

Національний фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Безрук Іван Володимирович

УДК: 635.965.22:615.322:543.544.5:615.074

ДИСЕРТАЦІЯ

**Експериментальне обґрунтування підходів та стандартизація
препаратів плюща звичайного**

226 – Фармація, промислова фармація

22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

І. В. Безрук

Науковий керівник: Георгіянц Вікторія Акопівна,
докторка фармацевтичних наук, професорка

Харків – 2020

АНОТАЦІЯ

Безрук І. В. Експериментальне обґрунтування підходів та стандартизація препаратів плюща звичайного. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація». – Національний фармацевтичний університет, МОЗ України, Харків, 2020.

Дисертаційна робота присвячена обґрунтуванню та розробці методик для стандартизації препаратів, що містять екстракт листя плюща звичайного; оцінці розроблених методик за аналітичною точністю, відповідністю принципам «зеленої хімії» та економічною собівартістю проведення аналізу; дослідженню компонентів листя *Hedera helix*, визначення маркерів для стандартизації та дослідженню параметрів навколишнього середовища, які впливають на акумуляцію речовин; аналізу хімічного складу для визначення основних речовин-маркерів з метою стандартизації різних препаратів плюща звичайного та вхідного контролю сировини.

Для визначення можливих маркерів для стандартизації та дослідження впливу кліматичних умов на їх накопичення в сировині плюща звичайного було зібрано зразки в європейських країнах з різним кліматом (Австрія, Греція, Італія, Литва, Польща, Словаччина, Угорщина, Україна, Чехія).

Для попереднього скринінгу речовин у сировині *H. helix* використовували методику ВЕРХ (Високоєфективна рідинна хроматографія) з діодно-матричним детектором. Для розділення речовин використовували колонку ACE C 18 (250×4,6 мм), як рухоми фазу А використовували 0,1 % розчин оцтової кислоти та як рухоми фазу Б – ацетонітрил Р. Для методики визначалися метрологічні параметри, а саме: лінійність, правильність, специфічність, межі визначення та кількісного

визначення. За допомогою запропонованої методики було ідентифіковано тритерпенові сапоніни, флавоноїди та фенольні кислоти. З 9 фенольних кислот більшість були похідними гідроксикоричної кислоти, а саме: неохлорогенова кислота, хлорогенова кислота, корична кислота, кофейна кислота, 3,5-дикофеїлхінна кислота, 3,4-дикофеїлхінна кислота, криптохлорогенова кислота та 4,5-дикофеїлхінна кислота. Крім того, було знайдено похідну тригідроксибензойної кислоти – галову кислоту. Вміст цих речовин значно варіювався в усіх досліджених зразках. Хлорогенова та 3,5-дикофеїлхінна кислоти були переважаючими сполуками у фенольних профілях усіх випробовуваних зразків листків плюща, їх кількість значно варіювалась від $(325,796 \pm 10,062)$ мкг/г до $(8630,058 \pm 12,517)$ мкг/г і від $(450,013 \pm 21,562)$ мкг/г до $(23866,566 \pm 863,267)$ мкг/г відповідно. У більшості досліджених зразків вміст 3,5-дикофеїлхінної кислоти переважав такий хлорогенової у 1,5-18 разів.

Флавоноїдний профіль складався з флавонолів (рутин, гіперозид, ізокверцитрин, кверцетин та кемпферол) та флавонів (апигенін 7-глюкозид, апигенін, лютеолін та 6-7-дигідроксиізофлавоон). Гіперозид та апигенін 7-глюкозид були домінантними флавоноїдами, вміст яких варіювався залежно від місця збору від $(45 \pm 1,2)$ мкг/г до $(4750,9 \pm 7,6)$ мкг/г і від $(113,3 \pm 0,7)$ мкг/г до $(1918,2 \pm 17,2)$ мкг/г відповідно.

Тритерпенові сапоніни були представлені гедеракозидом С, α -гедерином, гедерасапоніном В та гедеракозидом D, а їх концентрації розташовувалися в такому порядку: гедеракозид С > гедеракозид D > α -гедерин > гедерасапонін В. Зазначений профіль був характерний для усіх зразків, крім зразків, зібраних у Сіракузах (Італія), що не містили гедерасапоніну В. Вміст гедеракозиду С коливався від 3807,7 (м. Сіракузи. Італія) до 79737,3 мкг/г (м. Варшава. Польща). Ця речовина була домінантною в усіх зразках, її вміст становив від 31 до 88 % від загальної кількості ідентифікованих тритерпенових сапонінів.

Для додаткового підтвердження ідентифікованих речовин була використана хромато-мас-спектрометрія (ВЕРХ). Вдалося підтвердити наявність всіх речовини, які були знайдені при застосуванні ВЕРХ-методики.

Базуючись на загальноприйнятих даних наукової літератури щодо фармакотерапевтичних властивостей БАР плюща, основним маркером для стандартизації препаратів та вхідного контролю сировини визначено гедеракозид С. Крім того, за результатами проведених досліджень як додаткові маркери активності, що значною мірою можуть впливати на ефективність препаратів плюща, запропоновано кислоти хлорогенову та гіперозид. Ці речовини були знайдені у досить високих кількостях у всіх досліджуваних зразках листя плюща. Тому саме вміст гедеракозиду С, кислоти хлорогенової та гіперозиду запропоновано нормувати для вхідного контролю сировини на виробництві.

За допомогою ВЕРХ/ABTS методу з постколунковою дериватизацією було вивчено антиоксидантні властивості досліджуваних речовин *in vitro*. Антиоксидантна активність вивчених компонентів складала від 85 до 97 % загальної активності у випробовуваних зразках. Найбільший вклад в антиоксидантну активність (до 80%) за експериментальними даними чинили 3,5-дикофеїлхінна та хлорогенова кислоти. Інші речовини, що виявили антиоксидантну дію, можна розташувати у такому порядку: 3,4-дикофеїлхінна кислота < гіперозид < неохлорогенова кислота.

Крім того, було визначено склад амінокислот за допомогою методу ГХ з мас-детектором після попередньої дериватизації зразків з реагентом MTBSTFA (N-трет-бутилдиметилсиліл-N-метилтрифторацетамід). Вміст та склад амінокислот у досліджуваних зразках був різноманітним та залежав від місця збору. Тільки аланін знаходився в усіх зразках. Аланін та пролін були як правило домінантними сполуками, в менших кількостях були виявлені валін, ізолейцин, лейцин, 4-аміномасляна кислота та серин.

Кількість аланіну та проліну варіювалася від 0,7 до 14,4 мкг/г і від 0,8 до 16,4 мкг/г відповідно. Лейцин та 4-аміномасляна кислота були знайдені лише в деяких зразках. Найбільший загальний вміст амінокислот (36,72 мкг/г) був знайдений у зразку з Науйої-Акмяне (Литва). Найбільша різноманітність (щонайменше 6 амінокислот) було знайдено в листках з литовських міст Науйої-Акмяне, Клайпеди, Плунге та Шілюте. Оскільки вміст амінокислот склав менше 1 % від загального вмісту БАР, використання цієї групи речовин як маркерів є недоцільним.

Уперше здійснено кореляційний аналіз впливу факторів навколишнього середовища (тип клімату, висота над рівнем моря, тип ґрунту, кількість опадів, кількість сонячних годин) на накопичення груп біологічно активних речовин у досліджуваних зразках листків плюща. За результатами досліджень висота над рівнем моря та кількість опадів були факторами, що не чинили значного впливу на накопичення всіх груп БАР.

Накопичення тритерпенових сапонінів статистично достовірно (помірно негативно) залежало від тривалості сонячного світла, типу ґрунту та типу клімату. Оптимальними визначено такі показники — кількість сонячних годин 1600-1800 на рік, ґрунт лувізол та помірно вологий клімат (тип Dfb за класифікацією Кеппена). Подібні закономірності виявлено і для флавоноїдів за винятком того, що оптимальним типом ґрунту виявився альбувезол. На накопичення фенольних кислот серед усіх факторів впливав лише тип ґрунту, найбільший вміст БАР цієї групи виявлено у зразках рослин, що зростали на ґрунті лувізол. Загальний вміст амінокислот залежав здебільшого від клімату та кількості сонячних годин. Загальний вміст БАР у зразках, що були зібрані в північних регіонах Європи був вищим, ніж у зразках з південних регіонів. Найбільш перспективною для фармацевтичного виробництва виявилась сировина з Литви та Польщі.

Порівняльний хімічний аналіз препаратів плюща звичайного полягав у визначенні аналогічних компонентів у досліджуваних зразках застосовуваних препаратів плюща звичайного (сиропи «Геделікс»,

«Гелітуспан», «Гедерин», «Проспан», «Гербіон», краплі «Геделікс», таблетки «Проспан»), а також оригінальних композицій, що знаходяться у розробці Житомирської фармацевтичної фабрики Vishpha® - сироп «Гедерин+» та капсули «Гедерин». У дослідженні використовувався ВЕРХ-метод з діодно-матричним детектором, аналогічно тому, що й для аналізу рослинної сировини *H. helix*. Застосований метод дозволив визначити 20 компонентів (зокрема 4 тритерпенових сапонінів, 6 флавоноїдів та 10 фенольних кислот). Крім лікарських препаратів *H. helix*, проводилися дослідження сухих екстрактів листя плюща звичайного (виробник «Martin Bauer Group», Німеччина).

Профілі обох екстрактів були однаковими, за винятком галової кислоти, що була відсутня у другому екстракті. Проте кількісний вміст компонентів відрізнявся. Серед усіх речовин вміст кемпферолу характеризувався найбільшим відхиленням (понад 135,28 %), тоді як вміст гедеракозиду С – найменшим (7,18 %). Кількісні відмінності можна пояснити різницею походження, технологією виробництва екстракту та процесу сушіння сировини. Профілі БАР усіх лікарських препаратів були схожими на профілі комерційних сухих екстрактів. Профіль тритерпенових сапонінів складався з гедеракозиду С, гедеракозиду D, α -гедерину та гедерасапоніну В, їхній сумарний кількісний вміст складав понад 80 % від загального вмісту всіх визначених речовин у кожному зразку. Переважно концентрації тритерпенових сапонінів розташовувалися у такому порядку: гедеракозид С > гедеракозид D > α -гедерин > гедерасапонін В. Профіль фенольних кислот був представлений галовою, неохлорогеновою, хлорогеновою, коричною, кофейною, 3,5-дикофеїлхінною, 3,4-дикофеїлхінною, 4,5-дикофеїлхінною, криптохлорогеновою кислотами. Переважно всі вони були знайдені в кожному зразку, за винятком галової, коричневої та кофейної кислот. Середні концентрації всіх кислот значно варіювалися. Хлорогенова та 4,5-дикофеїлхінна кислоти мали найвищі значення вмісту, які становили близько 60 % від загального вмісту

фенольних кислот. Профіль флавоноїдів складався з рутину, гіперозиду, ізокверцитрину, 6-7-дигідроксиізофлавону, кверцетину, кемпферолу, нікотифлорину. Гіперозид був знайдений у всіх зразках. Рутин та ізокверцитрин не були виявлені лише у сиропі «Гедерин+».

Для усіх зразків була проведена оцінка антиоксидантної активності. Визначені речовини були відповідальними за 92–100% від загальної антиоксидантної активності. Серед компонентів, що спричиняли найбільший вклад у активність, слід відзначити неохлорогенову та хлорогенову кислоти, а також гіперозид, що були присутні майже в кожному зразку і мали високі показники активності *in vitro*. Крім того, виражену активність мали 3,4-дикофеїлхінна та 4,5-дикофеїлхінна кислоти, однак вони були знайдені лише в сухих екстрактах, капсулах та краплях від кашлю.

Отримані результати також підтвердили, що, крім основного маркера гедеракозиду С, для стандартизації продуктів *H. helix* можливе використання додаткових маркерів, а саме хлорогенової кислоти та гіперозиду. Ці речовини були знайдені у достатній кількості як у сировині, так і в препаратах плюща звичайного. Крім того, фармакологічні дослідження підтверджують їх значний вплив на ефективність.

В рамках проведення фармацевтичної розробки для стандартизації капсул «Гедерин» та сиропу «Гедерин+» було розроблено ВЕРХ, УВЕРХ та ВЕТШХ методики визначення гедеракозиду С. Кожну методику було валідовано за такими параметрами: специфічність, лінійність, правильність, прецизійність, стабільність, а також було розраховано межі виявлення та кількісного визначення. Всі методики відповідали вимогам, що висуваються ДФУ, тому всі вони можуть бути використані для контролю якості продуктів плюща звичайного. Уперше здійснено порівняльну оцінку розроблених методик за аналітичною точністю, впливом на навколишнє середовище та собівартістю. Встановлено, що методи ВЕРХ та УВЕРХ мали менший вплив на екологію порівняно з ВЕТШХ методом. Поряд з тим,

вартість застосування ВЕТШХ методики була в 2,3 та 1,6 рази меншою порівняно з ВЕРХ та УВЕРХ відповідно. Серед розроблених методів можна виділити УВЕРХ метод, оскільки він був дешевшим за ВЕРХ у 1,44 рази, а також більш екологічним, ніж ВЕТШХ, маючи при цьому високу точність.

Оскільки до складу сиропу «Гедерин+» крім рослинного екстракту входить сальбутамолу сульфат, здійснено розробку методик для кількісного визначення цього АФІ та визначення супутніх домішок. Розроблені методики контролю якості сиропу «Гедерин+» використано при дослідженні стабільності лікарської форми протягом 24 місяців. Одержані результати підтверджують відповідність нормованих параметрів вимогам специфікації під час зберігання.

Ключові слова: *Hedera helix* (плющ звичайний), контроль якості, стандартизація, речовини-маркери, хроматографічні методи, антиоксидантна активність, вивчення стабільності, сировина.

Список публікацій здобувача:

1. Bezruk I., Kotvitska A., Korzh I., Materiienko A., Gubar S., Budanova L., Ivanauskas L., Vyshnevsky I., Georgiyants V. Combined Approach to the Choice of Chromatographic Methods for Routine Determination of Hederacoside C in Ivy Leaf Extracts, Capsules, and Syrup. *Sci. Pharm.* 2020. № 88 (24) <https://doi.org/10.3390/scipharm88020024> (особистий внесок – підготовка зразків для аналітичних досліджень, участь у проведенні експериментальних досліджень, участь у написанні статті).
2. Bezruk I., Georgiyants V., Ivanauskas L. Comparison of components profile in herbal raw material, extract and pharmaceuticals of *hedera helix*. *Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science»*. 2020. Vol. 4 (26). P. 36-39 (особистий внесок – участь у плануванні та проведенні експерименту, обробці та узагальненні результатів, участь у написанні статті).
3. Bezruk I. V., Grudko V.O., Georgiyants V.A., Ivanauskas L. Screening of the antioxidant activity of extracts from *Hedera helix* leaves using the HPLC/ABTS method. *Clinical pharmacy*. 2020. Vol. 24 (3). P. 47—52

(особистий внесок підготовка рослинної сировини для аналізу, проведення експериментальних досліджень, участь у написанні статті).

4. Bezruk Ivan, Marksa Mindaugas, Georgiyants Victoriya, Ivanauskas Liudas, Raudone Lina. Phytogeographical profiling of ivy leaf (*Hedera helix* L.). *Industrial Crops and Products*. 154, 2020, 10.1016/j.indcrop.2020.112713 (особистий внесок підготовка рослинної сировини для аналізу, проведення експериментальних досліджень, участь у написанні статті).

5. Безрук І. В., Матерієнко А. С., Губарь С. М., Георгіянц В. А., Л. Іванаускас. Спосіб визначення гедеракозиду С методом високоефективної рідинної хроматографії з попереднім застосуванням твердофазної екстракції в складі комбінованих лікарських форм: пат. України на корисну модель № u201905811 від 27.05.2019. (особистий внесок – участь у патентному пошуку, плануванні та проведенні експериментальних досліджень та оформленні матеріалів).

6. Bezruk I. Myhal A., Kushniruk V., Georgiyants V. Development of the HPLC method for related impurities determination of active pharmaceutical ingredients in the process of the industrial synthesis. Book of abstracts dedicated to the 80th anniversary of the museum of history of lithuanian medicine and pharmacy «The 8th International Conference on Pharmaceutical Sciences and Pharmacy Practice» December15. – Kaunas, Lithuania, 2017. P. 46-47

7. Безрук І. В., Матерієнко А. С., Георгіянц В. А. Розробка методики кількісного визначення сальбутамолу сульфату методом високоефективної рідинної хроматографії. *Всеукраїнський медичний журнал молодих вчених ХИСТ*. – 2–6 квітня, 2018, Чернівці .Вип. 20. С. 416.

8. Безрук І. В., . Матерієнко А. С, Губарь С. М., Георгіянц В. А. Обґрунтування використання високоефективної рідинної хроматографії в провесно-аналітичній технології при виробництві субстанції сальбутамолу сульфату. *Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 80-річчю з дня народження доктора фармацевтичних наук, професора О. М. Гайдукевича «Синтез і аналіз біологічно активних*

речовин і лікарських субстанцій»(Харків, 12- 13 квітня 2018р.).НФаУ, 2018. С.318-319.

9. Bezruk I. V., Materiienko A. S., Gubar S. N., Georgiyants V. A. The justification of approaches to related substances control in the pharmaceutical technology of active pharmaceutical ingredients. Abstracts of XXV International Scientific and Practical Conference of young scientists and student «Topical issues of new drugs development»(Kharkiv, 18- 20 april 2018). NUPh, 2018. P.85-86

10. Bezruk I., Myhal A., Kushniruk V., Georgiyants V. Using of the HPLC method for quantitative determination of active pharmaceutical ingredients in the process of the industrial synthesis. Book of abstracts Chemistry Conference for Young Scientists «ChemCys 2018» February 21-23, Blankenberge, Belgium, 2018. P.41

11. Bezruk I., Marksa M., Materiienko A., Gubar S.,Georgiyants V., Ivanauskas L. HPLC and HPTLC methods for the hederacoside C determination in leaves of *Hedera helix* L., dried extract and some dosage forms. Book of abstracts dedicated to the 100th anniversary of independent Lithuania's pharmacy «The 9th International Conference on Pharmaceutical Sciences and Pharmacy Practice» November 9. – Kaunas, Lithuania, 2018. P. 97

12. Straigyte E., Bezruk I., Marksa M. Marksiene R. Evaluation of polyphenol compounds and antioxidant activity in ivy (*Hedera Helix* L.) leaves. Topical issues of new medicines development: матеріали XXVI Міжнародної науково-практичної конференції молодих учених та студентів (10-12 квіт. 2019 р., м. Харків). – Харків: НФаУ, 2019. С. 101-102.

13. Bezruk I. V., Materiienko A. S., Gubar S. M., Georgiyants V. A. Development of assay method for simultaneous determination of salbutamol sulfate and potassium sorbate in dosage form. XIII науково-практична конференція з міжнародною участю управління якістю в фармації. – Харків: НФаУ, 2019. С. 15-16.

14. Bezruk I. V., Marksa M., Materiienko A. S., Georgiyants V. A., Ivanauskas L. The investigation of antioxidant activity of heder a helix l. components using hplc post column abts method. Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 20-й річниці заснування Дня фармацевтичного працівника України у 2 томах (19-20 вересня 2019 р., м. Харків). Харків, 2019. С. 309-311.

15. Bezruk I. V., Georgiyants V. A., Ivanauskas L. Quality control of ivy leaf, its extracts and dosage forms in industrial manufacturing with usage hplc and hptlc methods. Матеріали Науково-практичної конференції «Сучасні проблеми фармакології, косметології та аромології» (2019 р., м. Одеса). Одеса, 2019. С.26–30.

