Grieve M. A Modern Herbal. N. Y. : Dover Publications, 1971. Vol. II. P. 726–729.

81. Феофраст. Исследование о растениях / АН СССР ; пер. с др.-греч. и примеч. М. Е. Сергеевко; ред. акад. И. И. Толстого и чл.-корр. АН СССР Б. К. Шишкина; послесловие Б. К. Шишкин; «Исследование о растениях» Феофраста А. Н. Криштофович; Феофраст и его ботанические сочинения М. Е. Сергеевко. [Москва - Ленинград]: Изд-во АН СССР, 1951. 589 с.

82. Lloyd J. U. Origin and History of all the Pharmacopeial. Vegetable Drugs. The Chemical and preparations. Washington : Caxton Press, 1929. P. 33.

83. Motley T. J. The Ethnobotany of Sweet Flag, *Acorus calamus* L. Masters Theses. Eastern Illinois University. Charleston, 1989. P. 2337.

84. Connell C. Aphrodisiacs In Your Garden. N. Y.: Taplinger Publishing Co., 1965. P. 95–96.

85. Elliott D. B. Roots. Old Greenwich: The Chatham Press, 1976. P. 102–104.

86. Ott J. Hallucinogenic Plants of North America. Berkeley : Wingbow Press, 1975. P. 39-40.

87. Ahluwalia S. Holy Herbs: Modern Connections to Ancient Plants. 2nd ed. Delhi : Fingerprint Publishing, 2017. 268 p.

88. Верзилин Н. М. По следам Робинзона. Сады и парки мира ; авт. предисл. Г. Гроденский ; худож.: В. Бескаравайный, Л. Милорадович, Л. Петровых. Ленинград : Детская литература, 1964. 574 с.

89. Стогова Н. Болотные лекари аир и багульник. Санкт-Петербург : Питер, 2006. 96 с.

90. Padua L. S., Bunyapraphatsara N., Lemmens R. H. M. J. PROSEA: Plant

Resources of South-East Asia. Volume 12/1 : Medicinal and Poisonous Plants. Leiden : Backhuys, 1999. 713 p.

91. Drug Information Database. URL: <https://www.drugs.com/> (Date of access: 29.03.2020).

92. Ethnobotany of Acorus in China / H. Shu et al. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 2018. № 87 (2). P. 3585.

93. Зузук Б. М., Куцик Р. В. Аир тростниковый (аналитический обзор). *Провизор*. 2002. № 8. С. 34–39.

94. Підходи до розробки монографії «Лепехи звичайної кореневища» для включення у Державну фармакопею України / М. С. Яременко, Т. М. Гонтова, Л. М. Сіра, Е.Е. Котова, А.Г. Котов. *Управління, економіка та забезпечення якості в фармації*. 2017. № 1 (49). С. 22–26.

95. Державний реєстр лікарських засобів України. URL : <http://www.drlz.com.ua/> (дата звернення: 02.09.2020).

96. Chaturvedi M., Chaturvedi A. Acorus Calamus: A Divine Drug for the Human Being. *Imperial Journal of Interdisciplinary Research*. 2017. № 3 (1). P. 1499–1503.

97. Antimicrobial activities of the crude methanol extract of Acorus calamus Linn. / S. Phongpaichit et al. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 2005. № 27 (2). P. 517–523.

98. Evaluation of antibacterial activity from rhizome extract of Acorus calamus Linn. / R. A. Sabitha et al. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 2003. 62 (6). P. 529–650.

99. Wiwik R., S. I. Made, Gusti U. Antimicrobial activity of Acorus calamus L. rhizome extract and its total flavonoid and phenolic contents. *AIP Conference Proceedings*. 2019. Vol. 2155, Iss. 1. [Doi.org/10.1063/1.5125558](https://doi.org/10.1063/1.5125558) (Date of access : 03.09.2020).

100. Antibacterial effect of Acorus calamus extractions against gram positive and negative bacteria / H. S. Rahamooz et al. *Ethno- Pharmaceutical Products*. 2014. № 1. P. 1–6.

101. Navdha J., Om P., Anil K. P. Essential oil Composition and in vitro Antibacterial Activity of Rhizome Essential Oil and β -Asarone from *Acorus calamus* L. Collected from Lower Himalayan Region of Utarakhand. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2012. № 15 (1). P. 32–37.
102. Antifungal Activity of β -Asarone from Rhizomes of *Acorus gramineus* / J. Y. Lee et al. Hwang. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004. №52 (4). P. 776–780.
103. Asha D. S., Deepak G. Antimicrobial activity of *Acorus calamus* (L.) rhizome and leaf extract. *Acta Biologica Szegediensis*. 2009. № 53 (1). P. 45–49.
104. Kim H., Han T.-H., Lee S.-G. Anti-inflammatory activity of a water extract of *Acorus calamus* L. leaves on keratinocyte HaCaT cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009. № 122 (1). P. 149–156.
105. Deepak J. Anti-inflammatory Activity of 80% Ethanolic Extract of *Acorus calamus* Linn. Leaves in Albino Rats. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2010. № 3. P. 882–884.
106. Chamlagai D., Singh B. Study of in vitro anti-inflammatory activity of ethnomedicinal plants of sikkim *viscum articulatum* and *Acorus calamus*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2016. № 9 (3). P. 119–122.
107. Anti-inflammatory and central and peripheral anti-nociceptive activities of α -asarone through the inhibition of TNF- α production, leukocyte recruitment and iNOS expression, and participation of the adenosinergic and opioidergic systems / A. A. Saldanha et al. *Inflammopharmacology*. 2019. № 28. P. 1039–1052.
108. Chemical Compositions, In-vitro Antioxidant, Anti-microbial, Anti-inflammatory and Cytotoxic Activities of Essential Oil of *Acorus calamus* L. Rhizome from North-East India / R. Loying et al. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2019. № 22 (5). P. 1299–1312.
109. Evaluation of the wound-healing activity and anti-inflammatory activity of aqueous extracts from *Acorus calamus* L. / S. Guo-Bing et al. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*. 2014. № 27. P. 91–95.
110. Das P. K., Malhotra C. L., Dhalla N. S. Spasmolytic activity of asarone and

essential oil of *Acorus calamus*, Linn. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*. 1962. № 135. P. 167–177.

111. Antispasmodic effect of *Acorus calamus* Linn. is mediated through calcium channel blockade / A. ul H. Gilani et al. *Phytotherapy Research*. 2006. № 20 (12). P. 1080–1084.

112. Jayaraman R. T., Anitha T., Joshi V. D. Analgesic and anticonvulsant effects of *Acorus calamus* roots in mice. *International Journal of Pharmaceutical Technology Research*. 2010. № 2. P. 552–555.

113. Evaluation of Gastric Ulcer Protective Activity of *Acorus calamus* Linn. in Laboratory Animals / C. C. Barua et al. *Medicinal Plants: Phytochemistry, Pharmacology and Therapeutics*. 2015. № 4. P. 455–476.

114. Mahboob S. Al., Apte K., Bhagwat G. B. Hepatoprotective Potential of *Acaro Calamus* against Carbon tetrachloride induced Liver damage in Rats. *International Journal of Pharmaceutical Technology Research*. 2014. № 6 (4). P. 1315–1321.

115. Srividya G., Adilaxmamma K., Srilatha C. H. Protective Effect Of *Acorus Calamus* Rhizome In Paracetamol Exposure Induced Hepatotoxicity In Rats: Biochemical And Histopathological Study. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*. 2018. № 10. P. 7–10.

116. Противоязвенные свойства айра болотного / А. М. Гурьев и др. *Рос. аптеки*. 2003. № 10. С. 61–63.

117. Antidepressant activity of methanolic extract of *Acorus calamus* leaves in albino mice / V. H. Pushpa et al. *International Journal of Pharmaceutical Technology Research*. 2013. № 5. P. 5458–5465.

118. Reddy S., Rao G., Shetty B. Effects of *Acorus calamus* Rhizome Extract on the Neuromodulatory System in Restraint Stress Male Rats. *Turkish Neurosurgery*. 2015 № 25 (3). P. 425–431.

119. Chellian R., Pandey V., Mohamed Z. Biphasic Effects of α -Asarone on Immobility in the Tail Suspension Test: Evidence for the Involvement of the Noradrenergic and Serotonergic Systems in Its Antidepressant-Like Activity. *Frontiers in Pharmacology*. 2016. № 7. P. 1–8.

120. Antidepressant-like effects of essential oil and asarone, a major essential oil component from the rhizome of *Acorus tatarinowii* / P. Han et al. *Pharmaceutical Biology*. 2013. № 51. P. 589–594.
121. Cognitive enhancing effects of alpha asarone in amnesic mice by influencing cholinergic and antioxidant defense mechanisms / H. Kumar et al. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2012. № 76. P. 1518–1522.
122. Neuroprotective effect of alpha-asarone on spatial memory and nitric oxide levels in rats injected with amyloid-beta (25-35) / I. D. Limon et al. *Neuroscience Letters*. 2009. № 453. P. 98–103.
123. (2012). Anxiolytic-like effect of alpha-asarone in mice/ S. Liu et al. *Phytotherapy Research*. 2012. № 26. P. 1476–1481.
124. Menon M. K., Dandiya P. C. The mechanism of the tranquillizing action of asarone from *Acorus calamus* Linn. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1967. № 19. P. 170–175.
125. Activities of alpha-asarone in various animal seizure models and in biochemical assays might be essentially accounted for by antioxidant properties / N. Pages et al. *Neuroscience Research*. 2010. № 68. P. 337–344.
126. Pandey V., Jose N., Subhash H. CNS activity of methanol and acetone extracts of *Acorus calamus* leaves in mice. *Journal of Pharmacology and Toxicology*. 2009. № 4. P. 79–86.
127. Antidepressant-like effects of *Acorus calamus* in forced swimming and tail suspension test in mice / S. Pawar Vinod, A. Akhade, S. Baokar, H. Shivakumar. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2012. № 1. P. 17–19.
128. Protective effects of beta-asarone on cultured rat cortical neurons damage induced by glutamate / Y. Z. Chen et al. *Zhong Yao Cai*. 2007. № 4. P. 436–438.
129. Effects of beta-asarone on expression of c-fos in kindling epilepsy rat brain / Y. Q. Fang et al. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2008. № 5. P. 534–536.
130. Fang Y. Q., Li L., Wu Q. D. Effects of beta-asarone on gene expression in mouse brain. *Zhong Yao Cai*. 2003. № 9. P. 650–652.
131. Beta-asarone improves cognitive function by suppressing neuronal apo-

ptosis in the Beta-amyloid hippocampus injection rats / Y. Geng et al. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2010. № 5. P. 836–843.

132. Beta-asarone protection against beta-amyloid-induced neurotoxicity in PC12 cells via JNK signaling and modulation of Bcl-2 family proteins / C. Li et al. *The European Journal of Pharmacology*. 2010. № 635. P. 96–102.

133. Beta-asarone attenuates neuronal apoptosis induced by Beta amyloid in rat hippocampus / J. Liu et al. *Yakugaku Zasshi*. 2010. № 5. P. 737–746.