16. Bezruk I., Marksa M., Georgiyants V., Ivanauskas L. Determination of amino acids profile in leaves of Hedera helix L. collected from different European countries using gas chromatography-massspectrometry (GC-MS). Book of abstracts 10th International Pharmaceutical Conference „Science and Practice 2019” November 15th. – Kaunas, Lithuania, 2019. P. 37

17. Безрук І. В., Гриненко В. В., Георгіянц В. А., Іванаускас Л. Визначення впливу кліматичних умов на вміст біологічно активних речовин в листі плюща. «PLANTA+. ДОСЯГНЕННЯ ТА ПЕРСПЕКТИВИ» Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої пам'яті доктора хімічних наук, професора Ніни Павлівни Максютіної (до 95-річчя від дня народження) (20-21 лютого 2020 р., м. Київ). – Київ, 2020. С.59-60.

18. Безрук І., Котвіцька А., Корж Ю., Грудько В., Іванаускас Л., Георгіянц В. Порівняння аналітичних та економічних характеристик хроматографічних методик для аналізу препаратів, що містять екстракт плюща. Збірник матеріалів XIV науково-практичної конференції «Управління якістю в фармації» 22.05.2020 (22 травня 2020 р. м. Харків). Харків, 2020. С.12.

19. Безрук І. В. Вишневецький І. А., Губарь С. М., Штриголь С.Ю., Георгіянц В.А. фармакологічні та хроматографічні дослідження комбінації рослинного екстракту та селективного агоністу β_2 - адренорецепторів. Матеріали науково-практичної дистанційної конференції з міжнародною участю «сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження», присвяченої 75-й річниці Університету та 20-й річниці створення фармацевтичного факультету (19-20 травня 2020 р. м. Івано-Франківськ). – Івано-Франківськ, 2020. С.147.

20. Bezruk I., Kotvitska A., Korzh J., Ivanauskas L., Georgiyants V. Assessment and comparison of chromatographic procedures for hederacoside C determination in dosage form. Book of abstracts international distance conference contemporary pharmacy: issues, challenges and expectation May 8th. – Kaunas, Lithuania, 2020.P. 23.

21. Безрук І. В., Матерієнко А. С., Губарь С. М., Георгіянц В. А. Розробка кількісного визначення гедеракозиду С в складі багатокомпонентного сиропу методом високоефективної рідинної хроматографії. Збірник всеукраїнської науково-практичної конференції «Актуальні питання сучасної медицини і фармації» (до 50-річчя заснування ЗДМУ (18-25 квітня 2018 р., 30 травня 2018 р. м. Запоріжжя). Запоріжжя, 2018. С. 143-144.

ABSTRACT

Bezruk I. Experimental justification of approaches and standardization of ivy preparations. – Qualification work on the rights of the manuscript.

Thesis for a Ph. D. in Pharmaceutical Sciences by specialty 226 “Pharmacy, industrial pharmacy”. – National University of Pharmacy, Ministry of Health of Ukraine, 2020.

The thesis is devoted to the development of methods for standardization of medicines containing ivy leaf extract; evaluation of the developed methods for analytical accuracy, compliance with principles of “green chemistry” and economic cost of analysis; study of the components of *Hedera helix* leaves, determination of markers for standardization and study of environmental parameters that affect the accumulation of substances; analysis of chemical composition to determine the main marker to standardize various medicines of ivy leaves and input control of raw materials.

Various samples of ivy leaves were collected in European countries with different climates (Austria, Greece, Italy, Lithuania, Poland, Slovakia, Hungary, Ukraine, Czech Republic) to determine possible markers for standardization and study of the influence of climatic conditions on their accumulation in the raw material.

HPLC, coupled with a diode-matrix detector, was used for the primary screening of substances in *H. helix* raw materials. An ACE C18 column (250 × 4.6 mm) was used to separate the substances; a 0,1% acetic acid solution was used as the mobile phase A and acetonitrile – as mobile phase B. For the method, metrological parameters, namely linearity, precision, specificity, limit of detection and limit of quantification were determined. Triterpene saponins, flavonoids and phenolic acids were determined by the proposed method. Totally, 9 phenolic acids were found, which mostly belonged to hydroxycinnamic acid derivatives, namely neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cinnamic acid, caffeic acid, 3,5-dicopheychloric acid, 3,4-dicopheychloric acid, cryptochlorogenic acid and 4,5-dicopheychloric acid. Also, a derivative of trihydroxybenzoic acid – gallic acid was found. The content of these compounds varied significantly among all samples. Chlorogenic and 3,5-dicopheyquinic acids were the predominant compounds in the phenolic profiles of all tested samples of ivy leaves; their concentrations varied significantly from $(325,796 \pm 10,062) \mu\text{g} / \text{g}$ to $(8630,058 \pm 12,517) \mu\text{g} / \text{g}$ and from $(450,013 \pm 21,562) \mu\text{g} / \text{g}$ to $(23866,566 \pm$

863,267) $\mu\text{g} / \text{g}$, respectively. In most of the studied samples, the content of 3,5-dicopheylquinic acid was 1.5-18 times higher than that of chlorogenic acid.

The flavonoid profile consisted of flavonols (rutin, hyperoside, isoquercitrin, quercetin and kaempherol) and flavones (apigenin 7-glucoside, apigenin, luteolin and 6-7- dihydroxyisoflavone). Hyperoside and apigenin 7-glucoside were dominant flavonoids, the content of which varied depending on the place of collection from $(45 \pm 1.2) \mu\text{g} / \text{g}$ to $(4750.9 \pm 7.6) \mu\text{g} / \text{g}$ and from $(113.3 \pm 0, 7) \mu\text{g} / \text{g}$ to $(1918.2 \pm 17.2) \mu\text{g} / \text{g}$, respectively.

Triterpene saponins were represented by hederacoside C, α -hederin, hederasaponin B and hederacoside D. Their concentrations were arranged as follows: hederacoside C > hederacoside D > α -hederin > hederasaponin B. This profile was characteristic of all samples, except for those in Syracuse (Italy), which did not contain hederasaponin B. The content of hederacoside C ranged from 3807,7 (Syracuse, Italy) to 79,737.3 $\mu\text{g} / \text{g}$ (Warsaw, Poland). This substance was dominant in all samples, and its content ranged from 31 to 88 % of the total number of identified triterpene saponins.

HPLC, coupled with mas-detector, was used for additional confirmation of found components. It was possible to confirm the presence of all substances that were found using HPLC.

According to the scientific literature, the main marker for standardization of ivy leaf medicines and raw materials is hederacoside C. Besides, obtained results revealed that chlorogenic acid and hyperoside might be used as additional markers for confirmation of ivy products quality. These substances were found in fairly high quantities in all studied samples of ivy leaves. Therefore, the content of hederacoside C, chlorogenic acid and hyperoside is proposed to standardize for input control of raw materials in production.

The antioxidant activity of the test components was studied by HPLC-ABTS method *in vitro*. The antioxidant activity of identified radical scavengers made up from 85 to 97% of total antioxidant activity in tested samples. The dominant components were 3,5-caffeoylquinic acid and chlorogenic acid,

corresponding up to 80 % of total radical scavenging activity. These substances can be selected as markers of antioxidant activity. Other significant antioxidant active compounds, according to their scavenger activity, were in the following order: 3,4-caffeoylquinic acid < hyperoside and neochlorogenic acid.

Also, the amino acids composition was determined by the GC method with a mass detector after preliminary derivatization of the samples with MTBSTFA reagent (N-tert-butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide). The complex of amino acids formed specific profiles corresponding to the collection sites. Among the amino acids profile, alanine was found as the only compound detected in all samples. Alanine and proline were the predominant compounds, followed by valine, isoleucine, leucine, 4-aminobutyric acid and serine, each in the phytogeographical pattern. The amounts of alanine and proline varied from $(0,66 \pm 0,01)$ up to $(14,44 \pm 0,27)$ $\mu\text{g/g}$ and $(0,79 \pm 0,02)$ $\mu\text{g/g}$ up to $(16,42 \pm 0,21)$ $\mu\text{g/g}$, respectively. Leucine, 4-aminobutyric acid and serine occurred only in a few accessions. The highest total amino acid content ($36,72 \mu\text{g} / \text{g}$) was found in the sample from Naujoi-Akmäne (Lithuania). The greatest diversity (at least 6 amino acids) was found in leaves from the Lithuanian cities of Naujoi-Akmäne, Klaipeda, Plungė and Shilute. Since the content of amino acids was less than 1% of the total content of identified compounds, the use of this group of substances as markers was impractical.

For the first time, a correlation analysis of the influence of environmental factors (climate type, altitude, soil type, precipitation, number of sunshine hours) on the accumulation of groups of biologically active substances in the studied samples of ivy leaves was performed. According to research, altitude, and precipitation had no significant effect on the accumulation of all studied compounds groups.

The accumulation of triterpene saponins was statistically significant (moderately negative) depending on the duration of sunlight, soil type and climate type. The following parameters were determined as most optimal – the number of sunshine hours – 1600-1800 per year, the soil luvizol and moderately humid

climate (type Dfb according to Keppen's classification). Similar patterns were found for flavonoids, except that the optimal soil type was albuvezol. The accumulation of phenolic acids among all factors was influenced only by the type of soil; the highest content was found in samples of plants grown on soil luvizol. The total amino acid content depended mainly on the climate and the number of sunshine hours. In the samples collected in the northern regions of Europe, the total content of components was higher compared with the samples from the southern regions. Raw materials from Lithuania and Poland turned out to be the most promising for pharmaceutical production.

Comparative chemical analysis of ivy medicines was conducted to determine similar components in the studied preparations (syrups "Gedelix", "Gelituspan", "Gederin", "Prospan", "Gerbion", drops "Gedelix", tablets "Prospan"), as well as original compositions developed by the Zhytomyr Pharmaceutical Factory Vishpha® - syrup "Gederin +" and capsules "Gederin". The study used an HPLC method with a diode-matrix detector, similar to that for the analysis of plant material *H. helix*. The applied method provides a determination of 20 components (4 triterpene saponins, 6 flavonoids, and 10 phenolic acids). Besides *H. helix* medicines, the commercially available dry ivy leaf extracts ("Martin Bauer Group", Germany) were studied.

Profiles of both extracts were the same except for gallic acid was absent in the second extract. However, the contents of the phytochemicals varied. Among all components, kaempferol had the highest deviation of 135,28 %, and hederacoside C showed the lowest value of 7,18 %. Quantitative variations might be explained as the difference in origin, technological preparations, or drying process of raw material. The profiles of all dosage forms were similar to commercial dry extracts. The triterpene saponins were the dominant components in all samples. Their total quantitative amount was about 80 % in each sample. Mainly, the triterpene saponins were arranged in the following order: hederacoside C > hederacoside D > α -hederin > hederasaponin B. Hederacoside C was the main component among all saponins. The profile of phenolic acids

included: gallic, neochlorogenic, chlorogenic, t-cinnamic, caffeic, 3,5-dicaffeoylquinic, 3,4-dicaffeoylquinic, 4,5-dicaffeoylquinic, and cryptochlorogenic acids. Mostly, all of them were found in each sample, except gallic, t-cinnamic, and caffeic acids. The average concentrations of compounds varied. The flavonoids profile consisted of rutin, hyperoside, isoquercitrin, quercetin, kaempferol, nicotiflorin, and 6-7-dihydroxy isoflavone. Hyperoside was found in all samples. Rutin and isoquercitrin were found in all preparations except syrup "Hederin+".

The antioxidant activity of all samples was studied. The identified components contributed to 92 to 100 % of the total antioxidant activity in tested samples. Among all components, neochlorogenic and chlorogenic acids and hyperoside were present almost in each sample with high TEAC values; thus they may be used as markers for antioxidant activity. Also, 3,4-dicaffeoylquinic and 4,5-dicaffeoylquinic acids had significant activity. However, they were detected only in dry extracts, capsules, and cough drops.

The obtained results indicated that besides hederacoside C, chlorogenic acid and hyperoside may be used for the standardisation of *H. helix* pharmaceuticals. These components were found in significant quantities in both raw materials and medicines of ivy leaf. Pharmacological studies confirmed their importance to the therapeutic effect of ivy-based medicines.

HPLC, UPLC and HPTLC methods were developed to standardize capsules "Gederin" and syrup "Gederin+". Each of the methods was validated according to the following parameters: specificity, linearity, accuracy, precision, stability; besides, limit of detection and limit of quantification were calculated. All methods met the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine. Thus, they may be used in analysis of ivy-based medicines.

The assessment of the methods by environmental impact revealed that HPLC and UPLC methods had a smaller impact on the environment in comparison to the HPTLC method. However, the latter method requires 2,3- and 1,6-times lower costs than HPLC and UPLC, respectively. For the first time, a

comparative assessment of the developed methods in terms of analytical accuracy, environmental impact and cost was conducted. The UPLC method is the most appropriate since it is 1,44 times cheaper than HPLC; moreover, it is more environmentally friendly than HPTLC, while remaining highly accurate.

Since salbutamol sulfate was included in the composition of syrup “Gederin+” to enhance the pharmacological activity of ivy leaf extract, it was necessary to develop methods for its quantification as well as the determination of its impurities. Likewise, the presence of potassium sorbate in the composition required its quantification.

As the composition of syrup “Gederin+” included both plant extract and synthetic substances, the stability of the medicine may be decreased. Therefore, the stability of the pharmaceutical preparation has been studied for 24 months using developed methods. The results showed that the analyzed medicine remained effective and safe for the entire storage period.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	22
ВСТУП	23
РОЗДІЛ 1. СУЧАСНИЙ СТАН, ПЕРСПЕКТИВИ ТА ПІДХОДИ ДО СТАНДАРТИЗАЦІЇ ПРЕПАРАТІВ НА ОСНОВІ ЕКСТРАКТУ ЛИСТЯ ПЛЮЩА ЗВИЧАЙНОГО (Огляд літератури).....	32
1.1 Характеристика та ареал розповсюдження плюща звичайного	32
1.1.1 Характеристика плюща звичайного	32
1.1.2 Вплив умов навколишнього середовища на накопичення речовин та розповсюдження плюща звичайного	34
1.2 Фармакологічні властивості, застосування та препарати плюща звичайного.....	35
1.2.1 Фармакологічні властивості.....	35
1.2.2 Застосування в народній медицині.....	38
1.2.3 Препарати плюща на фармацевтичному ринку України	39
1.3 Хімічний склад, підходи до стандартизації рослинної сировини та препаратів плюща звичайного	40
1.3.1 Вивчення компонентного складу плюща звичайного.....	40
1.3.2 Стандартизація рослинної сировини.....	42
1.3.3 Методики аналізу рослинної сировини та препаратів плюща звичайного.....	43
1.3.4 Підходи до вибору аналітичного методу.....	48
Висновки до розділу 1	51
РОЗДІЛ 2 ХАРАКТЕРИСТИКА ОБ'ЄКТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА МЕТОДІВ АНАЛІЗУ	52
2.1 Об'єкти дослідження	52
2.2 Методи аналізу	56
2.2.1 Спектрофотометричне визначення.....	544
2.2.2 ВЕРХ та УВЕРХ дослідження	56
2.2.3 Аналіз з використанням мас-спектрометрії	56
2.2.4 Дослідження in-vitro антиоксидантної активності ВЕРХ методом	56
2.2.5 Газова хроматографія	57
2.3 Матеріали	57
2.4 Характеристика методів дослідження.....	58
2.5 Статистична обробка результатів.....	66
РОЗДІЛ 3 ВИВЧЕННЯ ХІМІЧНОГО СКЛАДУ ТА АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ ЛИСТЯ ПЛЮЩА ЗВИЧАЙНОГО. ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ КЛІМАТИЧНИХ УМОВ НА НАКОПИЧЕННЯ ДІЮЧИХ РЕЧОВИН.....	67
3.1 Спектрофотометричне дослідження зразків листя плюща звичайного	67
3.1.1 Кількісне визначення суми флавоноїдів.....	68
3.1.2 Кількісне визначення суми фенольних кислот	71
3.1.3 Визначення антиоксидантної активності	73

3.2 Ідентифікація α -гедерину та гедеракозиду С методом ВЕТШХ в зразках листя плюща	74
3.3 Кількісне визначення гедеракозиду С ВЕРХ та УВЕРХ методами в зразках листя плюща.....	77
3.4 Дослідження антиоксидантної активності визначених БАР	86
3.5 Визначення впливу умов навколишнього середовища на БАР листя плюща	87
3.6 Дослідження хімічного складу листя <i>H. helix</i>	94
3.6.1 Вплив різних розчинників та способів екстракції на витяжку тритерпенових сапонінів та фенольних речовин листя <i>H. helix</i>	94
3.6.2 Кількісне визначення фенольних компонентів, тритерпенових сапонінів та амінокислот	104
3.6.3 Вивчення антиоксидантної активності компонентів листя плюща з використанням ВЕРХ/ABTS методики.....	120
3.6.4 Валідація методики ВЕРХ для кількісного визначення тритерпенових сапонінів і фенольних речовин та методики ГХ-МС для кількісного визначення амінокислот	122
Висновки до розділу 3	131
РОЗДІЛ 4 ВИВЧЕННЯ ХІМІЧНОГО СКЛАДУ ТА АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ ПРЕПАРАТІВ ПЛЮЩА ЗВИЧАЙНОГО. РОЗРОБКА ТА ОЦІНКА МЕТОДИК ДЛЯ СТАНДАРТИЗАЦІЇ НОВИХ ПРЕПАРАТІВ НА ОСНОВІ ЕКСТРАКТУ ЛИСТЯ ПЛЮЩА – КАПСУЛ «ГЕДЕРИН» ТА СИРОПУ «ГЕДЕРИН+».....	
4.1 Стандартизація лікарських засобів, що містять екстракт листя плюща звичайного.....	133
4.1.1 Визначення хімічного складу препаратів	133
4.1.2 Дослідження подібності лікарських засобів за отриманими результатами ВЕРХ методики	136
4.2 Дослідження нових лікарських засобів – капсул «Гедерин» та сиропу «Гедерин+» за допомогою ВЕРХ, УВЕРХ та ВЕТШХ методик.....	149
4.2.1 Аналіз сухого екстракту листя плюща, та капсул із сиропом на його основі	149
4.2.2 Валідація розроблених методик	160
4.2.3 Економічна оцінка розроблених методик.....	163
4.2.4 Оцінка впливу аналітичних методик на навколишнє середовище ...	168
4.3 Аналіз синтетичних компонентів сиропу «Гедерин+»	170
4.3.1 Розробка методик визначення компонентів та дослідження стабільності сиропу «Гедерин+»	171
4.3.1.1. Розробка методик кількісного визначення сальбутамолу сульфату та калію сорбату	1712
4.3.1.2. Валідація методики кількісного визначення сальбутамолу сульфату та калію сорбату	171
4.3.1.3. Вивчення стабільності сиропу «Гедерин+»	1719

4.3.2	Визначення вмісту домішок сальбутамолу сульфату	180
4.3.2.1.	Розробка методики визначення домішок сальбутамолу сульфату	1801
4.3.2.2.	Валідація розробленого методу визначення домішок сальбутамолу сульфату	180
4.3.2.3.	Визначення супутніх домішок сальбутамолу сульфату в сиропі «Гедерин+» під час дослідження стабільності.....	180
	Висновки до розділу 4	187
	ВИСНОВКИ	189
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	193
	ДОДАТКИ	214

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АФІ–	активний фармацевтичний інгредієнт
БАР–	біологічно активні речовини
ВЕРХ–	високоефективна рідинна хроматографія
ВЕТШХ–	високоефективна тонкошарова хроматографія
ГХ–	газова хроматографія
ГХ/МС–	газова хроматографія з мас-детектором
ДФУ–	Державна Фармакопея України
ЄФ–	Європейська Фармакопея
ЛЗ–	лікарський засіб
ЛРС–	лікарська рослинна сировина
ЛФ–	лікарські форми
МВ–	межа виявлення
МКВ–	межа кількісного визначення
МКЯ–	методи контролю якості
МОЗ–	Міністерство охорони здоров'я
РХ–	рідинна хроматографія
СЗ–	стандартний зразок
УФ–	ультрафіолетова область
УВЕРХ–	ультроефективна рідинна хроматографія
ТФЕ–	твердофазна екстракція
ABTS–	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)
FDA–	Food and Drug Administration
EMA –	Europe, the Middle East and Africa

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження

Рослинні лікарські засоби складають великий сегмент на фармацевтичному ринку України та світу. Їх ефективність доведена багаторічним досвідом використання у народній медицині, але у наші дні вимагає доведення з погляду доказової медицини і фармації. Якщо доказова медицина має на меті доведення біологічної ефективності, то доказова фармація має обґрунтувати правильність заготівлі, технології переробки, вибір аналітичних маркерів та забезпечення стабільності лікарської рослинної сировини (ЛРС) і лікарських форм (ЛФ) рослинного походження. Це вимагає об'єктивних та виважених підходів до стандартизації.

Підтвердження якості рослинних лікарських засобів (ЛЗ) традиційно здійснюється за допомогою макроскопічного та мікроскопічного дослідження із подальшим аналізом основного біомаркера. Як правило, для визначення хімічного складу та стандартизації рослинних препаратів використовуються хроматографічні методи аналізу [57].

Проте екстракти лікарських рослин являють собою суму біологічно активних речовин (БАР), де кожна речовина виявляє певну фармакологічну активність. Тому вибір маркера (маркерів) для стандартизації має бути обґрунтованим відповідно до його (їх) фармакологічних досліджень. Головним завданням стандартизації є доведення того, що при вхідному контролі відбирається задовільна рослина сировина, а обрана технологія виробництва дає продукт стабільної якості. Це, зі свого боку, гарантує і стабільність фармакологічного ефекту, а отже, доцільною є стандартизація рослинних препаратів за декількома речовинами-маркерами.

Препарати плюща звичайного – це рослинні лікарські засоби, що традиційно і здавна застосовуються у медичній практиці [14]. Проведені клінічні дослідження підтверджують ефективність цієї групи препаратів у лікуванні гострих захворювань дихальних шляхів [79] та запальних захворювань бронхів [58].

На Житомирській фармацевтичній фабриці Vishpha® проведено розробку оригінальних фармацевтичних препаратів, що містять екстракт листя плюща – капсул «Гедерин» та комбінованого сиропу «Гедерин+», до складу якого, крім екстракту листя плюща, входить синтетичний АФІ – сальбутамол. Для розробки модуля 3 «Якість» реєстраційного досьє необхідно провести стандартизацію цих препаратів та обґрунтувати підходи до вибору методик з огляду на їх коректність, відповідність принципам «зеленої хімії» та доказової фармації.

В ДФУ описаний єдиний маркер, який слід кількісно визначати для підтвердження якості продуктів плюща звичайного, – гедеракозид С [5]. Проте відомо, що інші компоненти плюща викликають синергічну дію по відношенню до тритерпенових сапонінів або забезпечують супутні позитивні ефекти, як, наприклад, антиоксидантний. Тому їхнє визначення та упровадження як додаткових речовин-маркерів може бути необхідним для забезпечення контролю речовин, що суттєво впливають на сукупну фармакологічну дію.

Ще одним трендом сучасної фармацевтичної розробки та використання фітопрепаратів є урахування компонентного складу ЛРС залежно від кліматичних умов [119]. З цього погляду, плющ, що широко культивується в різних країнах Європи, може відрізнятись як за компонентним складом БАР, так і за фармакологічною активністю. Тому, виникає необхідність визначення параметрів ЛРС, які мають доведений ефект, та кліматичних/екологічних факторів, що є оптимальними для отримання більш якісної сировини.

Вибір методу для аналізу є одним з головних факторів, що забезпечує об'єктивність стандартизації під час перевірки якості рослинної сировини або готового ЛЗ. Передусім, метод має бути досить точним та відтворюваним, що перевіряється під час проведення валідації. Для визначення маркера в рослинній сировині та препаратах на її основі найбільш використовуваними є хроматографічні методи [101, 177, 179]. Такий підхід є одним з інструментів доказової фармації. Також варто відзначити широке використання сумарних

методик визначення груп БАР, наприклад, флавоноїдів, фенольних кислот тощо. Крім об'єктивності та коректності аналітичної методики, до неї сьогодні висуваються й інші вимоги. Це, наприклад, економічна собівартість проведення аналізу, що буде впливати на кінцеву ціну препарату та його доступність для пацієнтів. Крім того, під час вибору методу аналізу велика увага приділяється відповідності методик принципам «зеленої хімії», головна мета та завдання якої полягають у зменшенні забруднення навколишнього середовища та ризиків для здоров'я людей.

Для підтвердження якості препаратів на основі плюща проводили визначення лише гедеракозиду С [90]. Також зустрічаються відомості про більш широке вивчення складу компонентів, таких як гедеракозид С, гедерасaponін В, α -гедерин, хлорогенова кислота, рутин та нікотифлорин за допомогою ВЕРХ із діодно-матричним детектором [117]. Зазначені речовини були знайдені в етанольному екстракті листя плюща та ЛЗ (сироп і таблетки). Оскільки методика дозволяє проводити визначення більшої кількості речовин у продуктах плюща, вона пропонує кращий підхід для їх оцінки порівняно з методикою запропонованою в [90]. Проте методика [117] все ж не дозволяє повністю оцінити хімічний склад, що ускладнює визначення речовин-маркерів для стандартизації.

На підставі вищезазначеного, нами були заплановані наукові дослідження з визначення підходів до стандартизації ЛРС та лікарських препаратів плюща звичайного з позицій доказової фармації та принципів «зеленої хімії».

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

Дисертаційна робота виконана відповідно до плану науково-дослідних робіт Національного фармацевтичного університету та проблемної комісії «Фармація» МОЗ та АМН України і є фрагментом комплексної теми «Розробка та валідація методів контролю якості лікарських засобів аптечного

і промислового виробництва» (№ державної реєстрації 0114U000949) та проблемної комісії «Фармація» МОЗ та НАМН України.

Мета і завдання дослідження

Метою роботи є обґрунтування підходів та стандартизація рослинної сировини *H. helix* та її екстрактів, розробка методик контролю якості ЛЗ плюща звичайного та їх оцінка на відповідність принципам доказової фармації та «зеленої хімії».

Для досягнення мети необхідно було вирішити наступні завдання:

- провести аналітичний огляд сучасного стану асортименту лікарських засобів плюща звичайного;
- визначити хімічний склад листя плюща звичайного для обґрунтування додаткових речовин-маркерів для стандартизації;
- дослідити вплив кліматичних умов на накопичення БАР у рослинній сировині листя плюща звичайного;
- розробити оригінальні методики контролю якості рослинної сировини *H. helix*, які б дозволили проводити швидкий вхідний контроль на виробництві та визначати можливу фальсифікацію;
- провести дослідження хімічного складу різних ЛЗ плюща звичайного та визначити речовини, що в подальшому можуть використовуватися для стандартизації;
- дослідити антиоксидантну активність компонентів досліджуваних зразків методами *in vitro*;
- розробити хроматографічні методики (ВЕРХ, УВЕРХ, ВЕТШХ) контролю якості оригінальних ЛЗ «Гедерин» капсули та «Гедерин+» сироп;
- оцінити перспективи використання різних хроматографічних методик визначення гедеракозиду С у ЛРС та препаратах з екстрактом плюща звичайного з погляду економічної собівартості та відповідності принципам «зеленої хімії»;
- розробити методики ідентифікації, визначення супутніх домішок та кількісного вмісту компонентів оригінального комбінованого сиропу

«Гедерин+»; дослідити його стабільність для визначення можливої взаємодії компонентів.

Об'єкт дослідження: ЛРС та ЛЗ плюща звичайного.

Предмет дослідження: дослідження компонентного складу рослинної сировини плюща звичайного; відбір речовин-маркерів із різних груп речовин (тритерпенових сапонінів, флавоноїдів, фенольних кислот та амінокислот); вивчення впливу кліматичних умов на накопичення БАР у сировині; вивчення компонентного вмісту препаратів плюща звичайного та визначення можливих додаткових біомаркерів; *in vitro* скринінгові дослідження антиоксидантних властивостей речовин рослинної сировини та препаратів плюща; розробка та визначення параметрів оцінки методик контролю якості оригінальних ЛЗ капсули «Гедерин» та комбінованого сиропу «Гедерин+».

Методи дослідження

Для ідентифікації компонентів рослинної сировини *Hedera helix* та препаратів на її основі використовували метод ВЕРХ з мас-детектором. Для кількісного визначення речовин застосовували такі методи: ВЕРХ із діодно-матричним детектором, ультрависокоєфективна рідинна хроматографія (УВЕРХ), високоєфективна тонкошарова хроматографія (ВЕТШХ), газова хроматографія з мас-детектором (ГХ/МС), абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій та видимій ділянках спектра. Дослідження *in vitro* антиоксидантних властивостей екстрактів та окремих БАР були виконані методом ВЕРХ із постколонковою дериватизацією ABTS, сумарна активність груп БАР – методом УФ. Для обробки отриманих даних були використанні ієрархічний аналіз, метод Спірмена та метод головних компонентів у програмному забезпеченні SPSS. Валідація розроблених методів здійснювалася за вимогами Державної Фармакопеї України (ДФУ). Для обробки даних використовували стандартний пакет програм Microsoft Office.

Наукова новизна отриманих результатів

Розроблено та валідовано експресну хроматографічну методику (ВЕРХ з діодно-матричним детектором) для кількісного визначення низки таких

речовин як тритерпенові сапоніни, флавоноїди та фенольні кислоти в сировині *Hedera helix*. Завдяки проведеним дослідженням вдалося кількісно оцінити понад 20 компонентів.

Уперше визначений вплив різних факторів навколишнього середовища на накопичення активних компонентів у рослинній сировині плюща звичайного.

Уперше методика ВЕРХ/ABTS бул апробована для *in vitro* скринінгу антиоксидантної активності компонентів у рослинній сировині та препаратів плюща звичайного, в результаті чого була отримана інформація щодо внеску антиоксидантної активності окремих компонентів.

Розроблено та валідовано ГХ-МС методику для дослідження вмісту вільних амінокислот листя плюща.

Уперше розроблено та валідовано ВЕРХ, УВЕРХ та ВЕТШХ методики визначення якості різних лікарських форм *Hedera helix* за вмістом гедеракозиду С. Уперше проведено комплексну оцінку розроблених методик за наступними показниками: аналітична точність, вартість застосування та відповідність принципам «зеленої хімії».

Розроблено оригінальну ВЕРХ методику для одночасного кількісного визначення сальбутамолу сульфату та калію сорбату у складі багатокомпонентного сиропу «Гедерин+».

Запропоновано оригінальний комбінований підхід до оцінки методик стандартизації ЛРС та ЛЗ з екстрактом плюща звичайного з погляду доказової фармації, економічної собівартості та відповідності принципам «зеленої хімії».

Практичне значення отриманих результатів

Запропоновано підхід до стандартизації ЛРС та препаратів плюща звичайного, що також містить методологічне підґрунтя для оцінки хроматографічних методик стандартизації препаратів рослинного походження у рутинному контролі виробництва. Розроблені аналітичні методики ВЕРХ можуть використовуватися для рутинного кількісного визначення

гедеракозиду С, сальбутамолу сульфату і калію сорбату. Також для контролю рівня домішок сальбутамолу сульфату в сиропі «Гедерин+» було розроблено ВЕРХ методики. Розроблені методики були включені до модуля 3 «Якість» реєстраційних досьє для сиропу «Гедерин+» та капсул «Гедерин» виробництва Житомирської фармацевтичної фабрики Vishpha®.

Зазначені методики були використані для вивчення взаємодії синтетичних речовин та рослинного екстракту на прикладі сиропу «Гедерин+» під час визначення стабільності основних речовин при довготривалому зберіганні (24 місяці).

Уперше запропонована пробопідготовка з використанням твердофазної екстракції для аналізу гедеракозиду С як маркера лікарських засобів, що містять екстракт листя плюща (Спосіб визначення гедеракозиду С методом високоефективної рідинної хроматографії з попереднім застосуванням твердофазної екстракції в складі комбінованих лікарських форм: патент України на корисну модель № u201905811 від 27.05.2019 р.).

Результати дисертаційних досліджень були запроваджені в науково-практичну діяльність кафедри фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького; кафедри фармацевтичної хімії Тернопільського державного медичного університету імені І.Я Горбачевського; кафедри фармацевтичної хімії Запорізького державного медичного університету.

Особистий внесок здобувача

Дисертантом особисто було проведено: аналіз літературних даних щодо хімічних досліджень рослинної сировини та препаратів *Hedera helix*; розроблено методики хімічного дослідження листя плюща звичайного, а також напівпродуктів та ЛЗ на його основі; проведено експериментальні дослідження продуктів *Hedera helix*, узагальнення, статистичні обчислення та інтерпретацію отриманих результатів.

Експериментальні дослідження були виконані з використанням аналітичного обладнання Державної науково-дослідної лабораторії з

контролю якості лікарських засобів Національного фармацевтичного університету (зав. лаб. к.ф.н. С. М. Губарь) та кафедри аналітичної та токсикологічної хімії Литовського університету наук здоров'я (зав. каф. проф. Л. Іванаускас) під час академічного обміну в межах програми «ERASMUS+».

Наукові праці опубліковані у співавторстві з А. С. Матерієнко, С. М. Губарь, В. А. Георгіянц, Л. Іванаускасом, А. А. Котвіцькою, С. Ю. Штриголем, Ю. В. Корж, І. А. Вишневським, В. О. Грудько, М. Маркса, В. В. Гриненко, А. В. Мигаль, В. М. Кушніруком). Співавторами наукових праць є науковий керівник та науковці, спільно з якими проводились дослідження. У наукових працях дисертанту належить фактичний матеріал та основний творчий доробок.

Апробація результатів дисертації

Основний зміст дисертаційної роботи викладено та обговорено на науково-практичних заходах різного рівня: «The 8th International Conference on Pharmaceutical Sciences and Pharmacy Practice» (Каунас, 15 грудня, 2017 р.), V Міжнародному медико-фармацевтичному конгресі студентів і молодих учених BIMCO 2018 (Чернівці, 4-6 квітня, 2018 р.), Chemistry Conference for Young Scientists «ChemCys 2018» (Бланкенберге, 21-23 лютого, 2018 р.), Всеукраїнській Науково-практичній конференції «Актуальні питання сучасної медицини і фармації» (до 50-річчя заснування ЗДМУ) (Запоріжжя, 18-25 квітня 2018 р.), Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій 80-річчю з дня народження доктора фармацевтичних наук, професора О. М. Гайдукевича «Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій» (Харків, 12-13 квітня 2018р.), XXV International Scientific and Practical Conference of young scientists and student «Topical issues of new drugs development» (Харків, 18-20 квітня, 2018 р.), The 9th International Conference on Pharmaceutical Sciences and Pharmacy Practice (Каунас, 9 листопада, 2018), XXVI Міжнародній науково-практичній конференції молодих учених та студентів (Харків, 10-12 квітня 2019 р.), XIII науково-практичній конференції з міжнародною участю

«Управління якістю в фармації» (Харків, 19-20 вересня, 2019 р.), Науково-практичній конференції «Сучасні проблеми фармакології, косметології та ароматології» (Одеса, 4 жовтня, 2019 р.), 10th International Pharmaceutical Conference „Science and Practice 2019” (Каунас, 15 листопада, 2019 р.), Міжнародній науково-практичній конференції «Planta+», присвяченій пам'яті доктора хімічних наук, професора Ніни Павлівни Максютіної (до 95-річчя від дня народження) (Київ, 20-21 лютого 2020 р), International distance conference contemporary pharmacy: issues, challenges and expectation (Каунас, 8 травень, 2020), VII Annual scientific and practical conference of Farmak's School of young scientists with international involvement «Science and modern pharmaceutical manufacturing» (Київ, 21 листопад, 2019), Науково-практичній дистанційній конференції з міжнародною участю «Сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження», присвяченій 75-й річниці університету та 20-й річниці створення фармацевтичного факультету (Івано-Франківськ, 19-20 травня 2020 р.), XIV науково-практичній конференції «Управління якістю в фармації» (Харків, 22 травня 2020 р.).

Публікації

За результатами дисертаційної роботи опубліковано 21 наукову працю. З них 1 патент на корисну модель, 4 статті у науково-фахових виданнях (з них 3, що включені до міжнародної наукометричної бази Scopus) та 16 тез доповідей у збірниках матеріалів міжнародних та всеукраїнських науково-практичних конференцій.

Структура та обсяг дисертації

Дисертаційна робота викладена на 228 сторінках машинописного тексту, складається зі вступу, 4 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел та 3 додатків. Обсяг основного тексту складає 114 сторінок друкованого тексту. Робота ілюстрована 53 таблицями та 41 рисунком. Список використаних джерел містить 182 найменування, з них 17 кирилицею та 165 латиницею.

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНИЙ СТАН, ПЕРСПЕКТИВИ ТА ПІДХОДИ ДО СТАНДАРТИЗАЦІЇ ПРЕПАРАТІВ НА ОСНОВІ ЕКСТРАКТУ ЛИСТЯ ПЛЮЩА ЗВИЧАЙНОГО (Огляд літератури)

Hedera helix L. (плющ звичайний) – одна з найвідоміших рослин, яка використовується у фармації [14]. Асортимент препаратів плюща на світовому фармацевтичному ринку представлений різними лікарськими формами, серед яких зустрічаються сиропи, таблетки, краплі, саше, льодяники.

1.1 Характеристика та ареал розповсюдження плюща звичайного

1.1.1 Характеристика плюща звичайного

Рослина являє собою вічнозелену дводомну ліану, належить до роду *Hedera*, що налічує приблизно 15 різних видів рослин, родини аралієвих (Araliaceae) [7, 11, 14].

Плющ звичайний має дві фази росту, вегетативну (ювенальну) та статеву репродуктивну (дорослу) (рис. 1.1, табл. 1.1). Окремі рослини можуть мати як ювенальні, так і дорослі стебла. Ювенальна, як правило, вкриває ґрунт і починає підніматися лише за наявності певної вертикальної структури (наприклад, дерево, чагарники), після чого, дійшовши найвищої точки поверхні, переходить у дорослу фазу [116]. Стебло розгалужене з великою кількістю додаткових коренів. У ювенальній стадії листки черешкові, чергові, шкірясті, голі, блискучі, серцеподібної форми, трьох-, п'яти пальчасто лопатеві, на квітконосних (дорослих) – цілі, яйцеподібні або ромбоподібні. Квітки дво- або одностатеві, правильні, п'ятичленні, жовто-зелені, зібрані у складні зонтики, утворюють китиці.