134. Zanolini P., Avallone R., Baraldi M. Sedative and hypothermic effects induced by beta-asarone, a main component of *Acorus calamus*. *Phytotherapy Research*. 1998. № 12. P. 114–116.

135. Saroya A. S., Singh J. Neuropharmacology of *Acorus calamus* L. *Pharmacotherapeutic Potential of Natural Products in Neurological Disorders*. Singapore : Springer Nature, 2018. P. 129–134.

136. Khan M. A., Islam M. T. Analgesic and cytotoxic activity of *Acorus calamus* L., *Kigelia pinnata* L., *Mangifera indica* L. and *Tabernaemontana divaricata* L. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*. 2012. № 4 (2). P. 149–154.

137. Pharmacological evaluation of rhizomes of *acorus calamus* for analgesic activity / K. Navneet et al. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2015. № 7 (4). P. 411–413.

138. Sreejaya S. B., Archana D., Santhy K. S.. Genoprotective effects of *Acorus calamus* rhizome against DNA damage in peripheral blood lymphocytes. *International Journal of Green Pharmacy*. 2017. № 1. P. 108.

139. Pandey N. Effect of *Acorus calamus* and *Cyperus scariosus* in hyperlipidemia and Non alcoholic fatty liver : doctoral dissertation : 083. Banaras Hindu University, Varanasi, 2015. 206 p.

140. Chemical composition, cytotoxicity and insecticidal activities of *Acorus calamus* accessions from the western Himalayas / K. Rakesh et al. *Industrial Crops and Products*. 2016. № 94. P. 520–527.

141. Arvind K., Sharma S., Verma G. Insecticidal and genotoxic potential of *acorus calamus* rhizome extract against *drosophila melanogaster*. *Asian Journal of*

Pharmaceutical and Clinical Research. 2015. № 8. P.113–116.

142. Kafle L., Cheng-Jen S. Insecticidal Activities of Compounds from Sweet Flag (*Acorus Calamus*) against Red Imported Fire Ants *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*. 2017. № 64. P. 398–403.

143. Способность некоторых макрофитов ветлендов к снижению ХПК и удалению азота из бытовых сточных вод / Y. Donghai et al. *Chinese Journal of Applied Ecology*. 2004. № 12. С. 2237–2341.

144. Доочистка и обеззараживание сточных вод в биопруду с высшими водными растениями / Е. И. Гончарук, С. И. Гаркавый, В. Н. Попенко, В. В. Кравец, И. И. Бойко. *Химия и технол. воды*. 2004. № 5. С. 479–484.

145. Способ обеззараживания воды. Спосіб знезараження води : Пат. 68252 Украина. № 2003110813 ; заявл. 28.11.2003 ; опубл. 15.07.2004.

146. Parab R. S., Mengi S. A. Hypolipidemic activity of *Acorus calamus* L. in rats. *Fitoterapia*. 2002. № 73 (6). P.451–455.

147. Parab R. S., Meng S. A. Evaluation of hypolipidemic activity of *Acorus calamus* Linn. in rats. *Indian Drugs*. 2003. № 40. P. 25–29.

148. Synthesis and highly potent hypolipidemic activity of alpha-asarone- and fibrate-based 2-acyl and 2-alkyl phenols as HMG-CoA reductase inhibitors / A. Mendieta et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2014. № 22 (21). P. 5871–5882.

149. Seasonal Variation in Essential Oil Compositions and Antioxidant Properties of *Acorus calamus* L. / A. Parki et al. *Medicines*. 2017. № 8 (4). P81.

150. Divyasree P., Krishnan N. Protection of DNA and membrane from γ -radiation induced damage by the extract of *Acorus calamus* Linn.: An in vitro study. *Environmental toxicology and pharmacology*. 2010. № 29. P. 302–307.

151. Toxicity study of ethanolic extract of *Acorus calamus* rhizome / P. Shah et al. *International Journal of Green Pharmac*. 2012. № 6 (1). P. 29.

152. Muthuraman A., Singh N. Acute and sub-acute oral toxicity profile of *Acorus calamus* (Sweet flag) in rodents. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2012. № 2 (2). P. 1017–1023.

153. Nath Pu., Yadav A., Soren A. Sub-acute toxicity and genotoxicity

assessment of the rhizome extract of *acorus calamus* l., a medicinal plant of india. *European journal of pharmaceutical and medical research*. 2017. № 4. P. 392–399.

154. Goggelmann W., Schimmer O. Mutagenicity testing of β -asarone and commercial *calamus* drugs with *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research*. 1983. № 3-4. P. 191–194.

155. Structure-activity studies of the hepatocarcinogenicities of alkenylbenzene derivatives related to estragole and safrole on administration to preweanling male (C57BL/6J x C3H/HeJ) F1 mice / R. W. Wiseman et al. *Cancer Research*. 1987. № 9. P. 2275–2283.

156. Haupenthal S., Berg K., Gründken M. In vitro genotoxicity of carcinogenic asarone isomers. *Food & Function*. 2017. № 8 (3). P. 1227–1234.

157. Bioanalytical investigation of asarone in connection with *Acorus calamus* oil intoxications / K. Björnstad et al. *Journal of Analytical Toxicology*. 2009. № 33. P. 604–609.

158. Unger P., Melzig M. F. Comparative study of the cytotoxicity and genotoxicity of α - and β -asarone. *Scientia Pharmaceutica*. 2012. № 80. P. 663–668.

159. Pharmacology and toxicology of *Guatteria gaumeri* and α -asarone / G. Chamorro, M. Salazar, S. Salazar, T. Mendoza. *Rev. Invest. Clin*. 1993. № 6. P. 597–604

160. α -Asarone toxicity in long-term cultures of adult rat hepatocytes / M. L. Lopez et al. *Planta Med*. 1993. № 2. P. 15–20.

161. Povilaityte-Petri V. , Duez P. Use of Sweet flag (*Acorus calamus* L.) in Europe and Traditional Chinese Medicine. *The 6th Annual Meeting of the Good Practice in Traditional Chinese Medicine Research Association (GP-TCM RA)*, London, 2018. URL : <http://di.umons.ac.be/details.aspx?pub=2124fe35-64af-4446-aeb8-0bd2dce9cbfb> (Date of access 02.09.2020).

162. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. 11-ое изд. М.: Медицина, 1990. С. 359–361.

163. Государственная фармакопея Республики Беларусь. Т. 2. Контроль

качества вспомогательных веществ и лекарственного растительного сырья / МЗ РБ. М. : Победа, 2007. С. 301–302.

164. DAC (Deutscher Arzneimittel-Codex): DAC-Anlage E. Stuttgart: Deutscher Apotheker-Verlag. 2011. S. 4.

165. Österreichisches Arzneibuch, Amtliche Ausgabe. Wien: Verlag Österreich GmbH, 2006. S. 385–386.

166. Pharmacopoeia of the Peoples's Republic of China: English ed. Vol. 1. Beijing: Peoples Medical Publishing House. 2005.

167. Державна Фармакопея України / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-ге вид. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. Т. 1. 1110 с.

168. Державна Фармакопея України : в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків : Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. Т. 3. 732 с.

169. Бурцева О. В., Тернівко І. І. Вивчення полісахаридного складу *Avena sativa* L. *Вісник фармації*. 2010. № 2. С. 46–48.

170. Державна Фармакопея України / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Допов. 1. Харків : Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2016. 360 с.

171. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay / R. Re, et al. *Free Radic Biol Med*. 1999. № 26. P.1231–1237.

172. Гонтова Т. М., Кічимасова Я. С., Ільїнська Н. І. Вивчення вітамінного та елементного складу трави та бульб жоржини німфейної сорту Ken's flame. *Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупика*. 2014. № 23 (4). С. 245–249.

173. Золотайкина, М. Ю., Гонтовая Т. Н. Накопление элементов в сырье пижмы обыкновенной в зависимости от места. *Рецепт*. 2016. Т. 19, № 1. С. 26–30.

174. Bezruk, I., Marksa, M., Georgiyants, V., Ivanauskas, L., Raudone, L. Phytogeographical profiling of ivy leaf (*Hedera helix* L.). *Industrial Crops and Products*. 2020. № 154. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669020306300> (Date of access 02.09.2020).
175. Investigation of contribution of individual constituents to antioxidant activity in herbal drugs using postcolumn HPLC method / R. Raudonis et al. *Medicina*. 2009. № 45. P. 382–394.
176. Comparative evaluation of post-column free radical scavenging and ferric reducing antioxidant power assays for screening of antioxidants in strawberries / R. Raudonis et al. *J Chromatogr A*. 2012. № 1233. P. 8–15.
177. Development of an HPLC post-column antioxidant assay for *Solidago canadensis* radical scavengers / M. Marksa et al. *Natural Product Research*. 2016. № 30 (5). P. 536–543.
178. Соколова О. О., Гонтова Т. М. Порівняльний аналіз жирнокислотного складу органів соняшника однорічного. *Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупика*. 2014. № 23 (4). С. 250–253.
179. Endriukaitis T., Bezruk I. V., Marksa M., Konradas V. Determination of terpenoids in *Cannabis sativa* L. from north of lithuania by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) after hydrodistillation. *Topical issues of new medicines development* : матеріали XXVI Міжнар. наук.-практ. конф. молодих учених та студентів, м. Харків, 10-12 квіт. 2019 р. Харків : НФаУ, 2019. С. 81–82.
180. Гонтова Т. М., Ільїнська Н. І. Вивчення компонентного складу ефірної олії бульб жоржини німфейної. *Укр. біофармац. журн*. 2013. № 3 (26). С. 49–51.
181. Доклінічні дослідження лікарських засобів (метод. рекомендації). За ред. чл.-кор. НАМН України О. В. Стефанова. Київ: ВД «Авіцена», 2001. 528 с.
182. Bronner C., Landry Y. Kinetics of inhibitory effect of flavonoids on histamine secretion from mast cells. *Agents and Actions*. 1985. № 16. P. 147–151.
183. Маркив В. И., Ткачук О. Ю., Вишневецкая Л. И. Исследования технологических параметров семян моркови дикой. *Вестн. КазНМУ*. 2013. № 5. С. 13–16.

184. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Руденко В. П. Дослідження кількісного вмісту водорозчинних полісахаридів листя лепехи звичайної. *Сучасні проблеми фармакології, косметології та ароматології* : матеріали наук.-практ. конф., м. Одеса, 4 жовт. 2019 р. Одеса, 2019 р. С. 74–80.

185. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Гапоненко В. П. Дослідження кількісного вмісту полісахаридних фракцій листя лепехи звичайної. *Актуальні питання клінічної фармакології та клінічної фармації* : матеріали наук.-практ. internet-конф., м. Харків, 22-23 жовт. 2019 р. / редкол. : А. А. Котвіцька та ін. Х. : НФаУ, 2019. С. 341–347.

186. Яременко М.С. Изучение аминокислотного состава корневищ аира болотного / *Внедрение достижений медицинской науки в клиническую практику* : Сборник материалов X научно-практической конференции молодых ученых и студентов ТГМУ им. Абуали ибни Сино с международным участием. Душанбе, 2015. С. 371.

187. Яременко М. С., Гонтова Т. М. Порівняльний аналіз амінокислотного складу листя та корневищ лепехи звичайної. *Промислова фармація: Етапи становлення та майбутнє* : зб. наук. пр. Харків : Вид-во НФаУ, 2017. С. 137–140.

188. Гонтова Т. М., Яременко М. С. Хромато-мас-спектрометричне вивчення летких сполук корневищ лепехи звичайної. *Збірник наук. праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупика*. Київ, 2015, № 24, кн. 5. С. 77–82.

189. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Сіра Л. М. До питань використання та ідентифікації неофіційної сировини – листя *Asorus Calamus L.* *Медична та клінічна хімія*. 2018. № 0 (1). С. 105–110.

190. Яременко М.С. Кількісне визначення суми поліфенолів у корневищах та листі лепехи звичайної / М.С. Яременко, Т.М. Гонтова, Е.Е. Котова / *Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин*: матеріали III Міжнар. наук.–практ. internet–конф., м. Харків, 26–28 листопада. 2018 р. Харків, 2018. С.276–277.

191. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Котова Е. Е. Використання фармакопейних методик при вивченні флавоноїдів в сировині лепехи звичайної.

Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій : тези доп. Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяч. 80-річчю з дня народж. д-ра. фармац. наук, проф. О.М. Гайдукевича (12-13 квіт. 2018 р.). Харків : НФаУ, 2018. С. 313–314.

192. Yaremenko M. S., Gontova T. M., Kotova E. E. Perspective for using *Acorus Calamus* leaves in medicine. *Sciences and Pharmacy Practice 2018* : book of abstracts 9th International Conference dedicated to the 100-th anniversary of independent Lithuania's pharmacy, Kaunas, 9 November, 2018. P. 60.

193. Визначення антирадикальної активності кореневищ лепехи звичайної / М. С. Яременко, Т. М. Гонтова, І. В. Безрук, В. О. Грудько. *PLANTA+. Досягнення та перспективи* : матеріали Міжнар. наук.-практ. конф., присвяч. пам'яті д. хімічних наук, проф. Ніни Павлівни Максютіної до 95-річчя від дня народження, м. Київ, 20–21 лют. 2020 р. Київ : ПАЛИВОДА, 2020. С. 144–146.

194. Yaremenko M. S. Research of vitamin composition in leaves *Acorus Calamus* / M. S. Yaremenko, M. Gontova // *Topical issues of new drugs development* : Abstracts of XXIII International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student (April 21, 2016). In 2 vol.– Kharkiv : Publishing Office NUPh, 2016. Vol.1. P. 433.

195. Яременко М. С., Гонтовая Т. Н. Витаминный состав отечественного сырья корневищ аира обыкновенного. *Наука и медицина: современный взгляд молодежи* : сб. материалов IV междунар. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых Алматы, 20-21 апр. 2017 г. Алмата, 2017. С. 300–301.

196. The Story of Beta-sitosterol- A Review / S. Saeidnia et al. *European Journal of Medicinal Plants*. 2014. № 4 (5). P. 590–609.

197. Yaremenko M. S. Research elemental composition of domestic raw *acorus calamus* rhizomes. *Topical issues of new drugs development* : Abstracts of XXIV International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student, 20 April, 2017 : In 2 vol. Kh. : Publishing Office NUPh, 2017. Vol.1. P. 144–145.

198. Яременко М. С., Гонтова Т. М. Порівняльний аналіз елементного складу кореневищ та листя лепехи звичайної / *Науково-технічний прогрес і*

оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів : матеріали VII наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 27-28 верес. 2018 р. Тернопіль : ТДМУ, 2018. С. 57–58.

199. Котов А. Г. Правила викладання та порядок розробки монографій на лікарську рослинну сировину. Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. 2011. № 6, ч. 1. С. 16–22.

200. Котов А. Г. Правила викладання та порядок розробки монографій на лікарську рослинну сировину. Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. 2012. № 1, ч. 2. С. 4–10.

201. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Котова Е. Е. Терміни заготівлі листя лепехи звичайної (*Acorus Calamus* L.) : інформ. лист № 367-2018 / Український центр наукової медичної інформації та патентоліцензійної роботи (Укрмедпатентінформ). Київ, 2018. Вип. 40. (Рішення ЕПК “Фармація” Протокол № 104 від 24.10.2018 р.).

202. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Сіра Л. М. Азарон. Фармацевтична енциклопедія / гол. ред. ради та автор передмови В. П. Черних. URL : <http://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/14192/azaron> (дата звернення: 02.09.2020).

203. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Котова Е. Е. Перспективи застосування денситометрії при визначенні кількісного вмісту азарону в кореневищах лепехи звичайної. *Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку* : матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяч. 20-й річниці заснування Дня фармац. працівника України, м. Харків, 19-20 верес. 2019 р. : у 2 т. / редкол. : А. А. Котвіцька та ін. Харків : НФаУ, 2019. Т. 1. С. 281–282.

204. Yaremenko M. S., Gontova T. M., Mashtaler V. V., Kotova E. E., Kotov A. G. Development of method for identification and determination of limit content of asarone in *Acorus Calamus* rhizomes. *Research J. Pharm. and Tech.* 2018. Vol. 11, №6. P. 2263–2266.

205. Спосіб ідентифікації кореневищ лепехи звичайної з подальшим визначенням граничного вмісту азарону : пат. 133674 України. № u201805081 ; заявл. 05.08.2018 ; опубл. 25.04.2019, бюл. №8.

206. Yaremenko M. S., Gontova T. M. Quantification of asarone in *Acorus calamus* by RP-HPLC. *Science and modern pharmaceutical manufacturing* : VII Annual scientific and practical conference of Farmak's School of young scientists with international involvement, Kyiv, 21 November, 2019. *Укр. Мед. Часопис*. 2019. Т. 2, № 6 (134). P.16–17.

207. Yaremenko M., Gontova T. The technology of production and quality assessment of the *calamus* liuid extract. *International independent scientific journal*. 2020. № 12. P. 47–51.

208. Yaremenko M., Gontova T., Boryak L., Mala O., Andryushayev O. Determination of optimal extraction conditions of phenolic compounds from *Acorus calamus* leaves / *EUREKA: Health Sciences*. 2020. № 3. P. 63–70.

209. Спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу на основі рослинної сировини з протизапальною дією : пат. 138526 України. № u201906408 ; заявл. 10.06.2019 ; опубл. 25.11.2019, бюл. №22.

210. Заявка на патент на винахід a201906407 від 10.06.2019 «Спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу на основі рослинної сировини з протизапальною дією».

211. Яременко М. С., Гонтова Т. М. Контроль якості препаратів на основі лепехи звичайної. *Матеріали V науково-практичної конференції Школи молодих науковців ПАТ «Фармак»*. Київ, 2017 С. 49–51.

212. Derymedvid L. L., Korang L., Shakina L. O. Comparative cytotoxic analysis of extracts obtained from leaves and roots of sweet flag (*Acorus calamus* L.) on rat bone marrow cells in vitro. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2020. № 1 (23). P. 17–22.

213. Корган Л. А., Яременко М. С. Питання безпеки спиртового екстракту листя лепехи звичайної. *Фармакоекономіка в Україні: стан та перспективи розвитку* : матеріали X наук.-практ. конф., м. Харків, 21 трав. 2018 р. Харків : Вид-во НФаУ, 2018. С. 44.

214. Деримедвідь Л. В., Коранг Л. А. Дослідження жовжогінної активності екстракту листя лепехи звичайної за умов субхронічного гепатиту у щурів. *Сучасні досягнення та перспективи розвитку анітеранії в Україні* : матеріали Всеукр.

наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Харків, 25 січ. 2020 р. Харків : Вид-во «Оригінал», 2020. С. 70.

215. Derymedvid L. V., Korang L. A., Tsyvunin V. V. The experimental study of psychotropic and neurotropic properties of *Acorus calamus* leaves. *Клінічна фармація*. 2019. Т. 23, № 4. С. 10–16.

216. Компендиум 2015 лекарственные препараты / под ред. В. Н. Коваленко. К.: Морион, 2015. 2320 с.

217. Bronner C., Landry Y. Kinetics of inhibitory effect of flavonoids on histamine secretion from mast cells. *Agents and Actions*. 1985. № 16. P. 147–151.

218. Доклінічні дослідження лікарських засобів (метод. рекомендації). За ред. чл.-кор. НАМН України О. В. Стефанова. Київ: ВД «Авіцена», 2001. 528 с.

ДОДАТКИ

Додаток А

Список публікацій здобувача

1. Гонтова Т. М., Яременко М. С. Хромато-мас-спектрометричне вивчення летких сполук кореневищ лепехи звичайної. *Збірник наук. праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупика*. Київ. 2015. Вип.24, книга 5. С. 77-82.
2. Підходи до розробки монографії «Лепехи звичайної кореневища» для включення у Державну фармакопею України / М. С. Яременко, Т. М. Гонтова, Л. М. Сіра, Е.Е. Котова, А.Г. Котов. *Управління, економіка та забезпечення якості в фармації*. 2017. № 1 (49). С. 22–26.
3. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Сіра Л. М. До питань використання та ідентифікації неофіцінальної сировини – листя *Acorus calamus* L. *Медична та клінічна хімія*. 2018. № 0 (1). С.105–110.
4. Yaremenko M. S., Gontova T. M., Mashtaler V. V., Kotova E. E., Kotov A. G. Development of method for identification and determination of limit content of asarone in *Acorus calamus* rhizomes. *Research J. Pharm. and Tech.* 2018. Vol. 11 (6). P. 2263–2266.
5. Yaremenko M., Gontova T., Boryak L., Mala O., Andryushayev O. Determination of optimal extraction conditions of phenolic compounds from *Acorus calamus* leaves. *EUREKA: Health Sciences*. 2020. № 3 P. 63–70.
6. Yaremenko M., Gontova T. The technology of production and quality assessment of the calamus liuid extract. *International independent scientific journal*. 2020. № 12. P. 47–51.
7. Спосіб ідентифікації кореневищ лепехи звичайної з подальшим визначенням граничного вмісту азарону : пат. 133674 України № u201805081; заявл. 05.08.2018 ; опубл. 25.04.2019, бюл. №8.
8. Спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу на основі рослинної сировини з протизапальною дією : пат. 138526 України № u201906408 ; заявл. 10.06.2019 ; опубл. 25.11.2019, бюл. №22.
9. Яременко М. С. Изучение аминокислотного состава кореневищ аира болотного / *Внедрение достижений медицинской науки в клиническую практику* :

сб. материалов X науч.-практ. конф. молодых ученых и студентов ТГМУ им. Абуали ибни Сино с международным участием. Душанбе, 2015. С. 371.

10. Yaremenko M. S., Gontova T. M. Research of vitamin composition in leaves *Acorus calamus*. *Topical issues of new drugs development : abstracts of XXIII International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student* 21 April, 2016 : In 2 vol. Kharkiv : Publishing Office NUPh, 2016. Vol.1. 433 p.

11. Яременко М. С., Гонтова Т. М. Порівняльний аналіз амінокислотного складу листя та кореневищ лепехи звичайної // Промислова фармація: Етапи становлення та майбутнє: збірник наукових праць. Х.: Вид-во НФаУ, 2017. С. 137–140.