Ювенальна (молода)



Статеву репродуктивну (доросла)

Рис. 1.1. Фотографії різних фаз росту *Hedera helix*

Таблиця 1.1

Порівняння ювенальної та дорослої фаз росту *H. helix* [163]

Вид	Ювенальна (молода)	Доросла
Проростання	Плагіотропний	Ортотропний
Квітки	Відсутні	Присутні
Швидкість росту	Стрімкий	Незначний
Форма листка	Дольчаста	Цілий
Здатність до вкорінювання	Висока	Слабка
Повітряні корені	Присутні	Відсутні

Квіти зібрані в зонтики на дорослих стеблах, зазвичай їх від 8 до 20, ростуть у скупченні від 3 до 6. Плід має кулясту форму, блискучий, після дозрівання ягода може набувати від темно-фіолетового до синьо-чорного кольору з 3–5 круглими тригранними насінинами. Період цвітіння із серпня до жовтня [12].

Офіційною сировиною, яка використовується з фармацевтичною та медичною метою, є листя [17]. Збір сировини відбувається навесні та влітку, необхідно використовувати листя з пагонів, що знаходяться в ювенальній фазі росту [5].

1.1.2 Вплив умов навколишнього середовища на накопичення речовин та розповсюдження плюща звичайного

Вміст БАР визначає якість та ефективність рослинних препаратів [127]. Умови навколишнього середовища, в яких проростає рослина, мають суттєвий вплив на акумуляцію фенольних речовин [119].

Різноманітні фактори навколишнього середовища впливають на акумуляцію БАР у рослині. Деякі дослідження повідомляють про залежність накопичення компонентів від клімату та метеорологічних умов [26, 136], природних факторів (температури, вологості, типу ґрунту) [104] та географічної локації [103].

Рослини, які були зібрані в різних географічних зонах, можуть відрізнятися за якісним та кількісним вмістом. Подібні дослідження проводились для *Panax ginseng* [132], *Quillaja saponaria* [41], *Tribulus terrestris* [151].

Однією з основних груп компонентів плюща є сапоніни. Вплив факторів навколишнього середовища на акумуляцію сапонінів пояснюється участю цих речовин у пристосувальних механізмах рослини до природних факторів. Вони відіграють важливу захисну роль, а також беруть участь у взаємодіях рослини з навколишнім середовищем [20, 66].

Крім того, раніше повідомлялося про вплив навколишнього середовища на акумуляцію домінантних вторинних метаболітів – флавоноїдів та фенольних кислот [98, 119].

Плющ звичайний розповсюджений по всьому світу, проте батьківщиною для нього є саме країни Євразії [147, 162].

На території України плющ звичайний можна легко знайти на Західному Поліссі, у Правобережному Лісостепу, а також у Карпатах і прилеглих регіонах [11].

Найчастіше рослину можна зустріти в тінистих широколистяних, змішаних лісах на низинах та передгір'ях [4]. Легко вирощується на добре

дренованих ґрунтах із середньою вологістю в місцях з півтінію до повного затінення, проте також може рости у повністю сонячних місцях. Рослина є толерантною до широкого спектру ґрунтів, але віддає перевагу суглинку. Може витримувати невелику посуху. Розмножується вегетативно або за допомогою насіння. Стебла можуть укорінюватися у вузлах біля самого ґрунту. Проте пліощ звичайний також зустрічається у хвойних лісах, саванах, змішаних хвойно-листяних лісах, чагарниках. Вважається, що *H. helix* може впливати на інші рослини, поступово витісняючи їх.

Отже, у зв'язку з тим, що *H. helix* росте в різних країнах Європи, подібні дослідження необхідні для визначення найбільш сприятливих умов для вирощування якісної та стандартизованої рослинної сировини.

1.2 Фармакологічні властивості, застосування та препарати пліоща звичайного

1.2.1 Фармакологічні властивості

Захворювання органів дихання виникають у людей незалежно від віку і соціального статусу та залишаються однією з найбільш розповсюджених патологій серед населення України [8]. Відповідно до статистичних даних, в Україні на ці захворювання страждають від 10 до 16 млн людей щорічно. Одним із найчастіших симптомів, на який скаржаться пацієнти, є кашель.

Препарати на основі екстракту листя пліоща широко застосовуються для лікування гострих респіраторних інфекцій та запальних бронхітів, що супроводжуються кашлем, і захворювань бронхолегеневої системи в цілому [25, 44, 115, 161]. Ефективність листя *H. helix* була виявлена в численних *in vitro* та *in vivo* дослідженнях, що підтвердили наявність бронхолітичної, спазмолітичної, антимікробної, протигрибкової, антиоксидантної, протизапальної та відхаркувальної дії [46, 58, 63, 68, 78, 81, 115, 161, 168, 169].

Етанольний екстракт листя пліоща (у дозі 50 мг/кг маси тіла), що вводився пероральним шляхом мурчакам, послаблював бронхозвужувальний

ефект овальбуміну. Інгібування бронхозвужувального ефекту було на 57% ефективніше за плацебо [21].

Дослідження протизапального ефекту етанольного екстракту *H. helix* виявили такі результати. Внутрішньочеревні ін'єкції 7,5 мл/кг екстракту показали протизапальну активність (88,89 % інгібування) за індукованою формаліном набряку лапи щура, порівняно з диклофенаком, який показав 94,44 %. Дослідження впливу етанольного екстракту плюща звичайного для лікування артриту довели, що він виявив значний ефект, помірно зменшуючи артритні симптоми [107].

Листя плюща звичайного, які мали високий вміст гедеракозиду С, виявили значну антибактеріальну активність щодо грампозитивних бактерій (*Bacillus spp*, *Staphylococcus spp*, *Enterococcus spp* та *Streptococcus spp*) з мінімальною інгібувальною концентрацією (МІК) 0,3–1,25 мг/мл, грамнегативних бактерій (*Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Pseudomonas spp*, *Escherichia coli* та *Proteus vulgaris*) зі значенням МІК 1,25–5 мг/мл та *Candida albicans* із значенням МІК 2,5 мг/мл [21].

Протигрибкову активність тритерпенових сапонінів досліджували *in vitro* за допомогою методу розведення в агарі. Серед усіх речовин α -гедерин був найбільш активною сполукою по відношенню до дріжджів та дерматофітів. *Candida glabrata* була найбільш вразливим штамом до дії сапонінів.

Дослідження антиоксидантного ефекту метанольних екстрактів листя плюща звичайного проводили з використанням DPPH розчину (табл. 1.2). Для порівняння використали стандарт β -каротину в тих же концентраціях. Як видно з отриманих результатів, екстракт листя плюща перевищує β -каротин за антиоксидантною активністю за однакових концентрацій.

Таблиця 1.2

Дослідження антиоксидантної активності екстрактів листя плюща [21]

Концентрація екстракту плюща (мкг/мл)	Антиоксидантна активність (%)	Концентрація β -каротину (мкг/мл)	Антиоксидантна активність (%)
50	25,95 $\pm$ 1,02	50	16,70 $\pm$ 2,59
100	32,68 $\pm$ 1,26	100	42,13 $\pm$ 3,69
200	43,58 $\pm$ 1,89	200	50,45 $\pm$ 3,59
400	66,23 $\pm$ 2,02	400	58,08 $\pm$ 3,48
500	86,78 $\pm$ 2,58	500	60,36 $\pm$ 4,29
1000	86,80 $\pm$ 2,48	1000	61,03 $\pm$ 5,96
2000	94,47 $\pm$ 3,85	2000	62,50 $\pm$ 3,59
3000	95,28 $\pm$ 3,49	3000	63,61 $\pm$ 2,24
4000	95,95 $\pm$ 2,58	4000	75,85 $\pm$ 2,59

Також проводили вивчення антиоксидантної активності різних фракцій плюща. Витяжку здійснювали з використанням *метанолу Р*, *гексану Р*, *хлороформу Р*, *етилацетату Р*, *води Р*. Серед усіх розчинників метанольний мав найбільшу активність – 84,88 % за концентрації 100 мкг/мл. Гексанова фракція не виявила жодного ефекту. Фракція хлороформу показувала значний результат 80,55 % (100 мкг/мл). Витяжки етил ацетату та води мали майже однакові значення – 55,10 та 55,74 %, відповідно [21].

Також описані результати клінічних випробувань листя плюща у разі гострих захворювань дихальних шляхів [79] та запальних захворювань бронхів [58].

Ефективність препаратів, що містили екстракти із висушеного листя плюща, вивчали під час лікування дітей, що страждали на бронхіальну астму. Показники бронхолітичного ефекту ЛЗ значно перевищували плацебо. Випробування показали, що препарати екстракту листя плюща значно покращують дихання у дітей із хронічною бронхіальною астмою.

Також проводилися дослідження за участю 9657 пацієнтів-волонтерів (5181 з яких були діти), хворих на бронхіт (гострий або хронічний). Для лікування використовували сироп, що містив екстракт листя плюща звичайного. Через 7 днів терапії 95 % пацієнтів продемонстрували поліпшення

самопочуття або повне одужання. Крім цього, під час проведення терапії частота побічних явищ складала лише 2,1 % (головним чином, шлунково-кишкові розлади –1,5 %) [107].

1.2.2 Застосування в народній медицині

У народній медицині *H. helix* застосовували у разі звичайної застуди, пов'язаної з кашлем, і для симптоматичного лікування гострих та хронічних запальних захворювань бронхів [25]. Плющ звичайний застосовувався у вигляді водних настоїв та відварів для лікування бронхітів, пневмонії, туберкульозу легень, гострих гастритів, захворювань печінки та жовчних шляхів [10]. Також листя використовували як знеболювальний та протизапальний засіб. Листя та ягоди приймали як відхаркувальний засіб для лікування кашлю та бронхіту [139].

У разі внутрішнього застосування етанольних екстрактів добова доза для дорослих складала 250-420 мг, для дітей віком від 4 до 12 років – 150-210 мг, від 1 до 4 років – 50-150 мг та від 0 до 1 року – 20-50. Поряд з цим для екстрактів, що не містять етанолу, можливе застосування в інших дозах, наприклад, для дорослих – 300-945 мг, для дітей віком від 4 до 12 років – 200-630 мг, від 1 до 4 років –150-300 мг, від 0 до 1 року – 50-200 мг [107].

Сухі листки плюща звичайного заварюють у вигляді чаю. Для цього необхідно до 1 чайної ложки (0,3-0,8 г) додати приблизно 250 мл окропу та настоювати листки протягом 10 хвилин. Чай вживати три рази на день [21]. Відвари свіжого листя (200 г/л у воді) зовнішньо використовують для лікування ревматизму.

Побічні реакції або ризики для здоров'я від застосування в зазначених терапевтичних дозах не відомі. Проте свіже листя та сік із них можуть викликати дерматити. Також повідомляється про алергічні реакції очей, шкірних покривів та респіраторної системи серед садівників, що викликані самою рослиною [107].

1.2.3 Препарати плюща звичайного на фармацевтичному ринку України

Листя плюща, екстракти та препарати для перорального застосування належать до ліків з добре встановленим використанням на основі статті 10а Директиви 2001/83/ЄС [25]. На сьогоднішній день світовий фармацевтичний ринок представлений великою кількістю різних лікарських форм на основі *H. helix* (сироп, краплі, саше, розчинні таблетки).

Одним із напрямків лікування кашлю є забезпечення екскреції секрету (мокроти) з дихальних шляхів. Для цього використовують відхаркувальні засоби, що сприяють виведенню секрету. Також слід відзначити, що спостерігається підвищення попиту на ЛЗ, до складу яких входять екстракти рослин [15]. За нормативно-директивними документами Міністерства охорони здоров'я (МОЗ) України, препарати групи відхаркувальних засобів рослинного походження становлять 63 асортиментні позиції [1]. Серед зазначених ЛЗ найбільшу частку займають препарати, до складу яких входить екстракт листя плюща.

За даними, які було знайдено в Компендіумі-онлайн [9], відібрали препарати з екстрактом листя плюща. З-поміж усіх рослинних відхаркувальних ЛЗ частка препаратів на основі екстракту листя плюща становить 23,81 %. Серед різних ЛФ найчастіше зустрічаються сиропи (52,39 %), потім капсули (14,29 %), краплі (9,52 %), розчини від кашлю (9,52 %), таблетки (9,52 %) та пастилки (4,76 %).

Асортимент в основному представлений препаратами закордонних виробників, лише 28,57 % від загальної кількості складають препарати вітчизняного виробництва. Щодо компонентного складу ЛЗ, то майже всі вони однокомпонентні, проте можна зустріти комбінацію екстрактів листя плюща і трави чебрецю.

За результатами аналізу фармацевтичного ринку України можна зробити висновок про перспективність розробки українських препаратів на основі екстракту листя плюща. Крім того, препарати на основі плюща можуть застосовуватися як у дорослих, так і у дітей. Прийом препаратів здійснюється

незалежно від прийому їжі. Під час тривалого вживання побічні реакції виникають не часто, тому є можливість їхнього тривалого застосування. Дані про взаємодію з іншими препаратами відсутні.

1.3 Хімічний склад, підходи до стандартизації рослинної сировини та препаратів плюща звичайного

1.3.1 Вивчення компонентного складу плюща звичайного

Фармакологічний ефект рослини може бути спричинений дією різних біологічно активних речовин, що містяться в її складі [86, 95, 173]. Тому терапевтичний ефект рослинного ЛЗ найчастіше являє собою поєднання ефектів всіх речовин (синергізм) [115]. Тобто, ефективність такого препарату буде залежати від хімічного складу.

Дослідження компонентного складу *H. helix* установили наявність ненасичених стеролів, танінів, фенольних речовин, алкалоїдів, похідних цукрів та сапонінів [109, 139, 150, 170].

Основними компонентами, відповідальними за фармакологічне застосування препаратів *H. helix*, є тритерпенові сапоніни та їх похідні [21, 58, 68, 107, 157, 161], головним чином, α -гедерин, що відповідає за терапевтичну активність. Він виявляє секретолітичний та бронхолітичний ефекти. Крім того, потрапляючи в організм людини, гедеракозид С метаболізується до α -гедерину [79, 158, 161].

Також профіль тритерпенових сапонінів представлений похідними гедерагеніну, олеанолової кислоти. Речовини цієї групи – це вже згаданий гедерасапонін С (гедеракозид С), а також гедерасапоніни В, D, E, F, G, H, I, у такому співвідношенні: 1000 : 70 : 45 : 10 : 40 : 15 : 6 : 5, відповідно. Також зустрічається інформація про наявність гедерасапоніну А [43] (рис. 1.2).

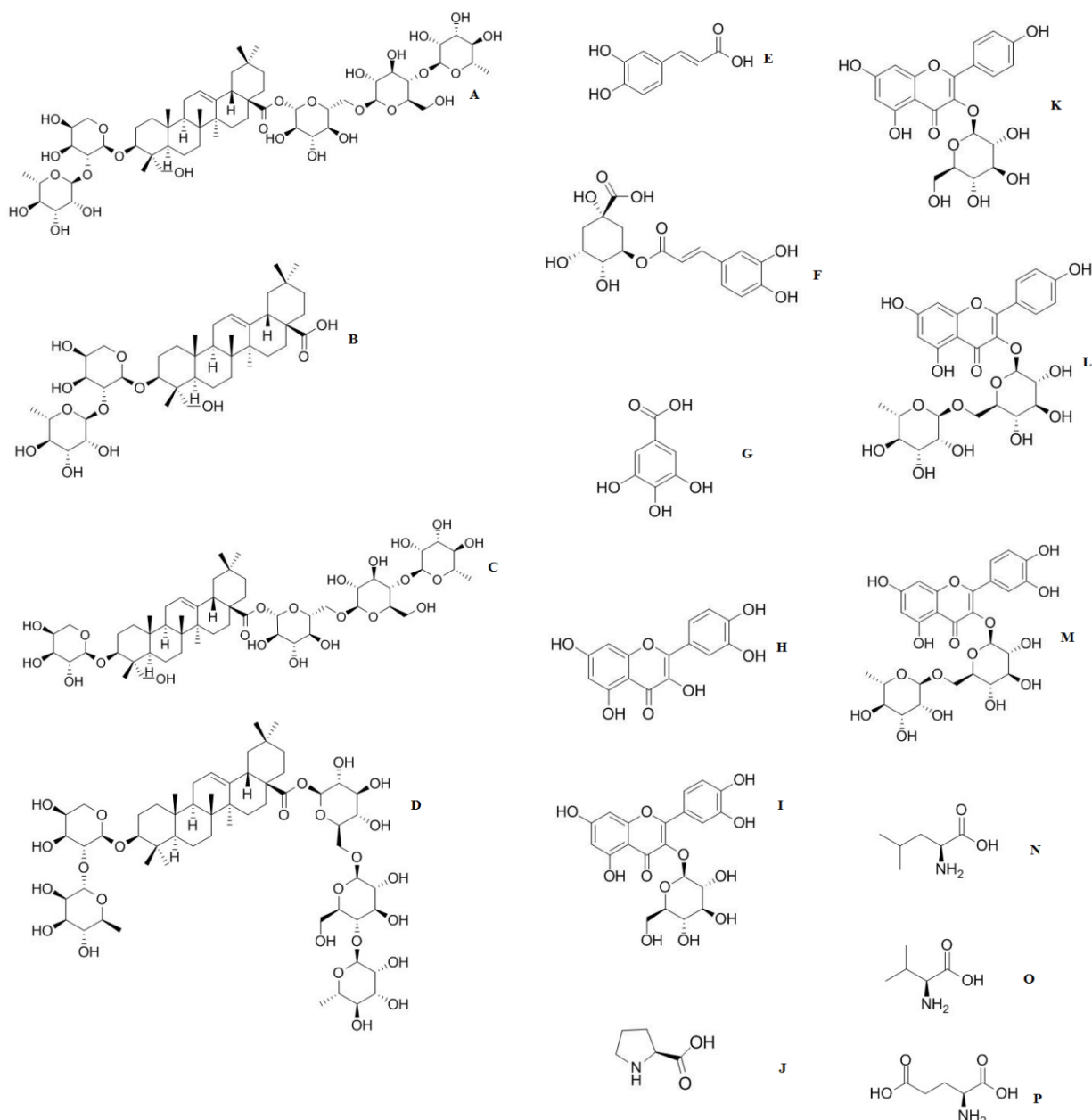


Рис. 1.2. Структурні формули речовин, що входять до складу плюща звичайного: А – гедеракозид С; В – α -гедерин; С – гедеракозид D; D – гедерасAPONIN B; E – кофейна кислота; F – кислота хлорогенова; G – галова кислота; H – кверцетин; I – ізокверцетрин; J – пролін; K – астрагалін; L – нікотрифолін; M – рутин; N – лейцин; O – валін; P – глютамінова кислота

Листя плюща містять флавоноїди, які належать до агліконів (кверцетин, кемпферол) та глікозидів (рутин (кверцетин 3-рутинозид), ізокверцитрин (кверцетин 3-глікозид), астрагалін (кемпферол 3-глюкозид), нікотифлорин (кемпферол 3-рутинозид)) [117, 169] (рис. 1.2).

Профіль фенольних кислот представлений кофейною, хлорогеновою, неохлорогеновою, 4,5-дикофеїлхінною, 3,5-дикофеїлхінною, кумаровою, хініною, розмариною, піротокатехіною та галовою кислотами [169].

Також пліс звичайний має досить різноманітний склад амінокислот. Було знайдено майже 30 різних амінокислот, 8 з яких є незамінними і 2 – частково-замінними (валін, ізолейцин, лейцин, лізин, триптофан, треонін, фенілаланін, метіонін, аргінін та гистидин). Пролін, аспарагін, γ -аміномасляна та глютамінова кислоти, цистеїн та аланін домінували в сировині пліси [13, 77].

H. helix має широкий профіль летких речовин (β -елемен, γ -елемен (еліксен), метилетилкетон, метилізобутилкетон, транс-2-гексанал, транс-2-гексанол, гермакрен D, β -каріофілен, сабінін, α -, β -пінен, лимонен та фурфурол) та жирних кислот (петроселінова, олеїнова, цискекценічна, пальмітолеїнова), а також містить β -лектини [64, 69].