12. Яременко М. С., Гонтова Т. М. Контроль якості препаратів на основі лепехи звичайної. *Матеріали V науково-практичної конференції Школи молодих науковців ПАТ «Фармак»*. Київ, 2017 С. 49–51.

13. Yaremenko M. S. Research elemental composition of domestic raw *Acorus calamus* rhizomes. *Topical issues of new drugs development : Abstracts of XXIV International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student*, 20 April, 2017 : In 2 vol. Kh. : Publishing Office NUPh, 2017. Vol.1. P. 144–145.

14. Яременко М. С., Гонтовая Т. Н. Витаминный состав отечественного сырья корневищ аира обыкновенного. *Наука и медицина: современный взгляд молодежи* : сб. материалов IV междунар. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых Алматы, 20-21 апр. 2017 г. Алмата, 2017. С. 300-301.

15. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Котова Е. Е. Використання фармакопейних методик при вивченні флавоноїдів в сировині лепехи звичайної. *Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій* : тези доп. Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяч. 80-річчю з дня народж. д-ра. фармац. наук, проф. О.М. Гайдукевича (12-13 квіт. 2018 р.). Харків : НФаУ, 2018. С. 313–314.

16. Яременко М. С., Гонтова Т. М. Порівняльний аналіз елементного складу кореневищ та листя лепехи звичайної / *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів* : матеріали

VII наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 27-28 верес. 2018 р. Тернопіль : ТДМУ, 2018. С. 57–58.

17. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Котова Е. Е. Кількісне визначення суми поліфенолів у кореневищах та листі лепехи звичайної. *Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин* : матеріали III Міжнар. наук.–практ. internet–конф., м. Харків, 26–28 листоп. 2018 р. Харків, 2018. С. 276–277.

18. Корган Л. А., Яременко М. С. Питання безпеки спиртового екстракту листя лепехи звичайної. *Фармакоекономіка в Україні: стан та перспективи розвитку* : матеріали X наук.-практ. конф., м. Харків, 21 трав. 2018 р. Харків : Вид-во НФаУ, 2018. С. 44.

19. Yaremenko M. S., Gontova T. M., Kotova E. E. Perspective for using *Acorus calamus* leaves in medicine. *Sciences and Pharmacy Practice 2018* : Book of abstracts 9th International Conference dedicated to the 100-th anniversary of independent Lithuania's pharmacy, Kaunas, 9 November, 2018. P. 60.

20. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Руденко В. П. Дослідження кількісного вмісту водорозчинних полісахаридів листя лепехи звичайної. *Сучасні проблеми фармакології, косметології та ароматології* : матеріали наук.-практ. конф., м. Одеса, 4 жовт. 2019 р. Одеса, 2019 р. С. 74–80.

21. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Котова Е. Е. Перспективи застосування денситометрії при визначенні кількісного вмісту азарону в кореневищах лепехи звичайної. *Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку* : матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяч. 20-й річниці заснування Дня фармац. працівника України, м. Харків, 19-20 верес. 2019 р. : у 2 т. / редкол. : А. А. Котвіцька та ін. Харків : НФаУ, 2019. Т. 1. С. 281–282.

22. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Гапоненко В. П. Дослідження кількісного вмісту полісахаридних фракцій листя лепехи звичайної. *Актуальні питання клінічної фармакології та клінічної фармації* : матеріали наук.-практ. internet-конф., м. Харків, 22-23 жовт. 2019 р. / редкол. : А. А. Котвіцька та ін. Х. : НФаУ, 2019. С. 341–347.

23. Yaremenko M. S., Gontova T. M. Quantification of asarone in *Acorus calamus* by RP-HPLC. *Science and modern pharmaceutical manufacturing* : VII Annual scientific and practical conference of Farmak's School of young scientists with international involvement, Kyiv, 21 November, 2019. *Укр. Мед. Часопис*. 2019. Т. 2, № 6 (134). P.16–17.

24. Визначення антирадикальної активності кореневищ лепехи звичайної / М. С. Яременко, Т. М. Гонтова, І. В. Безрук, В. О. Грудько. *PLANTA+. Досягнення та перспективи* : матеріали міжнар. наук.-практ. конф., присвяч. пам'яті д. хімічних наук, проф. Ніни Павлівни Максютіної до 95-річчя від дня народження, м. Київ, 20–21 лют. 2020 р. Київ : ПАЛИВОДА, 2020. С. 144–146.

25. Перспективність розробки нових препаратів на основі листя лепехи звичайної / О. В. Андрюшаєв, О. А. Рубан, Ю. С. Маслій, М. С. Яременко. *Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації* : тези доп. II наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених з міжнар. участю, 15 травн. 2020 р. Харків : Вид-во НФаУ, 2020. С. 28–29.

26. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Котова Е. Е. Терміни заготівлі листя лепехи звичайної (*Acorus calamus* L.) : інформ. лист № 367-2018 / Український центр наукової медичної інформації та патентоліцензійної роботи (Укрмедпатентінформ). Київ, 2018. Вип. 40. (Рішення ЕПК “Фармація” Протокол № 104 від 24.10.2018 р.).

Продовж. дод. А

Апробація результатів дисертації

1. X научно-практической конференции молодых ученых и студентов ТГМУ им. Абуали ибни Сино «Внедрение достижений медицинской науки в клиническую практику» с международным участием (Душанбе, 24 квітня 2015 р., форма участі – публікація тез);
2. Topical issues of new drugs development : Abstracts of XXIII International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student (Харків, 21 квітня 2016 р. , форма участі – публікація тез);
3. Міжнародній науково-практичній конференції «Промислова фармація: етапи становлення та майбутнє» (Харків, 29-30 вересня 2017 р. , форма участі – публікація тез);
4. V науково-практичній конференції Школи молодих науковців ПАТ «Фармак» (Київ, 19 жовтня 2017 р., форма участі – публікація тез);
5. XXIV International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student «Topical issues of new drugs development» (Харків, 20 квітня 2017 р. , форма участі – публікація тез);
6. IV Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Наука и медицина: современный взгляд молодежи» (Алмата, 20-21 квітня 2017 р., форма участі – публікація тез);
7. Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій», присвяченій 80-річчю від дня народження доктора фармацевтичних наук, професора О.М. Гайдукевича (Харків, 12-13 квітня 2018 р. , форма участі – публікація тез);
8. VII науково-практичній конференції з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (Тернопіль, 27-28 вересня 2018 р. , форма участі – публікація тез);
9. III науково-практичній internet–конференції «Теоретичні та практичні

- аспекти дослідження лікарських рослин» (Харків, 26–28 листопада 2018 р., форма участі – публікація тез);
10. 9th International Conference «Sciences and Pharmacy Practice 2018» dedicated to the 100-th anniversary of independent Lithuania's pharmacy (Каунас, 9 листопада 2018 р., форма участі – публікація тез);
11. Науково-практичній конференції «Сучасні проблеми фармакології, косметології та ароматології» (Одеса, 04 жовтня 2019 р., форма участі – публікація тез);
12. науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку», присвяченої 20-й річниці заснування Дня фармацевтичного працівника України (Харків, 19-20 вересня 2019 р., форма участі – публікація тез);
13. науково-практичній internet-конференції «Актуальні питання клінічної фармакології та клінічної фармації» (Харків, 22-23 жовтня 2019 р., форма участі – публікація тез);
14. VII scientific and practical conference of Farmak's School of young scientists with international involvement «Science and modern pharmaceutical manufacturing» (Київ, 21 листопада 2019 р., форма участі – публікація тез);
15. Міжнародній науково-практичній конференції «PLANTA+. Досягнення та перспективи», присвяченій пам'яті доктора хімічних наук, професора Ніни Павлівни Максютіної (до 95-річчя від дня народження) (Київ, 20–21 лютого 2020 р., форма участі – публікація тез);
16. II науково-практичній конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації» (Харків, 15 травня 2020 р., форма участі – публікація тез).

Додаток Б

Результати аналізу листя та кореневищ лепехи звичайної

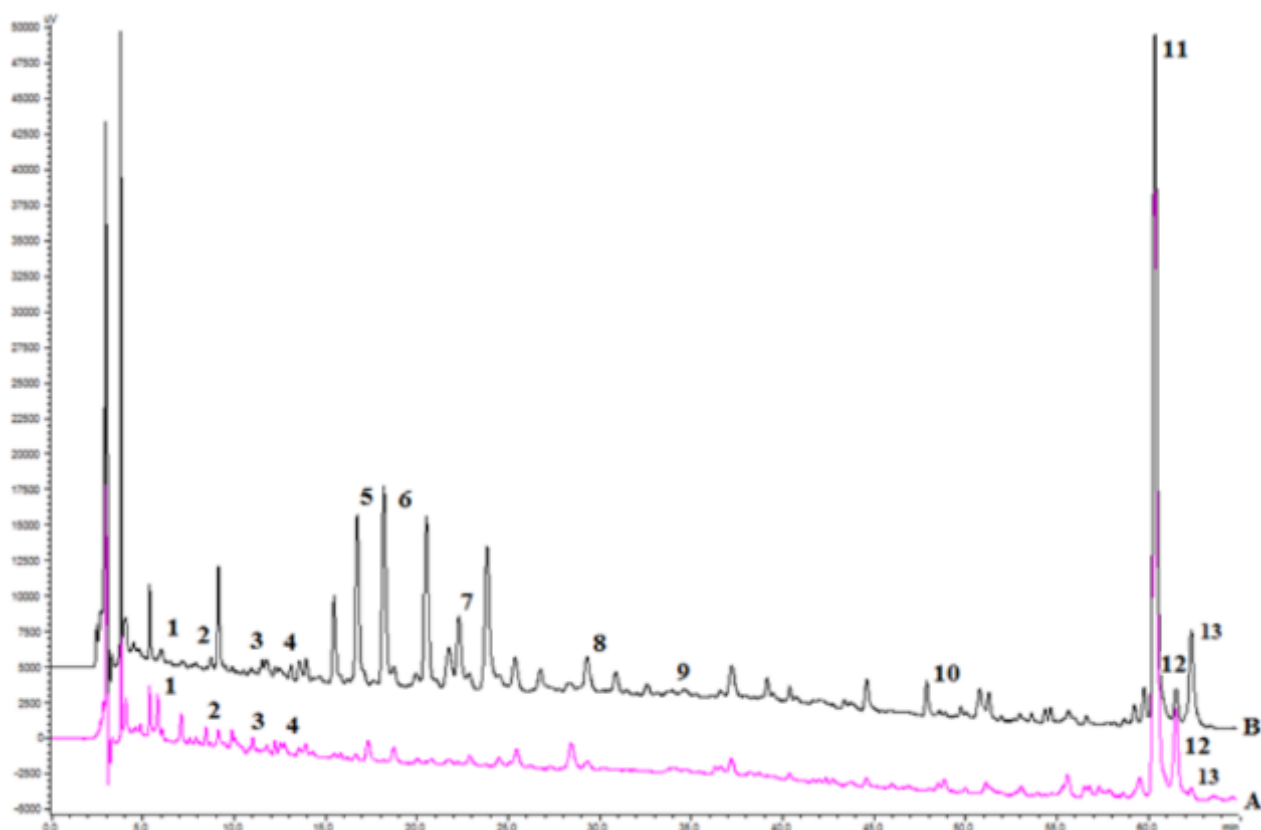


Рис. Б.1 Хроматограма розчину порівняння кореневищ (А) та листя (В) лепехи звичайної.