Також було знайдено представника кумаринів — скополін [25], деякі органічні кислоти (мурашину та оцтову) [28], стероли (холістерол, кампестерол, стигмастерол, ситостерин), вітаміни E, C, провітамін A та вуглеводні (фруктозу, сахарозу, рафінозу, глюкозу, галактозу).

Основними алергенами пліси є поліацетатні сполуки фалькаринол та дидегідрофалькаринол, які володіють подразливими властивостями [61].

Через наявність алкалоїду еметину у разі прийому всередину можлива блювота. Цей алкалоїд було ізольовано з пліси, який проростав в Єгипті [108], проте в подальших дослідженнях його присутність не була підтверджена [45].

1.3.2 Стандартизація рослинної сировини

Як правило, всі ліки, незалежно від того синтетичні вони чи рослинного походження, мають відповідати основним вимогам безпечності та ефективності [6, 57]. Для виготовлення фітопрепаратів, лікарські рослини збирають, сушать і зберігають, тому можлива певна відмінність серед таких

ЛЗ. Ця відмінність також спричинена різницею вирощування, географічного місця проростання, часу збирання врожаю, процесами збирання, сушіння, зберігання, транспортування та переробки (наприклад, режим екстракції, полярність розчинника, нестабільність складових). Для забезпечення високої якості, ефективності та безпечності препаратів процес стандартизації рослинних ЛЗ повинен включати визначення декількох речовин-маркерів. Конкретні речовини визначаються експериментальним шляхом, що дозволяє знайти найбільш прийнятні умови контролю якості фітопрепаратів [71].

Під час стандартизації рослинних ЛЗ виникає декілька проблем, а саме:

- 1) до складу фітопрепаратів, як правило, входять різні речовини;
- 2) на активність препарату можуть впливати декілька компонентів;
- 3) необхідність застосування селективних методів аналізу для кількісного визначення маркерів;
- 4) якість сировини може змінюватися в залежності від різного походження;
- 5) застосування різних сортів рослини.

На сьогодні, підтвердження якості рослинних ЛЗ часто здійснюється за допомогою макроскопічного та мікроскопічного дослідження з подальшим аналізом основного біомаркери [72, 166]. Проте деякі виробники створюють свої власні параметри стандартизації для забезпечення безпечності та ефективності препаратів [52]. Як правило, тільки за допомогою хроматографії можна проводити визначення компонентного складу та стандартизацію рослинних препаратів за декількома речовинами-маркерами [57].

Крім того, для забезпечення якості препаратів їх стандартизація має охоплювати всі процеси їх виготовлення – від вирощування лікарської рослинної сировини (ЛРС) до перевірки виготовленого ЛЗ.

1.3.3 Методики аналізу рослинної сировини та препаратів плюща звичайного

Головним фармакологічним ефектом препаратів є секретолітична та бронхолітична дія. Така дія листя плюща обумовлена наявністю тритерпенових сапонінів, а саме α -гедерином, який відіграє значну роль у

забезпеченні терапевтичної дії препаратів *H. helix* [68]. Адже, саме йому приписують основну фармакологічну дію. Крім того, виділяють гедеракозид С, який перетворюється на α -гедерин після резорбції в кров [33].

Згідно з вимогами ДФУ та ЄФ для підтвердження якості листя плюща, необхідне проведення ідентифікації α -гедерину та гедеракозиду С методом ТШХ та кількісного визначення гедеракозиду С методом ВЕРХ [6, 57].

На сьогоднішній день гедеракозид С є єдиним маркером, який необхідно кількісно вимірювати для забезпечення якості екстрактів листя плюща та препаратів [30]. Тому більшість розроблених методів включає визначення тільки цієї сполуки. Найчастіше кількісний аналіз здійснюється з використанням ВЕРХ методу в поєднанні з різноманітними детекторами. Основною сферою його використання є оцінка змін компонентного складу компонентів залежно від різноманітних умов та періодів вирощування. Крім того, методи ВЕРХ застосовуються для кількісної оцінки ЛЗ, що містять екстракт листя плюща звичайного.

ДФУ та ЄФ рекомендують використовувати градієнтний ВЕРХ метод. В аналізі регламентується застосування колонки заповненої *октадецилсилільним Р* з частинками 5 мкм, розмір колонки має становити 125 $\times$ 4 мм. Як рухому фазу А рекомендують суміш *ацетонітрилу Р–води Р–фосфорної кислоти Р* (14 : 88 : 2 об/об/об) та *ацетонітрил Р* як рухому фазу Б. Елюювання відбувається за швидкості 1.5 мл/хв, визначення компонентів проводиться за довжини хвилі 205 нм. Цей метод є точним та селективним, проте його застосування вимагає відносно тривалого часу (приблизно 40 хвилин), що не бажано у рутинному аналізі.

Крім фармакопейної, в літературі наведені й інші методики визначення гедеракозиду С: методи ВЕРХ із використанням діодно-матричного детектора для листя [144], екстрактів, деяких ЛФ [47], а також метод РХ із мас-детектором для плазми щурів [90, 117].

Методом ВЕРХ з діодно-матричним детектором були визначені α -гедерин та гедеракозид С для оцінки зміни кількісного вмісту основних

компонентів в листі плюща звичайного [47]. Для розділення компонентів було використано колонку Eurosphere C18 (Німеччина) з довжиною 12.5 см, внутрішнім діаметром 4 мм та розміром частинок 5 мкм. Елюювання відбувалося у градієнтному режимі, суміш *вода Р–ацетонітрил Р–85 % ортофосфорна кислота* у співвідношенні 90 : 10 : 0.5 (об/об/об), як рухома фаза А та *ацетонітрил Р*, рухома фаза Б. Швидкість руху складала 1,5 мл/хв, детектування відбувалось за довжини хвилі 205 нм. Методику можна вважати своєрідною адаптацією фармакопейного методу для одночасного визначення гедеракозиду С та α -гедерину.

Також повідомляється про ВЕРХ методику для кількісного визначення гедеракозиду С у сиропі, до складу якого входять екстракти листя плюща звичайного та чебрецю [90]. У цій методиці пропонується колонка Phenomenex-Gemini C 18 (250 × 4,6 мм, із розміром частинок 5 мкм). Як рухомих фаз А використовують суміш *вода Р–ацетонітрил Р–85 % ортофосфорна кислота* (860 : 140 : 2 об/об/об), як рухомих фаз Б – *ацетонітрил Р*. Аналіз відбувається за швидкості рухомих фаз 1,5 мл/хв, детектування речовин проводять за довжини хвилі 205 нм.

Для дослідження фармакокінетики екстракту листя плюща було розроблено ВЕРХ метод із мас-детектором [180]. Метод дозволяє проводити визначення трьох тритерпенових сапонінів (гедеракозиду С, α -гедерину та гедеракозиду D) у плазмі щурів. Зразок плазми вортексекстрували з використанням *ацетонітрилу Р* і подальшим центрифугуванням та випаровуванням верхнього шару у Thermo Savant SpeedVac. Для хроматографування використовували Thermo Hypersil GOLD C18 колонки (50 × 2,1 мм, з розміром частинок 1,7 мкм). Як рухомих фаз застосували 0,1 % *водний розчин мурашиної кислоти* (рухома фаза А) та *ацетонітрил Р* (рухома фаза Б) при швидкості руху 0,3 мл/хв. Для визначення речовин використовували мас-детектор Xevo TQ-S.

У літературі зустрічається метод одночасного визначення гедеракозиду С, гедерасапоніну В, α -гедерину, хлорогенової кислоти, рутину

та нікотифлорину в екстракті та препаратах *H. helix* [117]. У дослідженні застосовували колонку УМС Hydrosphere C18 (150 × 4,6 мм, з розміром частинок 5 мкм). Рухомими фазами були *ацетонітрил Р* (рухома фаза А) та 0,1 % водний розчин ортофосфорної кислоти (рухома фаза Б) за швидкості потоку 0,5 мл/хв. Визначення речовин проводилось за довжини хвилі 210 нм.

Також раніше було розроблено ВЕТШХ метод із мас-детектором, що дозволив провести порівняння серед профілів листків плюща різних родів [157]. Методика дає можливість визначати кофейну кислоту, астрагалін, ізокверцитрин, кемпферол-3-О-глюкозид, рутин, хлорогенову кислоту, α -гедерин, гедерасапонін В та гедеракозид С. Для визначення фенольних речовин необхідно застосувати рухому фазу, яка складається з *етилацетату Р-метанолу Р-води Р-льодяної оцтової кислоти Р* (9 : 1 : 1 : 0,25 об/об/об/об). Для дослідження профілю тритерпенових сапонінів необхідно застосовувати іншу рухому фазу, а саме *етилацетату Р-метанолу Р-води Р-льодяної оцтової кислоти Р* (20 : 5 : 4 : 0,5 об/об/об/об). Для розділення компонентів використали ВЕТШХ пластину із *силікагелем Р*, відстань, яку має пройти рухома фаза, становить 90 мм.

Зазначені методики дозволяють провести визначення не тільки тритерпенових сапонінів, а і флавоноїдів та фенольних кислот [31]. Ці речовини виявляють певні фармакологічні властивості [165] разом з антиоксидантною активністю [48].

Антиоксиданти захищають клітини організму людини різними способами. Це відбувається у результаті перетворення реактивного кисню на безпечніші форми, порушуючи при цьому ланцюгову реакцію окисної дії, що, зі свого боку, приводить до зменшення локалізованих концентрацій кисню [50, 126].

Синтетичні антиоксиданти мають досить широке застосування завдяки високій стабільності та низькій собівартості [149, 178]. Проте у разі їх тривалого використання спостерігається поява певних побічних ефектів, що може згодом призвести до низки захворювань [34, 53, 85, 138].

Різноманітні рослини добре відомі своїми антиоксидантними властивостями. Інтерес до рослинної сировини як джерела антиоксидантів викликаний її високою активністю та відносно легкою доступністю [105]. Тому застосування ЛЗ, які, крім основного терапевтичного ефекту, володіють антиоксидантними властивостями, може мати певні переваги у лікуванні.

Дані фармакологічних досліджень стверджують, що, крім тритерпенових сапонінів, інші речовини плюща виявляють позитивний терапевтичний ефект у лікуванні. Різні дослідження підтверджують мультифармакологічні властивості кофеїлхінних кислот, включаючи протизапальну, кардіопротекторну, нейропротекторну та антиоксидантну [171, 120].

Хлорогенова кислота виявляє протизапальну активність завдяки своїй здатності інгібувати синтез специфічних цитокінів IgE і TH2-клітин [91] та знижує вироблення простагландину E2 (PGE2) [51]. Крім того, вона знижує LPS-індуковану регуляцію експресією циклооксигенази 2 (COX2) у клітинах RAW 264,7, опосередковану за рахунок інгібувальної активації залежного від NF- κ B гена, що в результаті знижує рівень PGE2 [155].

Незважаючи на те, що флавоноїди не впливають на β 2-адренергічні рецептори [68], вони мають антиоксидантний, спазмолітичний та протизапальний ефекти [161]. Зокрема, гіперозид опосередковує інтерналізацію β 1-адренергічних рецепторів (β 1AR) у нестимульованих умовах, тоді як β 2AR залишається у плазматичній мембрані [84, 135]. Більше того, різні дослідження підтвердили протизапальну активність рутину [70, 89, 153]. Подібна активність може бути корисною для лікування бронхіту, оскільки вважається, що гострий бронхіт є в більшій мірі запальним, ніж інфекційним процесом [176].

У зв'язку з тим, що ефективність препаратів плюща залежить від усіх перелічених компонентів, необхідно застосувати методику, яка дозволить дослідити якомога більшу кількість компонентів. Для дослідження тритерпенових сапонінів, флавоноїдів та фенольних кислот можна

застосовувати ВЕРХ та ВЕТШХ методи. Оскільки ВЕРХ є більш точним та відтворюваним, а також більш чутливим, то для дослідження хімічного складу сировини та препаратів плюща звичайного рекомендують саме цей метод.

Для ВЕРХ методу можливе використання двох детекторів: мас-детектора та діодно-матричного. Оскільки останній є простішим у використанні, для аналізу листя плюща звичайного та препаратів на його основі пропонується застосувати саме його.

1.3.4 Підходи до вибору аналітичного методу

Результати аналізу фармацевтичного ринку України рослинних ЛЗ, що містять екстракт листя плюща звичайного (розділ 1, п. 1.2.3), показали, що цей сегмент представлений здебільшого препаратами зарубіжних компаній, тоді як вітчизняні займають приблизно 28,57 % ринку.

У зв'язку з цим науковцями Житомирської фармацевтичної фабрики було створено два нових препарати: капсули «Гедерин» та сироп «Гедерин+», що містять екстракт листя плюща звичайного.

Одним із головних етапів фармацевтичної розробки ЛЗ є вибір методів контролю якості, що пов'язано з різними факторами. Коректність методу перевіряється валідацією. Також виробники враховують різні економічні фактори собівартості проведення аналізу. Що стосується рослинних лікарських засобів, то, як правило, лише хроматографія дозволяє виявити та оцінити кількісно окремі маркери. Оскільки в усьому світі питання охорони здоров'я про доступність ліків для населення залишається досить актуальним, виникає необхідність в економічній оцінці методів контролю якості [76]. Застосування методів хроматографії є досить дорогим: вимагає спеціального обладнання, розчинників хроматографічного класу чистоти, стандартів та висококваліфікованого персоналу. Крім того, зазвичай необхідно аналізувати велику кількість серій лікарських препаратів.

Концепції зеленої хімії створюють межі для операцій та дій, щоб зробити хімічні процеси більш екологічними. Поняття «зеленої хімії» є

широко визнаним в хімічних лабораторіях. Такі дії вимагають застосування більш безпечних, доброякісних, менш токсичних розчинників [133], зниження споживання енергії [93] та використання реагентів і речовин на відновлюваних джерелах [80]. Інакше кажучи, основні цілі та завдання зеленої хімії полягають у зменшенні забруднення навколишнього середовища та ризиків для здоров'я людей за рахунок збільшення кількості «зелених» реагентів, зменшення кроків в аналітичній методології та зменшення використання ресурсів.

Вплив аналітичного методу на навколишнє середовище залежить від параметрів його аналітичних процедур, таких як кількість необхідних реагентів, їх безпечність, споживана енергія та кількість відходів [19]. Порівняння методів проведено за допомогою екошкали, де ідеальний метод з погляду зеленої хімії має значення 100. Якщо якийсь параметр методу відходить від принципів ідеального зеленого аналізу, призначаються штрафні бали. Сума штрафних балів, отриманих після перегляду, має використовуватися для розрахунку екошкали за такою формулою: аналітична екошкала = $100 - \text{штрафні бали}$

Результати дослідження можна класифікувати за наступними критеріями:

- >75 – відмінний метод аналізу з погляду зеленої хімії;
- >50 – прийнятний метод аналізу з погляду зеленої хімії;
- <50 – неприйнятний метод аналізу з погляду зеленої хімії.

Гармонізована система глобальної класифікації та маркування хімічних речовин забезпечує повну інформацію про визначення класу безпечності реагентів залежно від впливу на фізичний стан людини та екологію. Для простоти розрахунків пропонується розраховувати штрафні бали за кожен реагент шляхом множення кількості піктограм небезпеки на ступінь загрози (для відмітки «увага» множимо на 1, для відмітки «небезпека» – на 2) [167]. Штрафні бали за енергію призначаються відповідно до енергоємних лабораторних практик та інструментів [144]. Наприклад, до методів із найменшим споживанням енергії (менше 0,1 кВт на зразок) можна

віднести імуноферментний аналіз, титрування, спектрофотометрія, УВЕРХ, ВЕТШХ. Найбільш енерговитратними (більше 1.5 кВт на зразок) є ЯМР, ГХ-МС, РХ-МС, рентгенівська дифракція. Також штрафні бали призначаються за небезпеку на виробництві та утворення відходів.

Отже, різні методи аналізу запропоновано оцінювати за такими параметрами: аналітична точність, собівартість використання та вплив на навколишнє середовище.

.

Висновки до розділу 1

1. Плющ звичайний широко заготовлюється по всій Європі. Крім того, його екстракти входять до складу великої кількості препаратів, що виготовляються різними виробниками. Оскільки умови проростання рослини та технологічні процеси впливають на вміст БАР виникає необхідність у вивченні та порівнянні хімічного складу як рослинної сировини, так і ЛЗ. Особливо необхідним є проведення дослідження умови накопичення тритерпенових сапонінів, флавоноїдів та фенольних кислот у листі плюща, оскільки саме з цими речовинами пов'язується терапевтична дія плюща.

2. Ефективність препаратів рослинного походження залежить від якості сировини і визначається синергізмом дії різних груп БАР. Тому для забезпечення кращого відбору рослинної сировини при вхідному контролі необхідно впровадити додаткові речовини-маркери. В подальшому, вони можуть використовуватися для стандартизації препаратів.

3. Одним з головних етапів фармацевтичної розробки є вибір методу для проведення стандартизації та підтвердження якості препаратів. Проте наразі не має чітких параметрів, за якими можна проводити порівняння та визначати найбільш доцільний метод. Тому необхідно виявити критерії, за якими буде проводитися відбір методу для аналізу. До таких параметрів варто віднести аналітичну точність визначення основних речовин, собівартість застосування методу та його вплив на навколишнє середовище і працівників.

РОЗДІЛ 2

ХАРАКТЕРИСТИКА ОБ'ЄКТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА МЕТОДІВ АНАЛІЗУ

2.1 Об'єкти дослідження

Листя плюща звичайного

Для визначення речовин-маркерів та дослідження впливу умов навколишнього середовища на накопичення БАР у листі *Hedera helix* використовували сировину з різних країн Європи, зібрану навесні 2019 р. Усього у дослідженні було використано 21 зразок листків плюща з центральної та південної частин Європи (рис. 2.1) [94].



Рис. 2.1. Мапа місць збору листя плюща звичайного

Матеріали сировини були відібрані із щонайменше 5 окремих ювенальних (молодих) рослин, які не мали квітів. Зразки сушили на повітрі із захистом від прямих сонячних променів за температури навколишнього середовища, після чого сировину поміщали в підписані паперові мішечки, де вона зберігалася за кімнатної температури в темному місці до аналізу. Дані щодо температури (°C), опадів (мм), тривалості сонячного світла (г) та ґрунту були отримані з ґрунтового атласу Європи [160] та національних метеорологічних агентств (додаток А, таблиця А1).

Для вивчення загального вмісту флавоноїдів у перерахунку на рутин у сировині використовували *методику 1* (розд. 2, п. 2.4), отримані результати наведені в розд. 3, п. 3.1.1. За допомогою *методики 2* (розд. 2, п. 2.4) вивчали загальний вміст фенольних речовин у перерахунку на галову кислоту. Значення для кожного об'єкта наведено в розд. 3, п. 3.1.2. Значення загальної антирадикальної активності (розд. 3, п. 3.1.3) були отримані за допомогою *методики 3* (розд. 2, п. 2.4). Вимір концентрації гедеракозиду С проводився з використанням ВЕРХ (розд. 2, п. 2.4, *методика 4*) та УВЕРХ (розд. 2, п. 2.4, *методика 5*) методів, результати висвітлені в розд. 3, пункті 3.1.5. Результати ідентифікації α -гедерину та гедеракозиду С (розд. 3, п. 3.1.4, *методика 6*) отримані з використанням ВЕТШХ методу (розд. 2, п. 2.4). Хімічний склад листків плюща звичайного та їх антирадикальна активність були вивчені з використанням ВЕРХ (розд. 2, п. 2.4, *методика 7*), ГХ (розд. 2, п. 2.4, *методика 10*), ВЕРХ/ABTS (розд. 2, п. 2.4, *методика 8*), ВЕРХ із мас-детектором (розд. 2, п. 2.4, *методика 9*) методів, отримані значення наведені в розд. 3, п. 3.4.