1 – галова кислота; 2 – неохлорогенна кислота; 3 – хлорогенна кислота; 4 – кофеїнова кислота; 5 – ізоорієнтін; 6 – робінін; 7 – рутин; 8 – трифолін; 9 – апігенін; 10 – апігенін-7-глюкозид; 11 – β - азарон; 12 – акацетин; 13 – α - азарон.

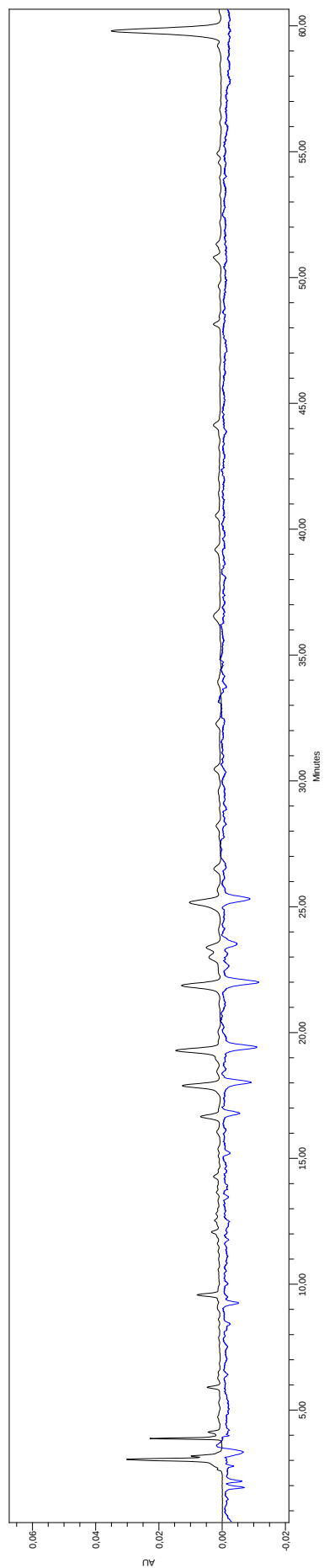


Рис. Б.2 Хроматограма випробовуваного розчину листя при дослідженні антирадикальної активності

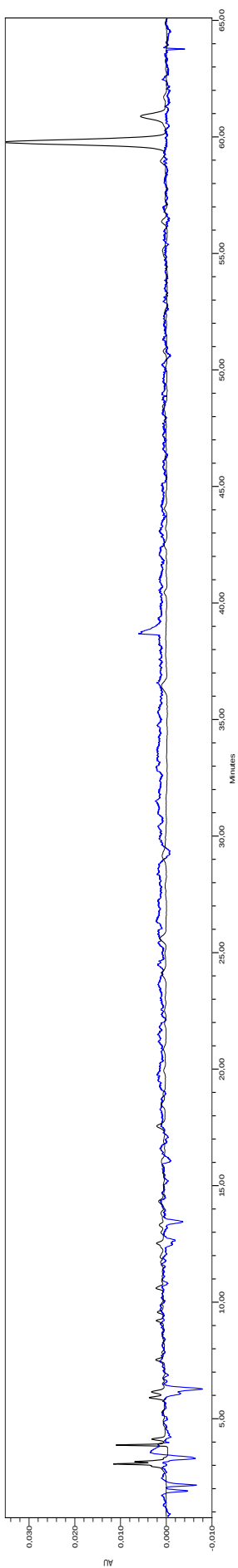


Рис. Б.3 Хроматограма випробовуваного розчину кореневищ при дослідженні антирадикальної активності

Продовж. дод. Б

Результати визначення специфічності методики кількісного визначення азарону

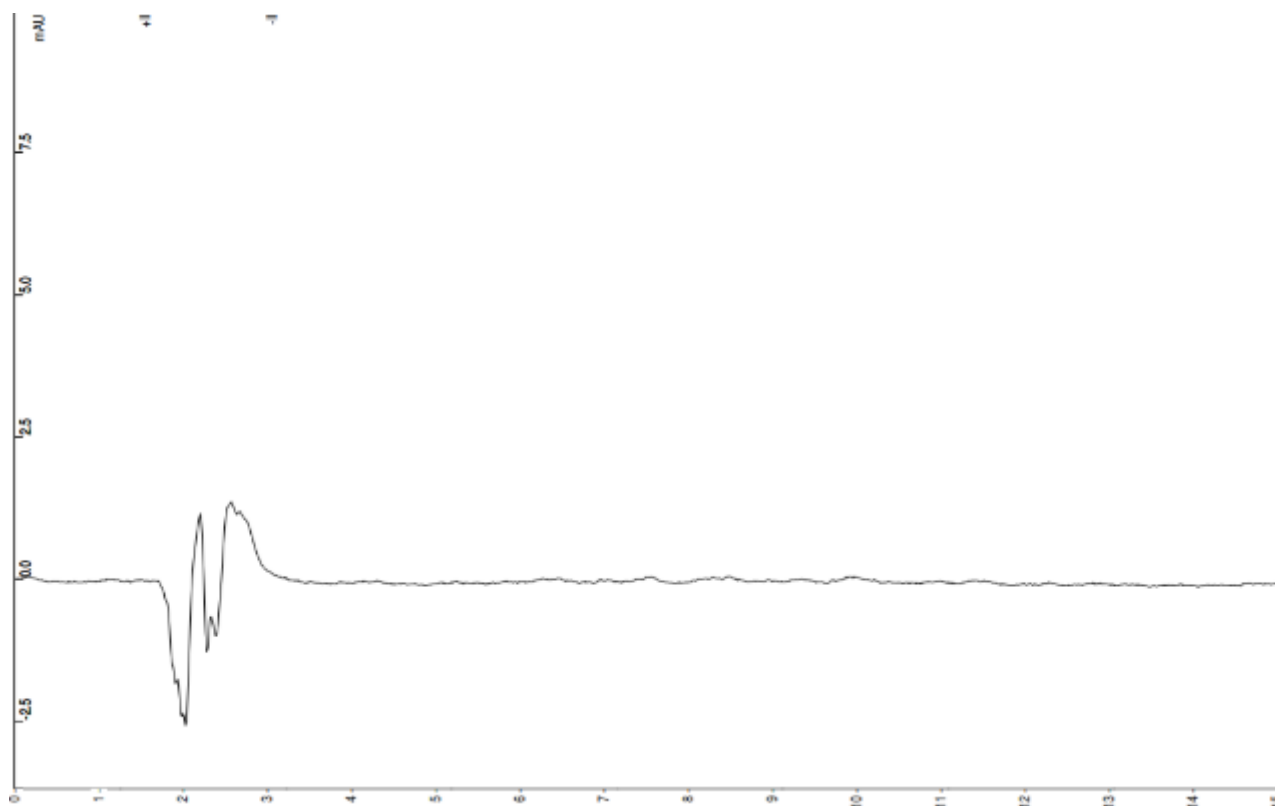


Рис. Б.4 Хроматограма бланк-розчину (розчинника)

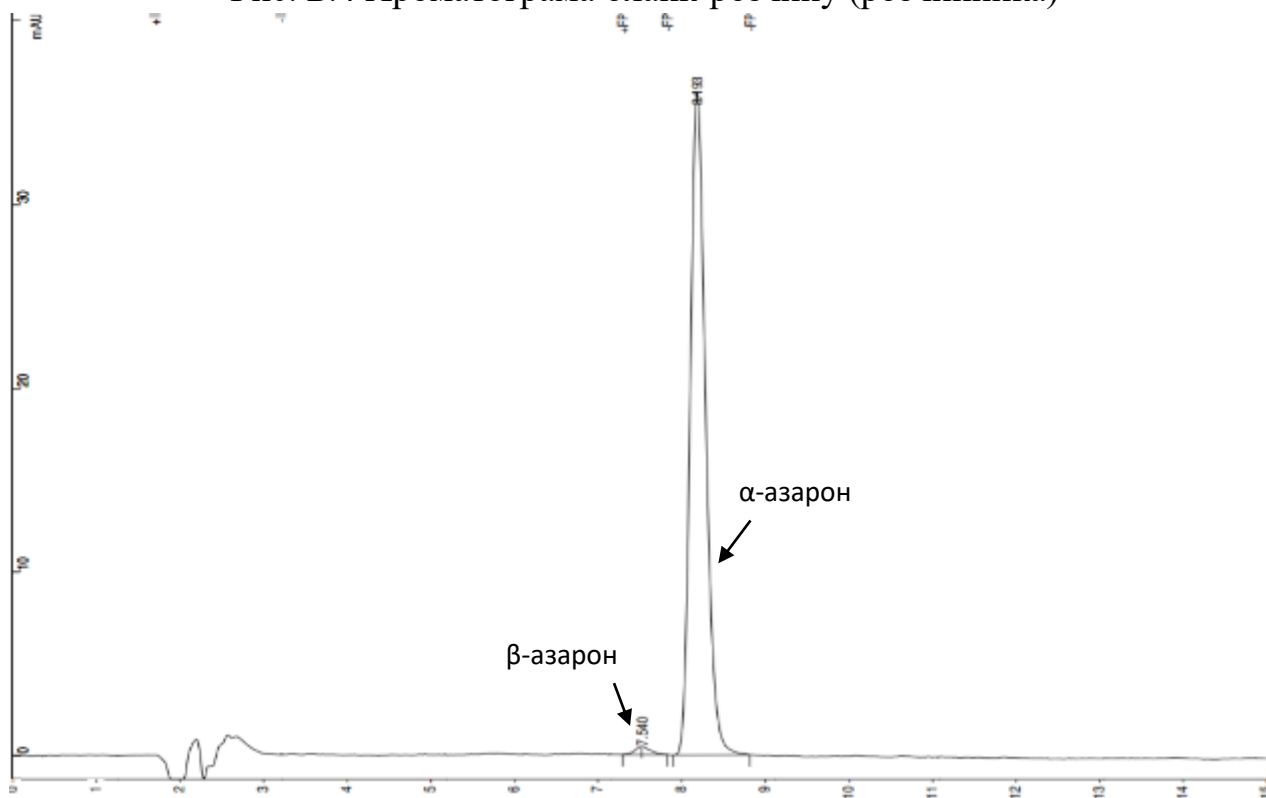


Рис. Б.5 Хроматограма розчину порівняння

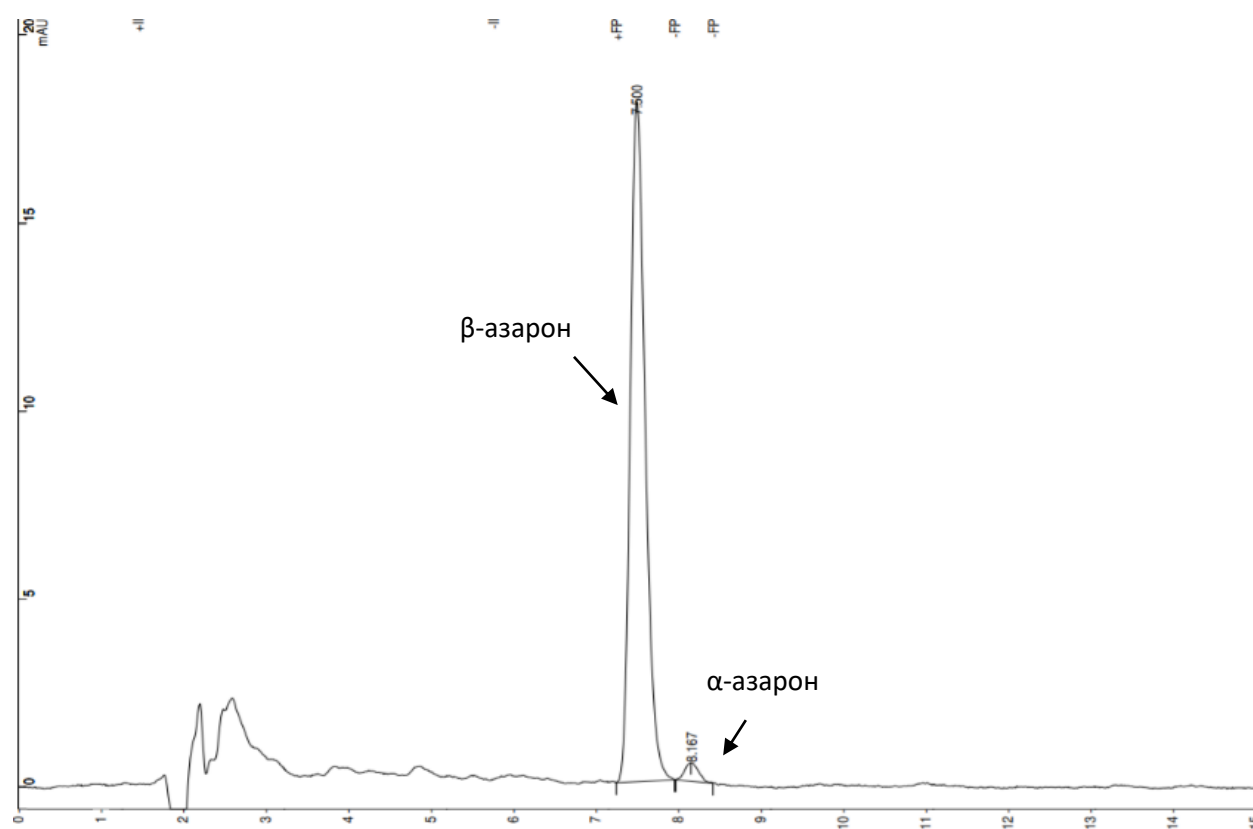


Рис. Б.6 Хроматограма випробовуваного розчину

Додаток В

Результати визначення хімічного складу отриманих екстрактів

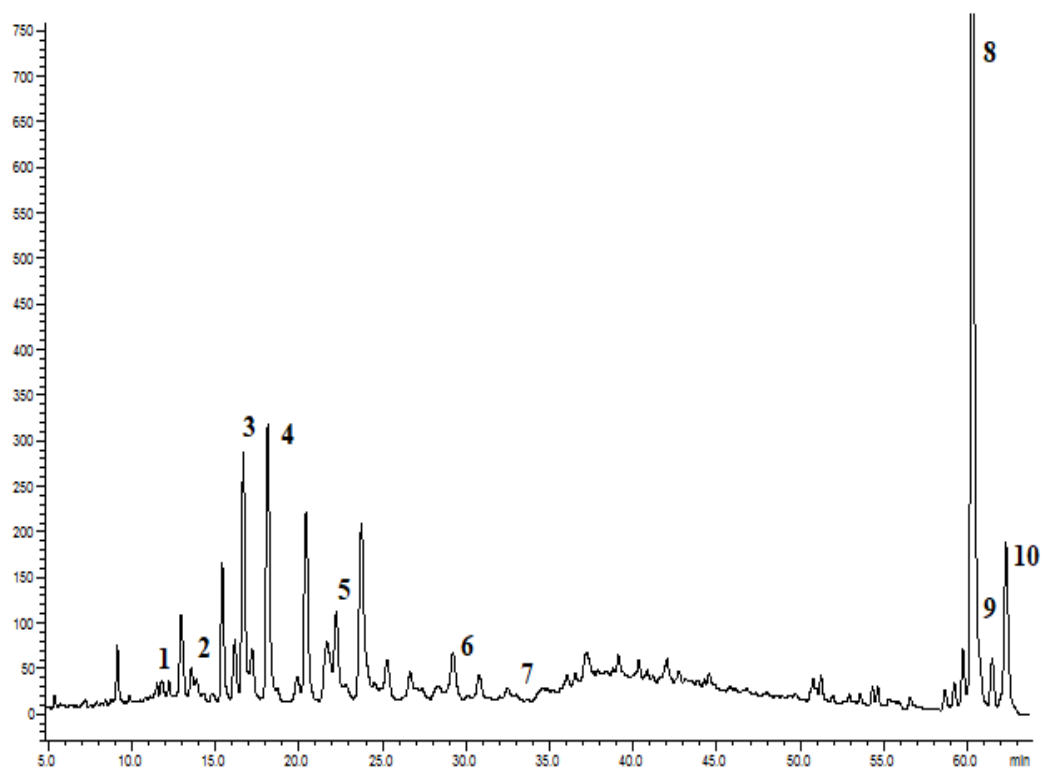


Рис. В.1 Хроматограма екстракту листя лепехи звичайної при дослідженні сполук фенольної природи

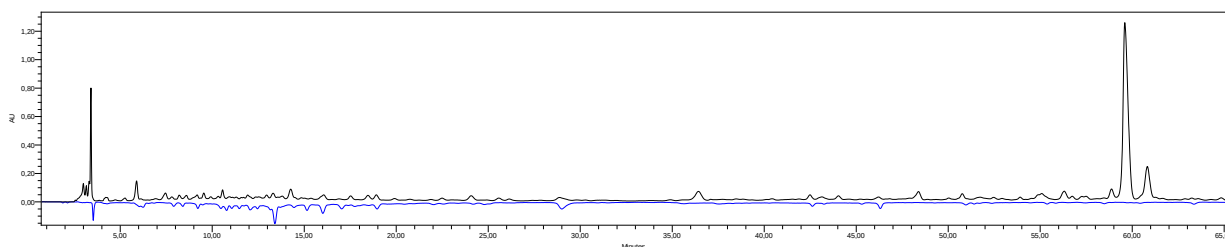


Рис. В.2 Хроматограма випробовуваного розчину екстракту кореневищ лепехи звичайної при дослідженні антирадикальної активності

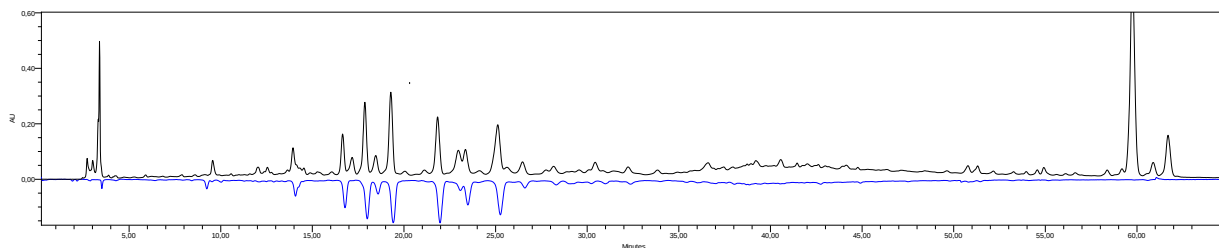


Рис. В.3 Хроматограма випробовуваного розчину екстракту листя лепехи звичайної при дослідженні антирадикальної активності

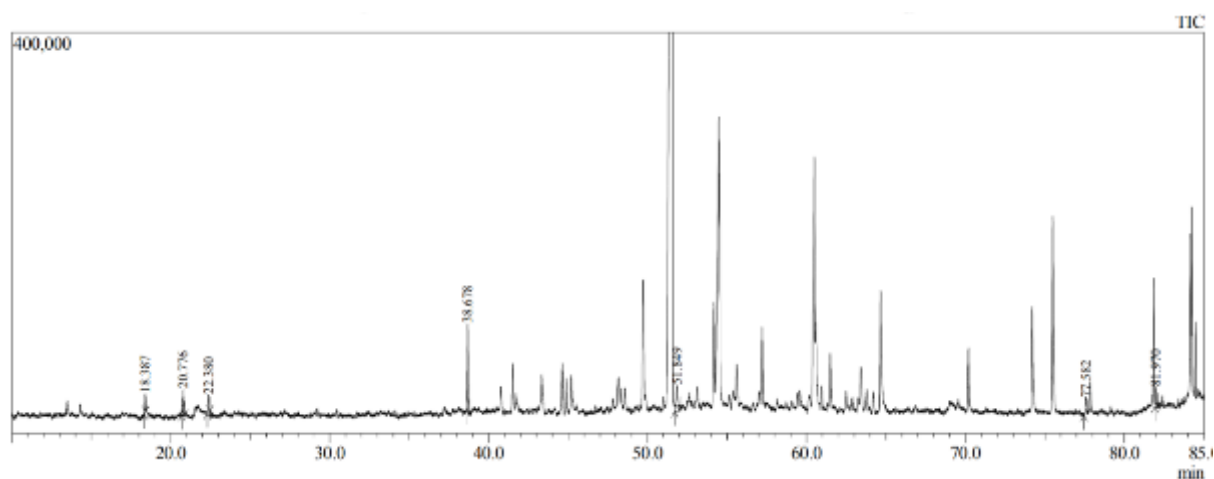


Рис. В.4 Хроматограма дослідження компонентного складу летких сполук у екстракті листя лепехи звичайної

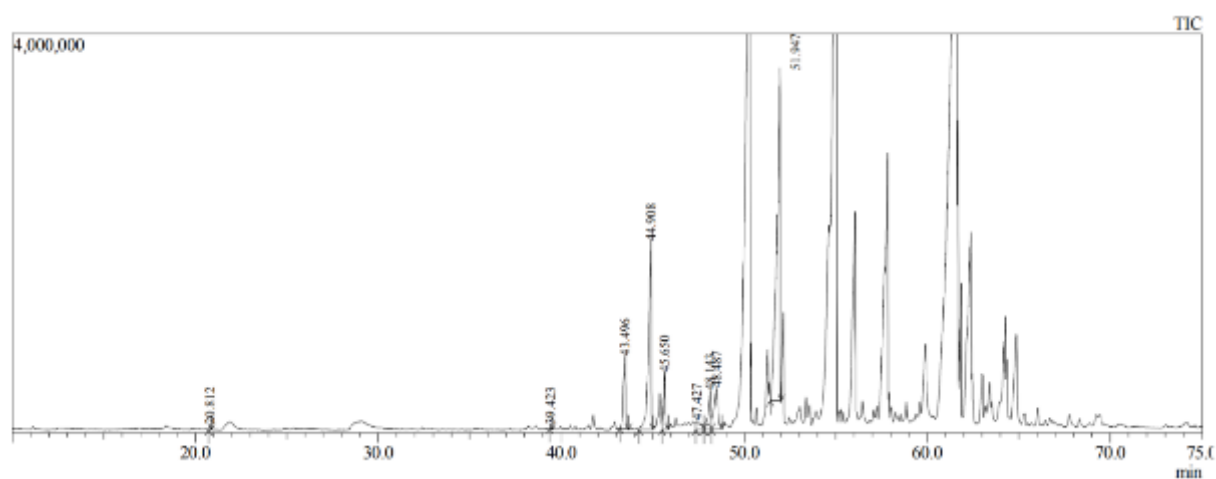


Рис. В.5 Хроматограма дослідження компонентного складу летких сполук у екстракті кореневищ лепехи звичайної