Напівпродукти

Для дослідження напівпродуктів було використано дві різні серії сухого екстракту листя плюща (*Hederae folium extractum siccum*) (табл. 2.1). Для дослідження хімічного складу й антирадикальної активності компонентів застосували ВЕРХ (розд. 2, п. 2.4, *методика 7*), ВЕРХ/ABTS (розд. 2, п. 2.4,

методика 8), ВЕРХ з мас-детектором (р. 2, п. 2.4, методика 9). Всі значення описані в розд. 4, п. 4.1.

Препарати, що містять екстракт листя плюща звичайного

Аналіз було проведено на різних лікарських формах, а саме: сиропах (6 різних ЛЗ), капсулах «Гедерин» (5 серій), таблетках (один ЛЗ) та краплях (один ЛЗ) (табл. 2.1).

Для аналізу хімічного складу препаратів та їх антирадикальної активності застосували методи ВЕРХ (розд. 2, п. 2.4, методика 7), ВЕРХ/ABTS (розд. 2, п. 2.4, методика 8) та ВЕРХ з мас-детектором (розд. 2, п. 2.4, методика 9). Для дослідження синтетичних компонентів сиропу «Гедерин+» використали методики 10 та 11 (розд. 2, п. 2.4), результати відображені в розд. 4, п. 4.2.

2.2. Методи аналізу

2.2.1 Спектрофотометричне визначення

Дослідження проводили згідно з вимогами статті ДФУ 2.0 «Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій і видимій областях» (2.2.25) [6]. Дослідження були виконані на спектрофотометрі Dynamica, HALO DB-20 (Dynamica Scientific Ltd., United Kingdom) на базі лабораторії кафедри аналітичної та токсикологічної хімії Литовського університету наук про здоров'я (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas) за консультативної підтримки зав. кафедри аналітичної та токсикологічної хімії Людаса Іванаускаса.

Таблиця 2.1

Препарати та сухі екстракти листя плюща звичайного

Лікарська форма	Об'єкт	Торгова назва	Номер серії	Виробник (країна)	Заявлена кількість сухого екстракту листя плюща
Капсули	C1	Гедерин плющ, капсули	010918	Вішфа (Україна)	52,5 мг на капс.
	C2	Гедерин плющ, капсули	020918	Вішфа (Україна)	52,5 мг на капс.
	C3	Гедерин плющ, капсули	031018	Вішфа (Україна)	52,5 мг на капс.
	C4	Гедерин плющ, капсули	041018	Вішфа (Україна)	52,5 мг на капс.
	C5	Гедерин плющ, капсули	051018	Вішфа (Україна)	52,5 мг на капс.
Сироп	S1	Геделікс, сироп від кашлю	80307A	Krewel Meuselbach GmbH (Німеччина)	8 мг/мл
	S2	Гелітуспан, сироп	4010718	SOPHARMA AD (Болгарія)	7 мг/мл
	S3	Проспан, сироп від кашлю	18A016A	Engelhard Arzneimittel GmbH & Co.KG (Німеччина)	7 мг/мл
	S4	Гербіон, сироп плюща	Z80007	Krka (Словенія)	7 мг/мл
	S5	Гедерин плющ, сироп	20119	Вішфа (Україна)	4,5 мг/мл
	S6	Гедерин + плющ, сироп	201218	Вішфа (Україна)	4,5 мг/мл
Таблетки	EF	Проспан форте, таблетки шипучі від кашлю	19N063A	Engelhard Arzneimittel GmbH & Co.KG (Німеччина)	65 мг на таб.
Каплі	D	Геделікс, краплі без спирту	73105B	Krewel Meuselbach GmbH (Німеччина)	40 мг/мл
Екстракти	E1	Сухий екстракт листя плюща	14019838	Martin Bauer Group (Німеччина)	—
	E2	Сухий екстракт листя плюща	—	Martin Bauer Group (Німеччина)	—

2.2.2 ВЕРХ та УВЕРХ дослідження

Дослідження проводилися згідно з вимогами статті ДФУ 2.0 «Рідинна хроматографія» (2.2.29). Для проведення аналізу було використано прилад Shimadzu Nexera-X₂ (фірма «Шімадзу», Японія), який складався з таких частин:

1. Насоси з он-лайн дегазатором LC-30 AD;
2. Автосамплер – SIL 30AC;
3. Термостат – CTO 20AC;
4. Детектор діодно-матричний SPD M20A (DAD).

Також частина досліджень була проведена на хроматографі Prostar, фірми «Varian» на базі Державної науково-дослідної лабораторії з контролю якості лікарських засобів НФаУ (ДНДЛ з КЯЛЗ) за консультативної допомоги зав. лабораторією Губар Світлани Миколаївни.

2.2.3 Аналіз із використанням мас-спектрометрії

Дослідження проводили відповідно до вимог статті ДФУ 2.0 «Мас-спектрометрія» (2.2.43) [6] на базі фітофармацевтичної лабораторії кафедри фармакогнозії Литовського університету наук про здоров'я (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas) за консультативної підтримки Вальдаса Якштаса.

Використовували рідинний хроматограф Acquity H-class UPLC system (фірма «Вотерс», США), який був оснащений триквадрупольним мас-детектором (фірма «Ксево», США) з іонізацією методом електростатичного розпилення (ESI).

2.2.4 Дослідження *in-vitro* антиоксидантної активності методом ВЕРХ

Дослідження проводили відповідно до вимог статті ДФУ 2.0 «Рідинна хроматографія» (2.2.29) [6] на базі лабораторії кафедри аналітичної та токсикологічної хімії Литовського університету наук про здоров'я (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas) за консультативної підтримки зав. кафедри

Людаса Іванаускаса. Використовували хроматограф Waters 2695 (фірма «Вотерс», США) оснащений Waters 996 діодно-матричним детектором.

2.2.5 Газова хроматографія

Дослідження проводили відповідно до вимог статті ДФУ 2.0 «Газова хроматографія» (2.2.28) [6] на базі лабораторії кафедри аналітичної та токсикологічної хімії Литовського університету наук про здоров'я (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas) за консультативної підтримки зав. кафедри проф. Людаса Іванаускаса. Використовували хроматографічну систему SHIMADZU GC-MS-QP2010 (фірма «Шімадзу», Японія) оснащену мас-детектором.

2.3 Матеріали

Для досліджень використовували розчинники кваліфікації *ч.д.а.* або *для хроматографії*; Використані реактиви були приготовлені за вимогами, описаними у відповідних розділах ДФУ. Всі реактиви використовували свіжоприготовленими.

У дослідженнях були використані такі стандарти: галова кислота (с. PHL89198), неохлорогенова кислота (с. PHL80504), кислота хлорогенова (с. PNR2202), корична кислота (с. 03200595), кофейна кислота (с. 60018), рутин (с. PNO89270), гіперозид (с. 1335202), ізокверцитрин (с. 00140585), апігенін 7-глюкозид (с. Y0001777), апігенін (с. PNR89262), кверцетин (с. PNM89159), кемпферол (с. PHIL89235), 6,7-дигідроксиізофлавіон (с. PNH89221), гедеракозид С (с. 00930585), α -гедерин (с. 01240585), суміш амінокислот, що містила аланін, валін, лейцин, ізолейцин, пролін, серин (с. 79248), тролокс (с. 238813), сальбутамолу сульфат (с. S0150000), домішки сальбутамолу сульфату D (с. R1960), F (с. Y0000031), G (с. Y0000034) було придбано у фірми «Sigma-Aldrich GmbH» (Німеччина). *Ацетонітрил Р* та *метанол Р* хроматографічної чистоти було отримано у фірми «Honeywell GmbH» (Німеччина). *Сірчана кислота, ацетон Р, етил ацетат Р, безводна оцтова кислота Р, персульфат*

калію, 2,2-азинобіс (етил-2,3-дигідробензотіазол-6-сульфонова кислота) діамонієва сіль (ABTS), та N-трет-бутилдиметилсиліл-N-метилтрифторацетамід (MTBSTFA) були придбані у фірми «Sigma-Aldrich GmbH» (Німеччина). Стандарт калію сорбату був фармакопейний стандартний зразок ДФУ. Вода хроматографічної чистоти була отримана з системи очистки Mili-Q system (США).

Картридж для твердофазної екстракції Agilent Bond Elut із сорбентом C18 (500 мг, 6 мл) був придбаний у компанії «Agilent» (Німеччина).

2.4 Характеристика методів дослідження

Методика 1. Визначення флавоноїдів у перерахунку на рутин

Вимірювали оптичну густину (2.2.25) випробовуваного розчину та розчину порівняння у максимумі за довжини хвилі (410 ± 5) нм у кюветі з товщиною шару 10 мм відносно компенсаційних розчинів. Як розчин порівняння використовували стандарт рутину [6].

Методика 2. Визначення фенольних кислот у перерахунку на галову кислоту

Вимірювали оптичну густину (2.2.25) випробовуваного розчину та розчину порівняння у максимумі за довжини хвилі (750 ± 5) нм у кюветі із товщиною шару 10 мм відносно компенсаційних розчинів. Як розчин порівняння використовували стандарт галової кислоти.

Методика 3. Визначення антиоксидантної активності CUPRAC методом

Вимірювали оптичну густину (2.2.25) випробовуваного розчину та розчину порівняння у максимумі за довжини хвилі 450 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм відносно компенсаційних розчинів. Як розчин порівняння використовували стандарт тролоксу.

Розчин реагенту CUPRAC складався з розчинів купруму хлориду, неокупроїну та ацетатного буферу з рН 7,0 у співвідношенні 1 : 1 : 1 (об/об/об).

Розчин купруму хлориду. 0,17 г купруму хлориду дигідрату переносили в мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняли у 60 мл води Р, доводили до мітки тим же розчинником та ретельно перемішували.

Розчин неокупроїну. 0,1566 г неокупраїну переносили в мірну колбу ємністю 100,0 мл, розчиняли в 50 мл 70% розчину метанолу, після чого доводили водою Р до мітки та ретельно перемішували.

Ацетатний буфер із рН 7,0. 0,77 г ацетату амонію в розчинили 900 мл води Р та довели до 1000,0 мл тим же розчинником, після чого вимірювали його рН.

Після змішування усіх зазначених розчинів CURPAC зберігали в темряві за кімнатної температури протягом 1 години.

Методика 4. Кількісне визначення гедеракозиду С у листі плюща, сухому екстракті та лікарських формах із використанням ВЕРХ

Для розділення речовин було використано колонку ACE C18 (150 × 4,6 мм, з розміром частинок 5 мкм). Як рухому фазу застосовували воду Р – ацетонітрилу Р (71 : 29). Швидкість рухомої фази складала 0,5 мл/хв. Детектування речовин відбувалося за довжини хвилі 210 нм, температура термостата – 40 °С. 10 мкл випробовуваного розчину (або стандартного) вводили в хроматографічну систему.

Рухому фазу та всі зразки фільтрували крізь 0,22 мкм мембранний фільтр.

Методика 5. Кількісне визначення гедеракозиду С в листі плюща, екстракту та лікарських формах з застосування УВЕРХ

В аналізі було використано ACQUITY UPLC BEH C18 колонку 50 × 2,1 мм, з розміром частинок 1,7 мкм. Температура колонки була 40°C. Рухома фаза складалася з: води Р – ацетонітрилу Р (71 : 29). Швидкість фази становила

0,05 мл/хв. Оптичне поглинання речовин вимірювали за допомогою діодно-матричного детектора за довжини хвилі 210 нм. 1 мкл випробовуваного розчину (або стандартного розчину) було введено до хроматографічної системи.

Рухому фазу та всі зразки фільтрували з використанням 0,22 мкм мембранного фільтра.

Методика 6. Кількісне визначення гедеракозиду С в екстракті та лікарських формах плюща за ВЕТШХ методикою

ВЕТШХ дослідження ЛРС та ЛЗ проводили на ВЕТШХ пластині (10 × 10 см), яка була вкрита сорбентом *силікагель Р 60 F₂₅₄* на скляній основі (Sigma-Aldrich). Рухомою фазою була суміш *безводної мурашиної кислоти-ацетону Р-метанол Р-етилацетат Р* (4 : 20 : 20 : 30 об/об/об/об). Стандартні та випробовувані розчини були нанесені у вигляді смуг шириною 6 мм, об'єм нанесення становив 8 мкл. Дослідження проводили у скляній хроматографічній камері з розмірами 20 × 20 см. Хроматографічну камеру насичували протягом 30 хв, після чого рухомій фазі давали пройти відстань 80 мм від лінії старту.

Виявлення гедеракозиду С проводили після обприскування 20% сірчаною кислотою в розчині етанолу після нагрівання пластини за 105 ° С та огляду в денному світлі.

Усі розчини фільтрувалися з використанням 0,22 мкм мембранного фільтра.

Методика 7. Дослідження хімічного складу листя, сухого екстракту та препаратів плюща

Використовували колонку ACE C18 (250 × 4,6, з розміром часток 5 мкм). Рухома фаза складалася з двох розчинів: 0,1 % водного розчину оцтової кислоти (рухома фаза А) та *ацетонітрилу Р* (рухома фаза Б) [29, 31]. Хроматографування проводили за такої програми градієнта (табл. 2.2)

Таблиця 2.2

Гradientна програма для методики 7 «Дослідження хімічного складу листя, сухого екстракту та препаратів плюща»

Час (хв)	Рухома фаза А (%)	Рухома фаза Б (%)
0:00	95	5
0-8	95→85	5→15
8-30	85→80	15→20
30-48	80→60	20→40
48-58	60→50	40→50
58-65	50	50
65-66	50→5	50→95

Об'єм інжекцій випробовуваного розчину (розчину порівняння) складав 10 мкл, температура колонки – 25 °С. Детектування речовин відбувалося залежно від характеру спектра (табл. 3.18) [31, 65, 119].

Рухому фазу та всі зразки було профільровано з використанням 0,22 мкм мембранного фільтра.

Кількісне визначення речовин було розраховане за допомогою градувальних графіків.

Методика 8. Вивчення in-vitro антиоксидантної активності речовин

Після застосування методики 7 «Дослідження хімічного складу листя, сухого екстракту та препаратів плюща» рухому фазу переносили в реакційну петлю з реагентом ABTS, який подавався насосом Gilson 305. Реакційна петля була виготовлена з тефлону, мала довжину 3 м і внутрішній діаметр 0,25 мм. Параметри системи з розчином ABTS встановили таким чином: температура – 50 °С, швидкість потоку реагенту – 0,5 мл/хв (рис. 2.2 [112]). Приготування розчину ABTS здійснювали згідно з опублікованими працями [31, 112, 142].

Методика 9. Визначення речовин методом мас-спектрометрії

Методологія використовувалася відповідно до раніше опублікованої праці [182]. Розділення компонентів проводили на колонці ACQUITY UPLC ВЕН С18 (50 × 2,1 мм, з розміром частинок 1,7 мкм). Для аналізу використали 0,1 % водний розчин мурашиної кислоти (рухома фаза А) та ацетонітрилу Р (рухома фаза Б). Температура колонки становила 40 °С, об'єм інжекції – 1 мкл, швидкість подачі рухомої фази – 0,5 мл/хв.

Параметри детектора були такими: температура джерела іонізації – 150 °С; температура десольватації – 400 °С; швидкість потоку газу десольватації – 1000 (л/год); напруга на капілярі – 3,21 (kV); конус – 71 V; енергія зіткнень – 20 V; вимірювання мас-іонів у діапазоні від 10 до 2048 Да; моніторинг виділених фрагментів у режимі MS. Градієнтне елюювання проводили в наступному режимі (табл. 2.3).

Таблиця 2.3

Градієнтна програма для методики 9 «Визначення речовин методом мас-спектрометрії»

Час (хв)	Рухома фаза А (%)	Рухома фаза Б (%)
0:00	95	5
0→3	5→70	5→30
3→7	70→50	30→50
7→8	50→5	50→95
8→15	5	95

Методика 10. Визначення амінокислот методом газової хроматографії з мас-детектором

Метод застосовувався відповідно до раніше опублікованих праць [31]. Реагент для дериватизації – MTBSTFA (N-трет-бутилдиметилсиліл-N-метилтрифторацетамід). Для аналізу була використана капілярна колонка Rxi-5ms (30 м × 0,25 мм, товщина шару сорбенту – 0.25 мкм). Температуру

термостата – 75 °C витримували впродовж 5 хв, піднімали за градієнтом 10 °C/хв до 290 °C, потім знову піднімали 20 °C/хв до 320 °C та витримували протягом 5 хв. Інжекція була зроблена в режимі спліт (1 : 20) за температури 260°C, об'єм інжекції –1 мкл. Швидкість потоку –1,5 мл /хв, тиск – 100 кПа, загальний потік –34,4 мл/хв.

Параметри детектора: мас-спектри були отримані в режимі electron impact mode (70 eV), діапазон сканування – (m/z) 35-500 аму із часом сканування 0,2 с, температура поверхні – 280 °C.

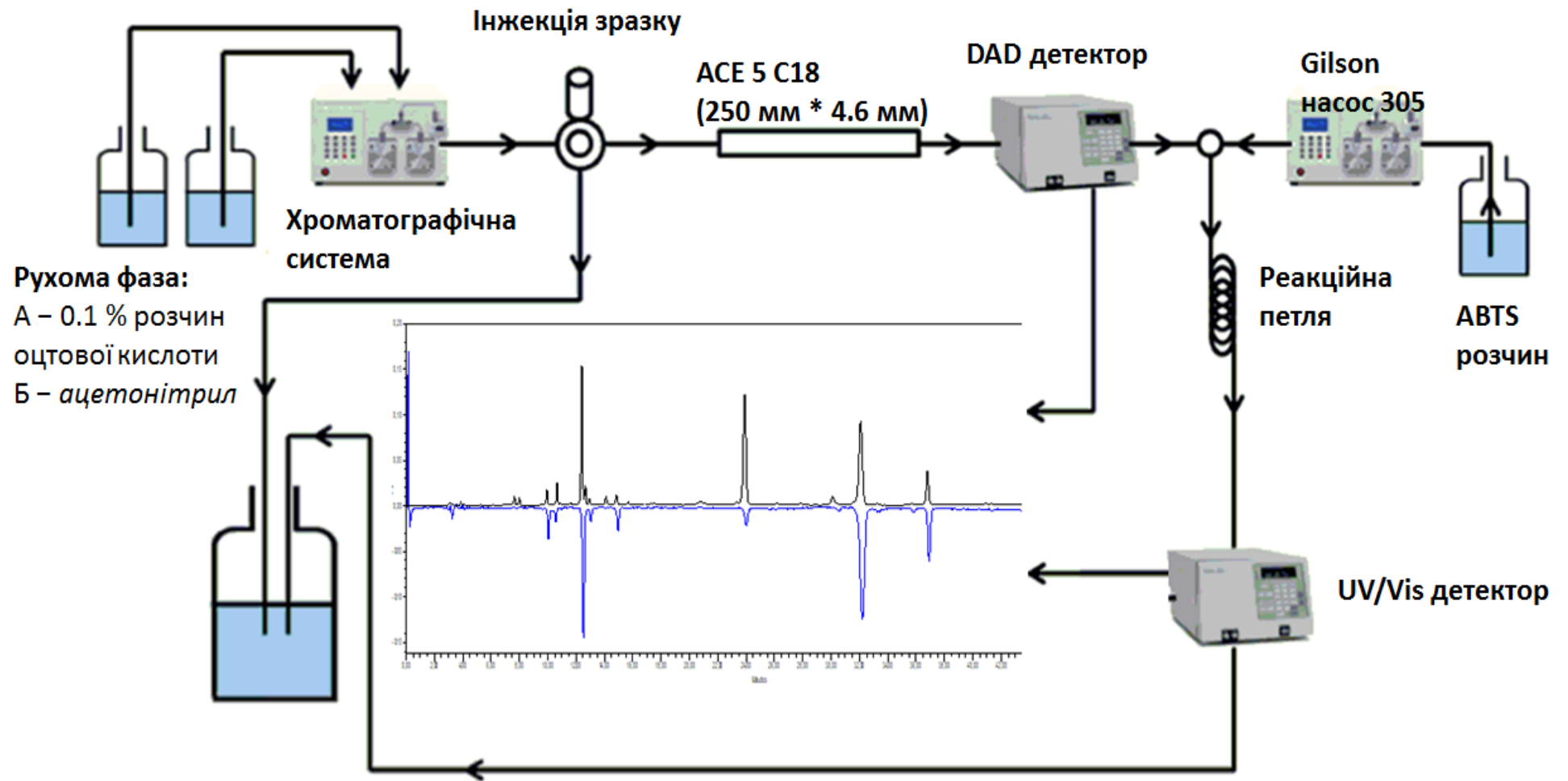


Рис. 2.2. Схема *in vitro* антиоксидантного дослідження компонентів рослинної сировини та лікарських засобів *H. helix*

Методика 11. Кількісне визначення сальбутамолу сульфату та калію сорбату в сиропі «Гедерин+» методом ВЕРХ

Для дослідження використовували колонку Supelcosil C8 (150 × 4,6 мм, з розміром частинок 3 мкм). Як рухома фаза А використовували суміш ацетонітрил Р – метанол Р – фосфатний буферний розчин у співвідношенні 20 : 80 : 900 (об/об/об).