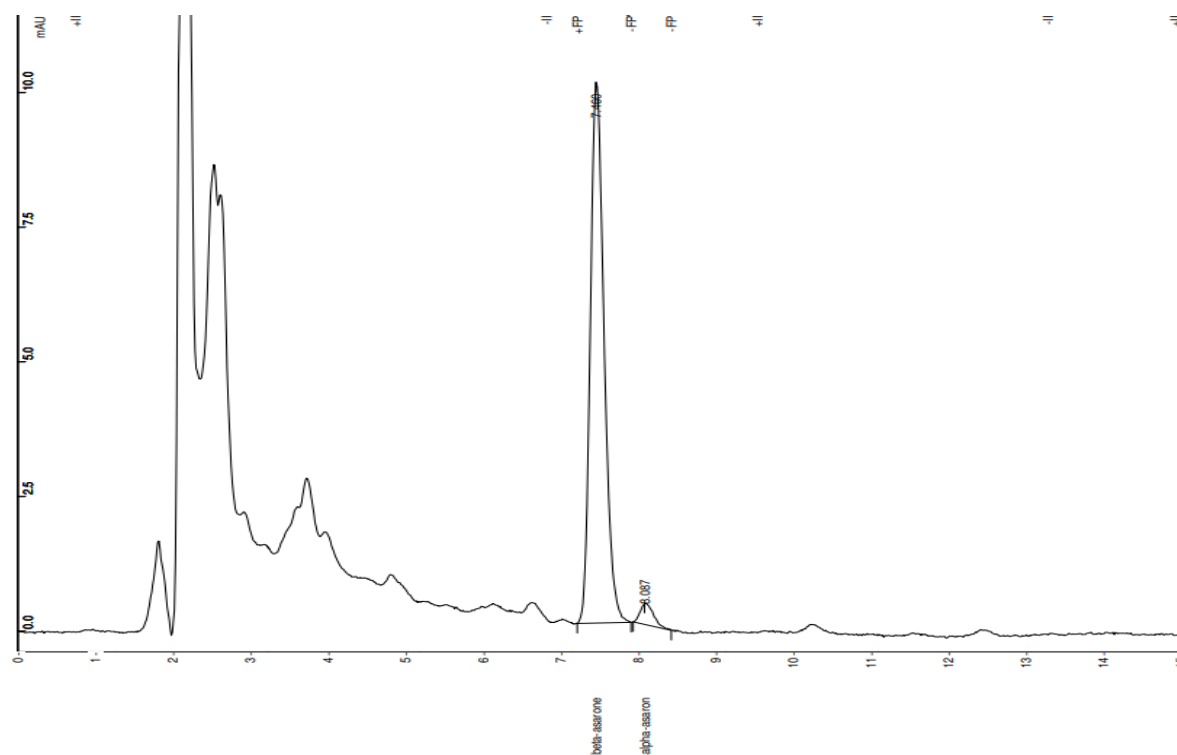


Рис. В.6 Хроматограма кількісного визначення азарону в екстракті кореневищ лепехи звичайної

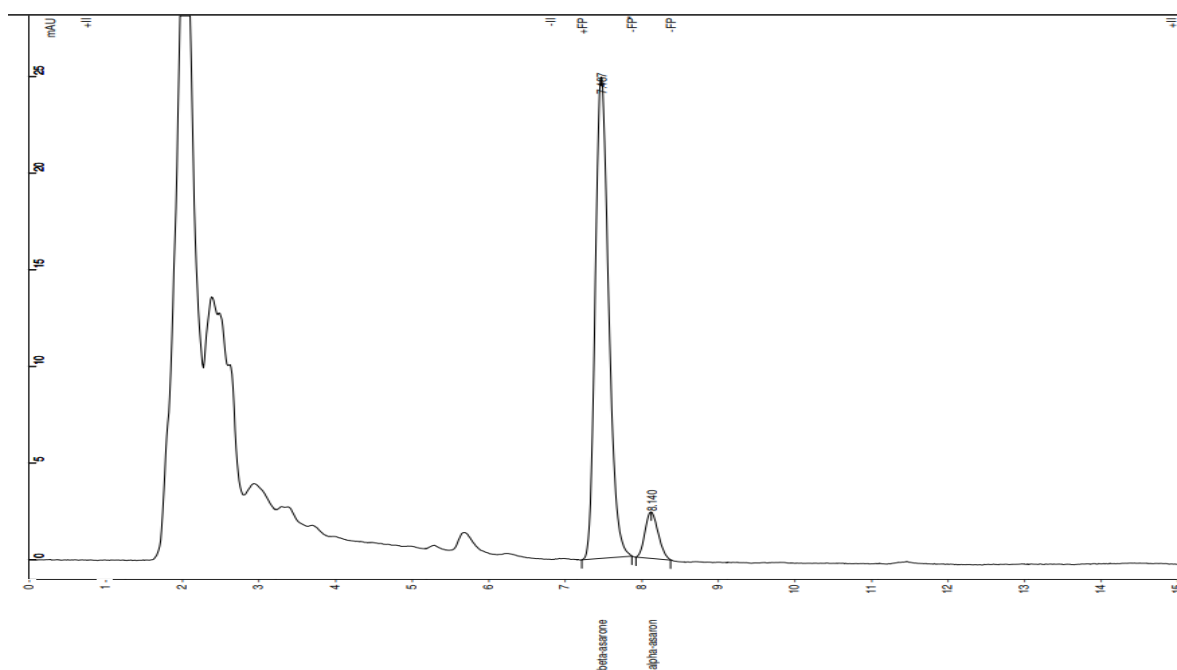


Рис. В. 7 Хроматограма кількісного визначення азарону в екстракті листя лепехи звичайної

Додаток Г



Продовж. дод. Г



Продовж. дод. Г

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
Український центр наукової медичної інформації
та патентно-ліцензійної роботи
(Укрмедпатентінформ)

ІНФОРМАЦІЙНИЙ ЛИСТ

ПРО НОВОВВЕДЕННЯ В СФЕРІ ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я

№ 367- 2018

Випуск 40 з проблеми

«Фармація»

Підстава: рішення ЕПК «Фармація»

Протокол № 104 від 24.10.2018 р.

НАПРЯМ ВПРОВАДЖЕННЯ:
ФАРМАЦІЯ.

ТЕРМІНИ ЗАГОТІВЛІ ЛИСТЯ ЛЕПЕХИ ЗВИЧАЙНОЇ (*ACORUS CALAMUS* L.)

УСТАНОВИ-РОЗРОБНИКИ:

НАЦІОНАЛЬНИЙ
ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

УКРМЕДПАТЕНТІНФОРМ
МОЗ УКРАЇНИ

А В Т О Р И:

ЯРЕМЕНКО М.С.,
д. фарм.н., проф. ГОНТОВА Т.М.,
канд. фарм. н., доц. КОТОВА Е.Е.

м. Київ

Продовж. дод. Г



«Затверджую»

Професор з науково-педагогічної роботи

Національного фармацевтичного університету

Проф.

І.М. Владимірова

2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція до впровадження:** Методи ідентифікації та кількісного визначення азарону у кореневищах лепехи звичайної та розробка монографії для включення у Державну Фармакопею України.
 2. **Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет, кафедра ботаніки, аспірант Яременко М.С., Гонтова Т.М.
 3. **Джерела інформації:**
 - Яременко М.С. Підходи до розробки монографії «Лепехи звичайної кореневища» для включення у Державну Фармакопею України / М.С. Яременко, Т.М. Гонтова, Л.М. Сіра та ін. // Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. – 2017. – № 1 (49). – с. 22–26.
 - Yaremenko M.S. Development of method for identification and determination of limit content of asarone in Acorus Calamus rhizomes / [M.S. Yaremenko, T.M. Gontova, V.V. Mashtaler and other] // Research J. Pharm. and Tech. – 2018. – Vol. 11(6). P. 2263-2266.
- Запропоновані дані, щодо методів ідентифікації та кількісного визначення азарону у кореневищах лепехи звичайної.
4. **Де впроваджено:** кафедра фармакогнозії Національного фармацевтичного університету.
 5. **Форма впровадження:** наукова робота та навчальний процес.
 6. **Ефект від впровадження:** поглиблення знань студентів та науковців з питань ідентифікації та кількісного визначення лікарської рослинної сировини лепехи звичайної.
 7. **Строки впровадження:** 2020-2021 навчальний рік.

Завідувач кафедри фармакогнозії
Національного фармацевтичного університету,
професор

О.М. Кошовий

Продовж. дод. Г

«Затверджую»

Проректор з наукової роботи

Івано-Франківського

національного медичного університету

проф.  І.П. Вакалюк

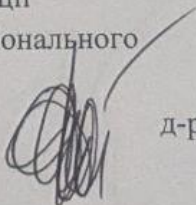
«28»  2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція до впровадження:** Хромато-мас-спектрометричне вивчення летких сполук кореневищ лепехи звичайної.
2. **Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет, кафедра ботаніки, аспірант Яременко М.С., Гонтова Т.М.
3. **Джерела інформації:** Збірник наук. праць співробітників НМАПО ім. – Шупика. Київ – 2015 – Вип.24, книга 5. – С. 77 - 82.
4. **Де впроваджено:** кафедра фармації Івано-Франківського національного медичного університету.
5. **Форма впровадження:** навчальний процес, у лекційному курсі.
6. **Ефект від впровадження:** поглиблення знань студентів та науковців з питань хімічного складу лікарської рослинної сировини. Проведений комплекс досліджень дозволив вивчити леткі сполуки кореневищ лепехи звичайної.
7. **Строки впровадження:** 2020-2021 навчальний рік.

Завідувач кафедри фармації

Івано-Франківського національного
медичного університету



д-р фарм.н., професор Грицик А.Р.

Продовж. дод. Г

«Затверджую»
 Проректор з міжнародних зв'язків
 ПВНЗ «Київський медичний
 університет»
 проф.  Мегедь
 «28» вересня 2020 р.

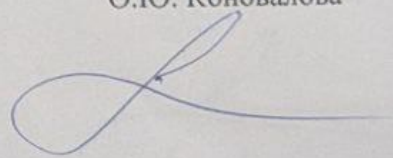


АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція до впровадження:** Методи ідентифікації фенольних сполук листя лепехи звичайної, підбір умов та технологія рідкого екстракту на основі сировини лепехи звичайної.
2. **Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет, кафедра ботаніки, аспірант Яременко М.С., Гонтова Т.М.
3. **Джерела інформації:**
 - Яременко М.С. До питань використання та ідентифікації неофіційної сировини – листя *Acorus Calamus* L. / М.С. Яременко, Т.М. Гонтова, Л.М. Сіра // . Медична та клінічна хімія. – 2018. – № 0 (1). – с. 105-110.
 - M. Yaremenko Determination of optimal extraction conditions of phenolic compounds from *Acorus calamus* leaves / M.S. Yaremenko, T. Gontova, L. Boryak, O. Mala, O. Andryushayev // EUREKA: Health Sciences. – 2020. – № 3 – P. 63–70.
 - Yaremenko M., Gontova T. The technology of production and quality assessment of the calamus liuid extract. International independent scientific journal. – 2020. – № 12 – P. 47–51
4. **Де впроваджено:** кафедра фармацевтичної і біологічної хімії, фармакогнозії Київського медичного університету.
5. **Форма впровадження:** наукова робота та навчальний процес.
6. **Ефект від впровадження:** поглиблення знань студентів та науковців з питань ідентифікації фенольних сполук листя лепехи звичайної, підбір умов та технологія рідкого екстракту на основі сировини лепехи звичайної.
7. **Строки впровадження:** 2020-2021 навчальний рік.

Завідувач кафедри фармацевтичної
 і біологічної хімії, фармакогнозії
 ПВНЗ «Київський медичний університет»,
 професор

О.Ю. Коновалова



Продовж. дод. Г

«Затверджую»



Проректор з наукової роботи Запорізького
Державного медичного університету
проф. В.О. Туманський
« 02 » 09 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція до впровадження:** Методи ідентифікації листя лепехи звичайної та вивчення фармакологічної активності екстракту листя лепехи звичайної.
2. **Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет, кафедра ботаніки, аспірант Яременко М.С.
3. **Джерела інформації:**
 - Яременко М.С. До питань використання та ідентифікації неофіційної сировини – листя *Ascorus Calamus L.* / М. С. Яременко, Т. М. Гонтова, Л. М. Сіра // . Медична та клінічна хімія. – 2018. – № 0 (1). – с. 105-110.
 - Яременко М.С. Вплив екстракту листя лепехи звичайної на стан ліпідного обміну щурів з парацетамоловим гепатитом / Деримедвідь Л.В., Коранг Л.А., Лар'яновська Ю.Б., Горбач Т.В., Яременко М.С. // Фітотерапія, часопис. – 2020. – № 1. – с. 62-65.
- Запропоновані дані, щодо методів ідентифікації та використання листя лепехи звичайної.
4. **Де впроваджено:** кафедра фармакогнозії, фармакології та ботаніки Запорізького Державного медичного університету.
5. **Форма впровадження:** наукова робота та навчальний процес.
6. **Ефект від впровадження:** поглиблення знань студентів та науковців з питань ідентифікації та використання листя лепехи звичайної.
7. **Строки впровадження:** 2019-2020 навчальний рік.

Завідувач кафедри фармакогнозії,
фармакології та ботаніки Запорізького
Державного медичного університету,
д. б. н., професор

С.Д. Тржецинський

Продовж. дод. Г

«ЗАТВЕРДЖЕНО»

ТОВ «КФК «ГРІН ФАРМ
КОСМЕТИК»

Технічний директор

В.В. Ніколов

"03" вересня 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Результати наукових досліджень аспіранта кафедри ботаніки Національного фармацевтичного університету **Яременка Максима Сергійовича** були використані при розробці методів контролю якості екстракту кореневищ лепехи звичайної згідно виробничих методик та проєкту МКЯ «Екстракт кореневищ лепехи звичайної».

Запропоновані методи контролю якості повністю відтворюються в промислових умовах ТОВ «КФК «ГРІН ФАРМ КОСМЕТИК».

Серії екстракту кореневищ лепехи відповідали показникам якості згідно проєкту МКЯ.

Завідувач кафедри ботаніки
Національного фармацевтичного
університету



Т.М. Гонтова

Продовж. дод. Г

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 ФСЗ, +38 050 4056222 ППТ, +38 099 1800602 ЛФА, +38 099 1800603 гр. біол. методів,
+38 099 1800601 бухгалтерія, +38 099 1800604 відділ кадрів

Від 03.09.2020 № 11/1241-5
На _____ № _____

Акт про участь Яременко М.С. у розробці проекту монографії
«ЛЕПЕХИ КОРЕНЕВИЩА[№]»

Яременко М.С. у складі групи «Лікарська рослинна сировина» під керівництвом начальника відділу ДФУ д.фарм.н., с.н.с. Котова А.Г. та зав. сектора «Експериментальна підтримка розробки монографій на ЛРС» ДП «Фармакопейний центр» к.фарм.н., с.н.с. Котової Е.Е., брав участь в експериментальних дослідженнях щодо вивчення наступних випробувань: сторонні домішки; Азарон; вода; загальна зола; зола, нерозчинна у хлористоводневій кислоті у лікарській рослинній сировині в процесі розробки національної монографії на ЛЕПЕХИ КОРЕНЕВИЩА у відповідності до вимог ДФУ та ЄФ.

В результаті був розроблений проект розділу Випробування для проекту національної монографії «ЛЕПЕХИ КОРЕНЕВИЩА[№]».

Директор ДП «Фармакопейний центр»,
д.х.н., професор



О.І. Гризодуб

Продовж. дод. Г

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 ФСЗ, +38 050 4056222 ППТ, +38 099 1800602 ЛФА, +38 099 1800603 гр. біол. методів,
+38 099 1800601 бухгалтерія, +38 099 1800604 відділ кадрів

Від 03.09.2020 № 11/1236-5
На _____ № _____

Акт про участь Яременко М.С. у перегляді монографії
«ЛЕПЕХИ КОРЕНЕВИЩА^N»

Яременко М.С. у складі групи «Лікарська рослинна сировина» під керівництвом начальника відділу ДФУ д.фарм.н., с.н.с. Котова А.Г. та зав. сектора «Експериментальна підтримка розробки монографій на ЛРС» ДП «Фармакопейний центр» к.фарм.н., с.н.с. Котової Е.Е., брав участь в експериментальних дослідженнях щодо розробки методики «Азарон» методом ВСРХ у лікарській рослинній сировині в процесі перегляду національної монографії на ЛЕПЕХИ КОРЕНЕВИЩА у відповідності до вимог ДФУ та ЄФ. В результаті був розроблений проект розділу «Азарон» для національної монографії «ЛЕПЕХИ КОРЕНЕВИЩА^N»

Директор ДП «Фармакопейний центр»,
д.х.н., професор



О.І. Гризодуб

Продовж. дод. Г

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 ФСЗ, +38 050 4056222 ППТ, +38 099 1800602 ЛФА, +38 099 1800603 гр. біол. методів,
+38 099 1800601 бухгалтерія, +38 099 1800604 відділ кадрів

Від 03.03.2020 № 11/239-5
На _____ № _____

Акт про участь Яременко М.С. у розробці проекту монографії «ЛЕПЕХИ КОРЕНЕВИЩА[№]»

Яременко М.С. у складі групи «Лікарська рослинна сировина» під керівництвом начальника відділу ДФУ д.фарм.н., с.н.с. Котова А.Г. та зав. сектора «Експериментальна підтримка розробки монографій на ЛРС» ДП «Фармакопейний центр» к.ф.н., с.н.с. Котової Е.Е., брав участь в експериментальних дослідженнях щодо вивчення макроскопічних та мікроскопічних ознак лікарської рослинної сировини в процесі розробки національної монографії на ЛЕПЕХИ КОРЕНЕВИЩА у відповідності до вимог ДФУ та ЄФ.

В результаті був розроблений проект розділу Ідентифікація А та В (макроскопія, мікроскопія) для проекту національної монографії «ЛЕПЕХИ КОРЕНЕВИЩА[№]»

Директор ДП «Фармакопейний центр»,
д.х.н., професор



О.І. Гризодуб

Продовж. дод. Г

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 ФСЗ, +38 050 4056222 ППТ, +38 099 1800602 ЛФА, +38 099 1800603 гр. біол. методів,
+38 099 1800601 бухгалтерія, +38 099 1800604 відділ кадрів

Від 03.09.2020 № 11/1240-5
На _____ № _____

Акт про участь Яременко М.С. у розробці проекту монографії
«ЛЕПЕХИ КОРЕНЕВИЩА^Н»

Яременко М.С. у складі групи «Лікарська рослинна сировина» під керівництвом начальника відділу ДФУ д.фарм.н., с.н.с. Котова А.Г. та зав. сектора «Експериментальна підтримка розробки монографій на ЛРС» ДП «Фармакопейний центр» к.фарм.н., с.н.с. Котової Е.Е., брав участь в експериментальних дослідженнях щодо розробки методики ідентифікації методом тонкошарової хроматографії у лікарській рослинній сировині в процесі розробки національної монографії на ЛЕПЕХИ КОРЕНЕВИЩА у відповідності до вимог ДФУ та ЄФ.

В результаті був розроблений проект розділу Ідентифікація С (тонкошарова хроматографія) для проекту національної монографії «ЛЕПЕХИ КОРЕНЕВИЩА^Н»

Директор ДП «Фармакопейний центр»,
д.х.н., професор



О.І. Гризодуб

Продовж. дод. Г

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53
тел. (057) 706-30-71

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Головний науково-педагогічний
робітник НФаУ
професор
«28» _____ 2020 р.
І.М. Владимірова



МЕТОДИКИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ
ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ
(ПРОЄКТ)

ЕКСТРАКТ ЛИСТЯ ЛЕПЕХИ ЗВИЧАЙНОЇ
EXTRACTUM FOLIORUM ACORUS CALAMUS

Розроблено:

Завідувач кафедри ботаніки
Національного фармацевтичного
університету
Аспірант кафедри ботаніки
Національного фармацевтичного
університету



Т.М. Гонтова



М.С. Яременко

Продовж. дод. Г

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53
тел. (057) 706-30-71

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Проректора з науково-педагогічної
роботи НФаУ
професор  І.М. Володимирова
«28» вересня 2020 р.



МЕТОДИКИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ
ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ
(ПРОЄКТ)

ЛЕПЕХИ ЗВИЧАЙНОЇ ЛИСТЯ
ACORI CALAMI FOLIUM

Розроблено:

Завідувач кафедри ботаніки
Національного фармацевтичного
університету
Аспірант кафедри ботаніки
Національного фармацевтичного
університету



Т.М. Гонтова



М.С. Яременко

Продовж. дод. Г

Виробник ТОВ «КФК «ГРІН ФАРМ КОСМЕТИК»
країна: Україна

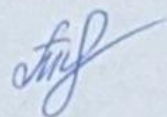
МЕТОДИКИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ
ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ
(ПРОЄКТ)

EXTRACTUM RHIZOMATA ACORUS CALAMUS
ЕКСТРАКТ КОРЕНЕВИЩ ЛЕПЕХИ ЗВИЧАЙНОЇ

екстракт рідкий (субстанція)
у флаконах із скломаси для виробництва нестерильних форм

Розроблено:

Завідувач кафедри ботаніки
Національного фармацевтичного
університету



Т.М. Гонтова

Аспірант кафедри ботаніки
Національного фармацевтичного
університету



М.С. Яременко

Узгоджено:

Технічний директор
ТОВ «КФК «ГРІН ФАРМ КОСМЕТИК»



В.В. Ніколов