Фосфатний буферний розчин готували таким чином: 3,45 г натрію дигідрофосфату Р поміщали у мірну колбу місткістю 1000,0 мл, розчиняли у 900 мл 0,05 % водного розчину триетиламіну Р, доводили рН розчину до $3,0 \pm 0,05$ фосфорною кислотою розведеною Р, доводили об'єм 0,05 % водним розчином триетиламіну до позначки і перемішували.

Швидкість рухомої фази складала 1,0 мл/хв, температура колонки – 40 °С. Детектування відбувалося за довжини хвилі 277 нм, об'єм інжекції 10 мкл. Програма градієнта наведена у табл. 2.4

Таблиця 2.4

Градієнтна програма для методики 11 «Кількісне визначення сальбутамолу сульфату та калію сорбату методом ВЕРХ»

Час (хв)	Рухома фаза А (%)	Рухома фаза Б (%)
0:00	87	13
4:00	87	13
4→7	87→80	13→20
10:00	80	20
10→11	80→87	20→13

Усі розчини фільтрували крізь 0,45 мкм мембранний фільтр.

Методика 12. Визначення домішок сальбутамолу сульфату в сиропі «Гедерин+» методом ВЕРХ

Аналіз проводили на колонці ACE C18 (150 × 4.6 мм, із розміром часток 5 мкм) із використанням 0,05 % розчину триетиламіну доведеного оцтовою

кислотою до рН 5,5 (рухома фаза А) та метанолу *P* – ацетонітрилу *P* у співвідношенні 1 : 1 (об/об) (рухома фаза Б). Швидкість становила 1,0 мл/хв, детектування – 277 нм, інжекція – 10 мкл, температура колонки – 35 °С, градієнтна програма, як зазначено у табл. 2.5.

Таблиця 2.5

Градієнтна програма для методики 12 «Визначення домішок сальбутамолу сульфату в сиропі «Гедерин+» методом ВЕРХ»

Час (хв)	Рухома фаза А (%)	Рухома фаза Б (%)
0:00	95	5
5:00	95	5
5→30	95→10	5→90
30→32	10→95	90→5

Усі розчини були профільтровані крізь мембранний фільтр 0,45 мкм.

2.5 Статистична обробка результатів

Статистичні розрахунки отриманих результатів були виконані відповідно до монографії ДФУ 5.3.N.1 «Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту^N». Вміст усіх речовин показано як середнє $\pm$ стандартне відхилення трьох вимірів. Статистичний аналіз проводили з використанням ANOVA Тьюкі пост хок аналізу. Ієрархічний кластерний аналіз проводили за допомогою методу міжгрупових співвідношень із квадратом відстаней Евкліда [82]. Коефіцієнт визначення R^2 отримували для придатності кожної регресійної моделі. Лінійну залежність між змінними вимірювали за допомогою коефіцієнта кореляції Пірсона. Дані були обчислені у Microsoft Excel 2010 та SPSS 25 (США).

РОЗДІЛ 3

ВИВЧЕННЯ ХІМІЧНОГО СКЛАДУ ТА АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ ЛИСТЯ ПЛЮЩА ЗВИЧАЙНОГО. ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ КЛІМАТИЧНИХ УМОВ НА НАКОПИЧЕННЯ ДІЮЧИХ РЕЧОВИН

Для забезпечення якості кінцевого продукту велике значення має вихідна сировина. Зазвичай листя плюща та продукти (напівпродукти на його основі) стандартизують за вмістом гедеракозиду С. Однак зрозуміло, що фармакологічний ефект препаратів обумовлений наявністю багатьох активних компонентів, що виявляють синергічну дію. Тому для вхідного контролю сировини її стандартизація, на нашу думку, має включати визначення кількох речовин-маркерів. Крім того, клімат та навколишнє середовище впливатимуть на накопичення компонентів у рослині. Оскільки *H. helix* широко культивується в різних країнах Європи, виникає необхідність у визначенні ефекту навколишнього середовища на акумуляцію речовин. Це дозволить визначити умови для вирощування стандартизованої сировини *H. helix* із високим вмістом речовин-маркерів.

3.1 Спектрофотометричне дослідження зразків листя плюща звичайного

Відповідно до ЄФ та ДФУ для підтвердження якості сировини *H. helix* необхідно проводити кількісне визначення гедеракозиду С [6, 57]. Гедеракозид С належить до групи тритерпенових сапонінів, які відповідають за фармакологічне застосування листя плюща як протикашльового засобу [62, 161].

Крім тритерпенових сапонінів, за даними літератури, листя плюща має високий вміст флавоноїдів та фенольних кислот [2], завдяки яким виявляє антиоксидантну активність [145]. Оскільки окисний стрес є одним з основних факторів патогенезу, спричиненого хронічною обструктивною хворобою легень (ХОЗЛ), він призводить до накопичення активних форм кисню, що, зі

свого боку, може пошкоджувати тканини організму. Протикашльові препарати, що виявляють антиоксидантні властивості, можуть мати певні переваги у лікуванні захворювань дихальних шляхів. Тому при виборі додаткових маркерів стандартизації ЛРС листя плюща доцільним є визначення антиоксидантного потенціалу окремих БАР та їх груп.

3.1.1 Кількісне визначення суми флавоноїдів у перерахунку на рутин

Кількісне визначення суми флавоноїдів проводили спектрофотометричним методом відповідно до раніше зазначеної *методики І «Визначення флавоноїдів у перерахунку на рутин»* (розд. 2, п. 2.4). Реакцію з алюмінію хлоридом використовують для визначення загальної кількості флавоноїдів у рослинній сировині. Реакція заснована на утворенні флавоноїдно-алюмінієвого комплексу в кислому середовищі. Вміст флавоноїдів визначається та виражається у перерахунку на рутин [74, 131].

Приготування розчинів.

Витяг листя плюща. Приготовано відповідно до методики, зазначеної в ДФУ 2.0. 1,00 г подрібненої на порошок сировини (355) поміщають у круглодонну колбу місткістю 250 мл, додають 50 мл 80 % *розчину* метанолу та нагрівають зі зворотним холодильником на водяній бані за температури 80°C протягом 1 год. Охолоджують і фільтрують крізь ватний тампон у мірну колбу місткістю 100 мл. Ватний тампон разом із рослинним залишком знову екстрагують 30 мл суміші зі зворотним холодильником протягом 30 хв, після чого фільтрують. Отримані два фільтрати об'єднують та доводять 80 % *розчину* метанолу до об'єму 100,0 мл та фільтрують крізь мембранний фільтр [5].

Розчин порівняння. 20 мг стандарту *рутину* поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняють у 70 мл 80 % метанолу та доводять об'єм розчину тим же розчинником до позначки, ретельно перемішують. 2,5 мл отриманого розчину переносять у мірну колбу місткістю 50,0 мл, додають 2,5 мл 33% водного розчину льодяної кислоти, 10 мл 5 % водного розчину гексаметилентетраміну, 7,5 мл 10 % водного розчину *алюмінію (III) хлориду* та

25 мл води *P*. Отриманий розчин добре перемішують і залишають на 30 хвилин за температури 70 °С на водяній бані. Доводять до 50,0 мл водою *P*, ретельно перемішують та проводять вимірювання оптичної густини. Виміри повторювали три рази відносно компенсаційного розчину.

Випробовуваний розчин. 2,5 мл розчину листя плюща переносять у мірну колбу місткістю 50,0 мл, додають 2,5 мл 33% водного розчину льодяної кислоти, 10 мл 5 % водного розчину гексаметилентетраміну, 7,5 мл 10 % водного розчину алюмінію (III) хлориду та 25 мл води *P*. Отриманий розчин добре перемішують і залишають на 30 хвилин за температури 70 °С на водяній бані. Доводять до 50,0 мл водою *P*, ретельно перемішують та вимірюють оптичну густину. Виміри повторювали три рази відносно компенсаційного розчину.

Компенсаційний розчин. 2,5 мл 80 % метанолу переносять у мірну колбу місткістю 50,0 мл, додають 2,5 мл 33% водного розчину льодяної кислоти, 10 мл 5 % водного розчину гексаметилентетраміну, 7,5 мл 10 % водного розчину алюмінію (III) хлориду та 25 мл води *P*. Отриманий розчин добре перемішують і залишають на 30 хвилин при температурі 70 °С на водяній бані. Доводять до 50,0 мл водою *P* та ретельно перемішують.

Вміст похідних флавоноїдів (X_1), у перерахунку на рутин та на висушену сировину, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$X_1 = \frac{A_i \cdot m_{st} \cdot 100 \cdot 50 \cdot 2.5 \cdot P \cdot 100}{A_{st} \cdot m_i \cdot 2.5 \cdot 100 \cdot 50 \cdot (100 - W)} = \frac{A_i \cdot m_{st} \cdot P \cdot 100}{A_{st} \cdot m_i \cdot (100 - W)}, \text{ де}$$

A_i – поглинання випробовуваного розчину у максимумі за довжини хвилі (410 ± 5) нм;

A_{st} – поглинання розчину порівняння у максимумі за довжини хвилі (410 ± 5) нм;

m_i – маса наважки випробовуваної сировини, у грамах;

m_{st} – маса наважки стандарту рутину, у грамах;

P – вміст основної речовини у стандарті рутину, у відсотках;

W – втрата в масі при висушуванні, у відсотках.

Результати визначення вмісту флавоноїдів, фенольних кислот та антиоксидантної активності наведені в табл. 3.1. Кількість флавоноїдів у рослинній сировині була у межах від 0,031 мг/г до 0,281 мг/г. Зразок із Науйої-Акмяне мав найбільше значення. Крім того, всі зразки з Литви виявили найбільший вміст порівняно з іншими місцями збору: від $(0,173 \pm 0,008)$ мг/г (Плунге) до $(0,281 \pm 0,005)$ мг/г (Науйої-Акмяне). Ці показники значно перевищували показники вмісту флавоноїдів у зразках південних країн. Так, в Італії їхня кількість була в межах $(0,031 \pm 0,001)$ (Сіракузи) мг/г до $(0,054 \pm 0,002)$ мг/г (Палермо), в Греції вміст коливався від $(0,11 \pm 0,004)$ мг/г (Дельфи) до $(0,15 \pm 0,006)$ мг/г (Метеора). Вміст флавоноїдів в інших місцях збору показав певну різноманітність. Зразки, зібрані в Україні, показали відносно високі результати вмісту флавоноїдів; $(0,21 \pm 0,008)$ мг/г (Київ) та $(0,205 \pm 0,009)$ мг/г (Харків); подібний вміст був знайдений у листі зі Словаччини (Братислава) $(0,214 \pm 0,007)$ мг/г, трохи вищі результати були у зразках з Австрії (Відень) $(0,254 \pm 0,007)$ мг/г. В інших місцях збору концентрація флавоноїдів була дещо нижчою. Так, в Угорщині (Будапешт) – $(0,148 \pm 0,009)$ мг/г, у Чехії – $(0,162 \pm 0,006)$ мг/г (Прага) та $(0,191 \pm 0,007)$ мг/г (Брно), Польщі – $(0,189 \pm 0,006)$ мг/г (Краків) та $(0,164 \pm 0,008)$ мг/г (Варшава).

Таблиця 3.1

Результати дослідження вмісту флавоноїдів, фенольних речовин та антиоксидантної активності листя плюща звичайного

Місце збору	Вміст фенольних кислот мг/г, середнє $\pm$ SD	Вміст флавоноїдів, мг/г, середнє $\pm$ SD	Антиоксидантна активність, мг/г, середнє $\pm$ SD
1	2	3	4
Науйої-Акмяне	$2,103 \pm 0,021$	$0,281 \pm 0,05$	$0,688 \pm 0,014$
Клайпеда	$2,08 \pm 0,041$	$0,243 \pm 0,007$	$0,652 \pm 0,023$
Плунге	$2,092 \pm 0,024$	$0,173 \pm 0,008$	$0,671 \pm 0,025$
Шилуте	$1,923 \pm 0,063$	$0,258 \pm 0,005$	$0,678 \pm 0,014$
Пумпенай	$1,738 \pm 0,084$	$0,189 \pm 0,004$	$0,679 \pm 0,024$
Каунас	$1,323 \pm 0,052$	$0,28 \pm 0,007$	$0,664 \pm 0,023$
Київ	$1,19 \pm 0,039$	$0,21 \pm 0,008$	$0,369 \pm 0,004$
Харків	$1,272 \pm 0,019$	$0,205 \pm 0,009$	$0,387 \pm 0,011$

Продовж.табл.3.1

1	2	3	4
Будапешт	$0,657 \pm 0,023$	$0,148 \pm 0,009$	$0,119 \pm 0,004$
Прага	$0,676 \pm 0,013$	$0,162 \pm 0,006$	$0,123 \pm 0,011$
Брно	$0,603 \pm 0,013$	$0,191 \pm 0,007$	$0,126 \pm 0,004$
Відень	$1,142 \pm 0,011$	$0,254 \pm 0,007$	$0,086 \pm 0,001$
Братислава	$1,186 \pm 0,015$	$0,214 \pm 0,007$	$0,281 \pm 0,001$
Краків	$0,663 \pm 0,004$	$0,189 \pm 0,006$	$0,130 \pm 0,003$
Варшава	$0,341 \pm 0,036$	$0,164 \pm 0,008$	$0,098 \pm 0,006$
Афіни	$1,41 \pm 0,057$	$0,14 \pm 0,006$	$0,223 \pm 0,005$
Дельфи	$1,31 \pm 0,055$	$0,11 \pm 0,004$	$0,187 \pm 0,002$
Метеора	$2,02 \pm 0,094$	$0,15 \pm 0,006$	$0,393 \pm 0,007$
Катанія	$0,112 \pm 0,002$	$0,043 \pm 0,001$	$0,051 \pm 0,003$
Палермо	$0,193 \pm 0,008$	$0,054 \pm 0,002$	$0,064 \pm 0,004$
Сіракузи	$0,033 \pm 0,001$	$0,031 \pm 0,001$	$0,027 \pm 0,001$

3.1.2 Кількісне визначення суми фенольних кислот у перерахунку на галову кислоту

Було проведено дослідження для визначення фенольних кислот у всіх зразках, зібраних із різних країн Європи. Кількісне визначення фенольних кислот було виконано за наведеною методикою 2 «Визначення фенольних кислот у перерахунку на галову кислоту» (розд. 2, п. 2.4).

Реагент Folin–Ciocalteu змінює колір від жовтого до синього внаслідок хімічної взаємодії з фенольними речовинами в лужному середовищі. Поглинання вимірюється за довжини хвилі 750 нм, загальна кількість фенольних кислот обчислюється і виражається в еквіваленті галової кислоти [40].

Приготування розчинів.

Розчин порівняння. 20 мг стандарту кислоти галової поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняють у 70 мл 80 % метанолу та доводять об'єм розчину тим же розчинником до позначки, ретельно перемішують. 1,0 мл отриманого розчину переносять у мірну колбу місткістю 25,0 мл, додають 1,0 мл *реагенту Folin–Ciocalteu*, 9,0 мл дистильованої води, суміш перемішують, через 5 хв додають 9,0 мл 7% водного розчину натрію карбонату та доводять

до мітки водою *P*. Отриману суміш добре перемішують та залишають на 30 хв за кімнатної температури в темному місці. Після чого вимірюють оптичну густину розчинів. Вимірювання повторюють три рази відносно компенсаційного розчину.

Витяг листя плюща готують за методикою, описаною в розділі «3.1.1. Кількісне визначення суми флавоноїдів» (розд. 3., п. 3.1.1). 1,0 мл *розчину листя плюща* переносять у мірну колбу місткістю 25,0 мл, додають 1,0 мл *реагенту Folin–Ciocalteu*, 9,0 мл дистильованої води, суміш перемішують, через 5 хв додають 9,0 мл 7% водного розчину натрію карбонату та доводять до мітки водою *P*. Отриману суміш добре перемішують та залишають на 30 хв за кімнатною температури в темному місці. Після чого вимірюють оптичну густину розчинів. Вимірювання повторюють три рази відносно компенсаційного розчину.

Компенсаційний розчин. 1,0 мл 80 % метанолу переносять у мірну колбу місткістю 25,0 мл, додають 1,0 мл *реагенту Folin–Ciocalteu*, 9,0 мл дистильованої води, суміш перемішують, через 5 хв додають 9,0 мл 7% водного розчину натрію карбонату та доводять до мітки водою *P*. Отриману суміш добре перемішують та витримують протягом 30 хв за кімнатної температури в темному місці.

Вміст похідних фенольних речовин (X_2), у перерахунку на галову кислоту та на висушену сировину, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$X_2 = \frac{A_i \cdot m_{st} \cdot 100 \cdot 25 \cdot 1 \cdot P \cdot 100}{A_{st} \cdot m_i \cdot 1 \cdot 100 \cdot 25 \cdot (100 - W)} = \frac{A_i \cdot m_{st} \cdot P \cdot 100}{A_{st} \cdot m_i \cdot (100 - W)}, \text{ де}$$

A_i – поглинання випробовуваного розчину у максимумі за довжини хвилі (750 ± 5) нм;

A_{st} – поглинання розчину порівняння у максимумі за довжини хвилі (750 ± 5) нм;

m_i – маса наважки випробовуваної сировини, у грамах;

m_{st} – маса наважки *стандарту галової кислоти*, у грамах;

P – вміст основної речовини у *стандарті галової кислоти*, у відсотках;

W – втрата в масі при висушуванні, у відсотках.

Результати кількісного вмісту, наведені в табл. 3.1, показали наявність фенольних речовин у зразках плюща в межах від 0,03 до 2.104 мг/г. Ці результати корелювали зі значеннями, отриманими у дослідженні флавоноїдів, оскільки північні країни мали вищу концентрацію речовин порівняно з південними. Найбільший вміст було знайдено у листі зібраному в Науйої-Акмяне. Трохи менші, але подібні результати було знайдено в усіх зразках Литви, від $(1,738 \pm 0,084)$ мг/г (Пумпенай) до $(2,103 \pm 0,021)$ мг/г (Науйої-Акмяне). Найнижчі результати було детектовано в Італії від $(0,033 \pm 0,001)$ мг/г (Сіракузи) до $(0,193 \pm 0,008)$ мг/г (Палермо). Проте за вмістом фенольних речовин зразки, які збиралися у Греції, мали значну вищу концентрацію – від $(1,31 \pm 0,055)$ мг/г (Дельфи) до $(2,02 \pm 0,094)$ мг/г (Метеора). Інші зразки мали досить високий вміст фенольних кислот.

3.1.3 Визначення антиоксидантної активності

Для визначення антиоксидантної активності сировини плюща було використано *методику 3 «Визначення антиоксидантної активності CUPRAC методом»* (розд.іл 2, п. 2.4).

Метод заснований на відновленні двовалентної міді та неокупроїну (2-9-диметил-1,10-фенантролін), у результаті чого забарвлений комплекс (Cu (II)–Nc) змінюється до хромогенного (Cu (I)–Nc), який не має забарвлення. Зниження валентності відбувається в нейтральному середовищі. Антиоксидантну активність обчислюють і виражають як еквівалент тролоксу [87, 128, 141].

Приготування розчинів.

Розчин порівняння. 50 мг тролоксу (стандарту) поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 80 мл 80 % розчину метанолу, розчиняють стандарт та доводять до мітки тим самим розчинником.

Витяг листя плюща було приготовано за методикою, описаною в розділі «3.1.1 Кількісне визначення суми флавоноїдів» (розд. 3, п 3.1.1).

Випробовуваний розчин (розчин порівняння). 3,0 мл розчину реагенту CUPRAC переносять у кювету та додають 10 мкл розчину листя плюща (або розчин порівняння), кювету залишають у темному місці на 30 хв, після чого проводять вимірювання.

Контрольний розчин. Використовували розчин реагенту CUPRAC змішаного з розчинником розчину листя плюща (розчину порівняння) у таких самих співвідношеннях.

Використовують 10 % розчин метанолу як компенсаційний.

Активність досліджуваних зразків/стандарту (%) обчислюють за формулою:

$$(\%) = \frac{Abs_{control} - Abs_i}{Abs_{control}} \cdot 100, \text{ де}$$

$Abs_{control}$ – оптична густина контрольного розчину;

Abs_i – оптична густина випробовуваного розчину (розчину порівняння).

Дані антиоксидантної активності наведені в табл. 3.1. Найбільшу активність виявили зразки, зібрані у Науйої-Акмяне (0,688 мг/г). Цей ефект співвідносився із вмістом фенольних речовин та флавоноїдів, які зазвичай мають високу антиоксидантну активність [145]. Найнижча активність була в зразку із Сіракуз.

3.2 Ідентифікація α -гедерину та гедеракозиду С методом ВЕТШХ у зразках листя плюща

Для ідентифікації α -гедерину та гедеракозиду С запропоновано використання ТШХ методики, яка наведена в ДФУ [6] та ЄФ [57].

Останнім часом спостерігається поширення використання методу ВЕТШХ, який вважається одним із найкорисніших методів, придатних для визначення профілю маркерів лікарських рослин [146]. До того ж ВЕТШХ має низку переваг над ТШХ, а саме: більшу роздільну здатність на одиницю відстані пластини, швидший час аналізу та зменшення кількості використовуваних розчинників.

Для ідентифікації α -гедерину та гедерокозиду С було використано ВЕТШХ метод за методикою 6 (розд. 2, п. 2.4).

Приготування розчинів.

Розчин порівняння для ВЕТШХ. 5,0 мг гедеракозиду С та 5,0 мг α -гедерину перенесуть у мірну колбу місткістю 5,0 мл та розчиняють у метанолі Р

Випробовуваний розчин для ВЕТШХ. 0,5 г подрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) екстрагують 5 мл метанолу Р на водяній бані зі зворотним холодильником за температури 60 °С протягом 30 хв, охолоджують та фільтрують.

Під час ідентифікації методом ВЕТШХ було встановлено, що у досліджуваних зразках сировини плюща звичайного виявляються відповідні хроматографічні зони, що регламентуються ДФУ та ЄФ [6, 57] (рис. 3.1).

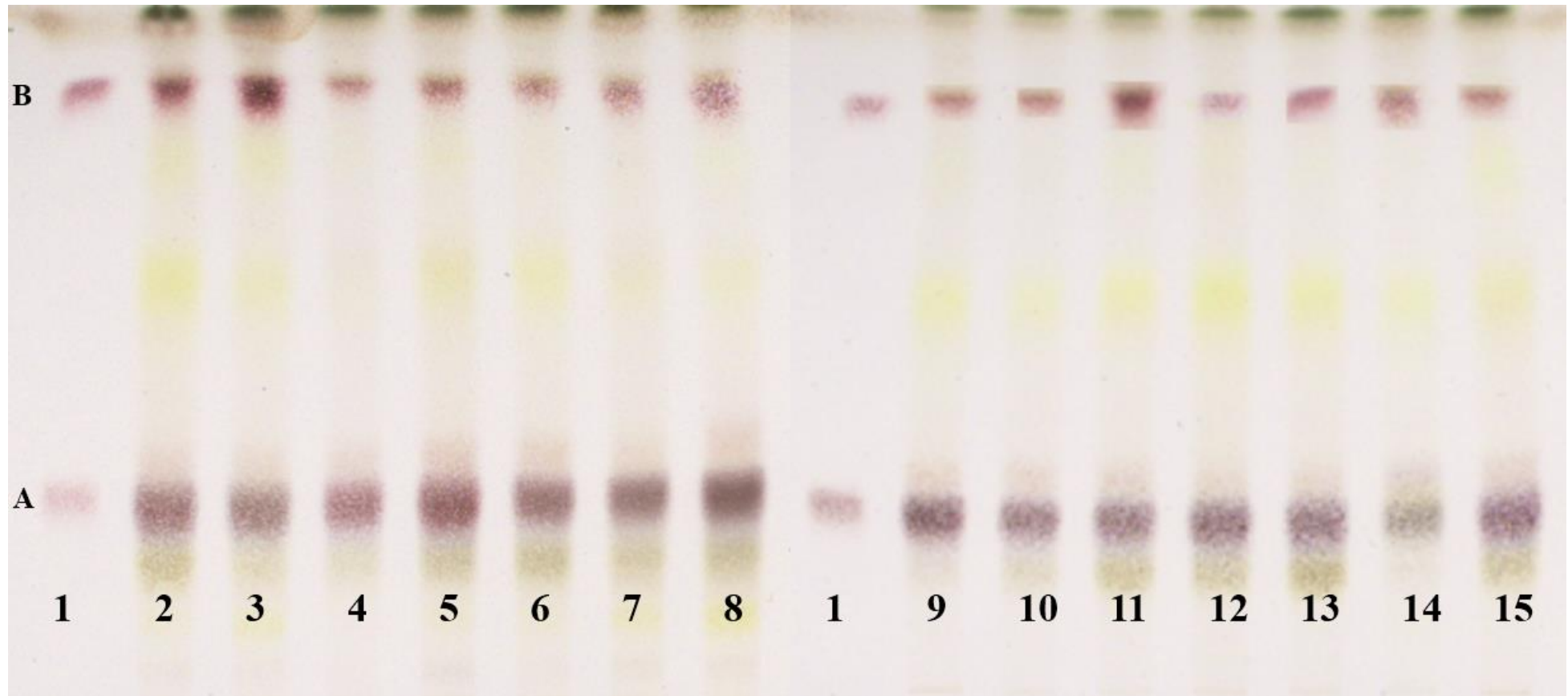


Рис. 3.1. Типові хроматограми, отримані під час ідентифікації α -гедерину та гедеракозиду С в листі плюща: А – зона гедеракозиду С; В – зона α -гедерину; 1 – розчин стандартів; 2 – Науйої-Акмяне; 3 – Клайпеда; 4 – Плунге; 5 – Шилюте; 6 – Пумпенай; 7 – Київ; 8 – Харків; 9 – Будапешт; 10 – Прага; 11 – Відень; 12 – Варшава; 13 – Брно; 14 – Братислава; 15 – Краків

3.3 Кількісне визначення гедеракозиду С ВЕРХ та УВЕРХ методами в зразках листа плюща звичайного

Для підтвердження якості сировини також необхідно проводити кількісне визначення гедеракозиду С.

Було розроблено специфічний і точний ізократичний ВЕРХ метод для зменшення часу аналізу порівняно з методом, наведеним у ДФУ. Склад рухомої фази оптимізували шляхом випробування різних співвідношень сумішей *води Р* та *ацетонітрилу Р*. Час утримування основної речовини складав понад 20 хвилин при концентрації ацетонітрилу менше 29 %, при збільшенні концентрації понад 30 %, розділення між гедеракозидом С та деякими іншими компонентами було не прийнятним. Різні комбінації води з декількома різними кислотами, включаючи оцтову та трифтороцтову, були протестовані для підвищення роздільної здатності та покращання пікової форми основної речовини. Проте жодна з досліджуваних кислот не показала поліпшення для методики. Найкращі параметри для аналізу гедеракозиду С методом ВЕРХ відображені в *методиці 4* (розд. 2, п. 2.4).

Для зменшення часу аналізу та витрат на його проведення параметри методу ВЕРХ були перенесені на УВЕРХ. Серед усіх параметрів були змінені швидкість рухомої фази та інжекція. Для досягнення найкращих результатів необхідно дотримуватися умов, які зазначені в *методиці 5* (розд. 2, п. 2.4).

Приготування розчинів

Розчин порівняння для ВЕРХ та УВЕРХ методів. 6 мг гедеракозиду С поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняють у 80 мл *метанолу Р*, доводять об'єм розчину *водою Р* до позначки та перемішують.

Як *випробовувані розчини для ВЕРХ та УВЕРХ методів* використовувалися витяг *листа плюща*, які були приготовані за методикою, описаною вище в розділі «3.1.1. Кількісне визначення суми флавоноїдів» (розд. 3, п. 3.1.1).

Вміст гедеракозиду в листі плюща (X_3), у перерахунку на висушену сировину, у відсотках, для методів ВЕРХ та УВЕРХ обчислюють за формулою:

$$X_3 = \frac{S_i \cdot m_{st} \cdot 100 \cdot P \cdot 100}{S_{st} \cdot m_i \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{S_i \cdot m_{st} \cdot P \cdot 100}{S_{st} \cdot m_i \cdot (100 - W)}, \text{ де}$$

S_i – середнє значення площ піків гедеракозиду С, розраховане з хроматограм випробовуваного розчину для листя плюща;

S_{st} – середнє значення площ піків гедеракозиду С, розраховане з хроматограм розчину порівняння;

m_i – маса наважки випробовуваної сировини, у грамах;

m_{st} – маса наважки *стандарту гедеракозиду С*, у грамах;

P – вміст основної речовини у *стандарті гедеракозиду С*, у відсотках;

W – втрата в масі при висушуванні, у відсотках.

Ці методики дозволяють зменшити час аналізу, зберігаючи при цьому чутливість і точність аналізу. Аналіз цими методами було проведено для усіх зібраних зразків. Час утримування гедеракозиду С для методу ВЕРХ складав 15,9 хвилин (рис 3.2) та у випадку УВЕРХ був 7,9 хвилин (рис 3.3).

Вміст гедеракозиду С для кожного з методів наведено в табл. 3.2. Найвищий вміст був у зразку, зібраному з Науйої-Акмяне: 110,053 та 109,446 мкг/г для ВЕРХ та УВЕРХ відповідно. Найменша кількість була знайдена в зразку із Сіракуз.

Таблиця 3.2

Вміст гедеракозиду С у листі плюща, виміряний різними методами, та статистична різниця між ними

№	Місце збору	Кількість гедеракозиду С, мкг/г, середнє $\pm$ SD		Різниця між ВЕРХ/УВЕРХ
		ВЕРХ	УВЕРХ	
1	2	3	4	5
1	Науйої-Акмяне	98,272 $\pm$ 1,947	100,081 $\pm$ 4,053	2,83
2	Клайпеда	69,233 $\pm$ 1,645	68,143 $\pm$ 1,409	2,46
3	Плунге	53,610 $\pm$ 2,051	53,837 $\pm$ 1,515	2,28

Продовж. таб. 3.2

1	2	3	4	5
4	Шилюте	48,687 ± 1,443	49,628 ± 1,841	2,68
5	Пумпенай	77,206 ± 3,687	76,579 ± 2,857	2,63
6	Каунас	110,053 ± 5,056	109,446 ± 4,272	2,68
7	Київ	23,751 ± 0,673	23,832 ± 0,694	2,00
8	Харків	44,710 ± 1,358	44,379 ± 1,578	2,80
9	Будапешт	55,336 ± 2,377	55,647 ± 1,372	2,63
10	Прага	36,223 ± 1,117	36,303 ± 1,513	2,53
11	Брно	46,315 ± 1,516	46,156 ± 1,076	2,77
12	Відень	79,459 ± 2,756	79,034 ± 1,951	2,65
13	Братислава	26,679 ± 0,582	27,254 ± 1,276	2,68
14	Краків	43,027 ± 1,253	43,465 ± 1,739	2,37
15	Варшава	35,224 ± 0,676	35,392 ± 1,575	2,66
16	Афіни	31,344 ± 1,279	31,839 ± 2,548	2,59
17	Дельфи	33,075 ± 1,363	33,785 ± 1,279	2,62
18	Метеора	14,127 ± 0,487	13,074 ± 0,486	2,60
19	Катанія	20,212 ± 1,050	20,152 ± 0,451	2,63
20	Палермо	13,533 ± 0,572	14,063 ± 1,254	2,67
21	Сіракузи	12,452 ± 0,269	13,540 ± 1,070	2,72

Також результати, отримані за допомогою цих методів були порівняні за t-критерієм Стьюдента (табл. 3.2) [96].

Отримані дані свідчать, що не всі зразки відповідають установленим вимогам ДФУ та ЄФ. Кількість гедеракозиду С у листках, зібраних у Сіракузах, Метеорах, Палермо, Катанії, Києві та Братиславі, була нижчою за встановлені межі (30 мг/г).

Різницю між двома методиками обчислювали за формулою [96]:

$$t = \frac{|\bar{d}|}{\sqrt{\sum d_i^2 - 1/n}}, \text{ де}$$

d_i – різниця між двома парами вимірювань для того самого зразка (i)

Таблиця розподілу дає значення $t(95\%; 2) = 4,30$. Обчислений t коефіцієнт кожного зразка був меншим за це значення, отже, відмінності не суттєві.

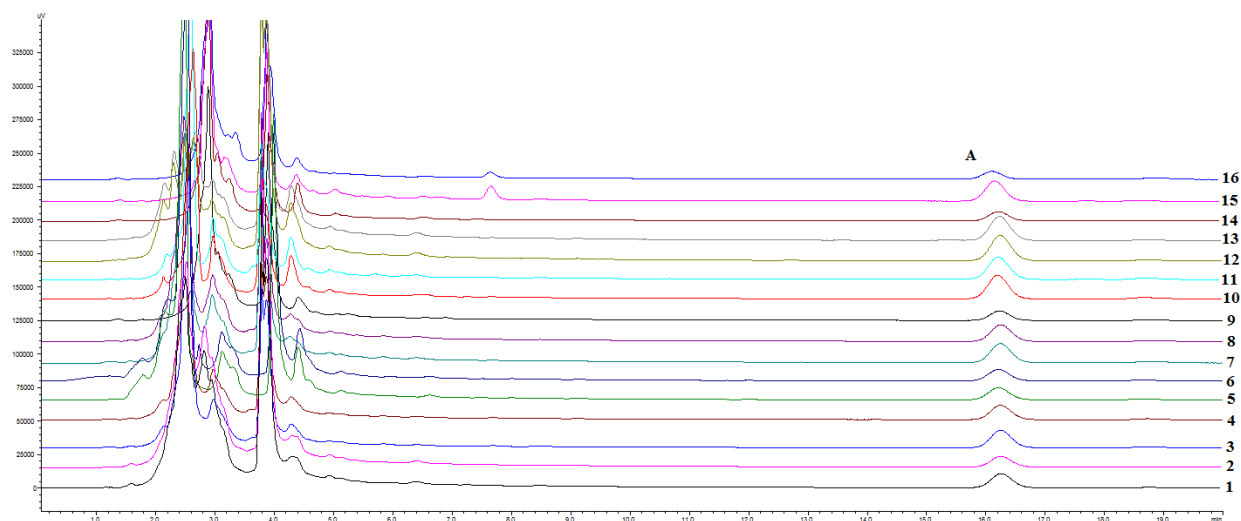


Рис. 3.2. Типові хроматограми листя плюща звичайного, проаналізованого методом ВЕРХ: (А – гедеракозид С; 1 – Шилюте; 2 – Братислава; 3 – Відень; 4 – Пумпенай; 5 – Будапешт; 6 – Прага; 7 – Харків; 8 – Плунге; 9 – Брно; 10 – Науйої-Акмяне; 11 – Клайпеда; 12 – Краків; 13 – Варшава; 14 – Київ; 15 – Каунас; 16 – Афіни)

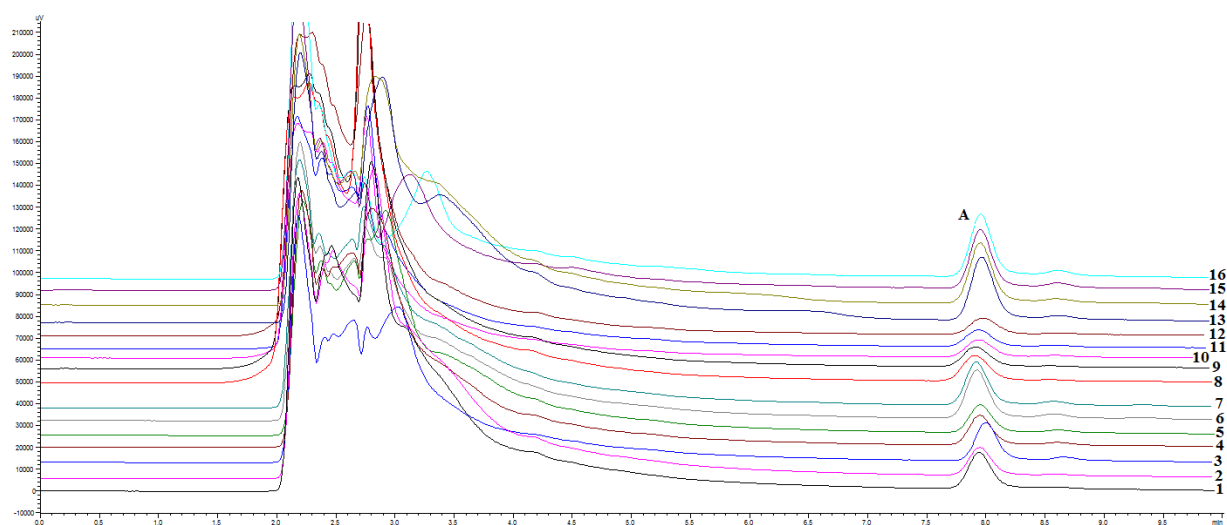


Рис. 3.3. Типові хроматограми листя плюща звичайного, проаналізованого методом УВЕРХ: (А – гедеракозид С; 1 – Шилюте; 2 – Брно; 3 – Відень; 4 – Пумпенай; 5 – Будапешт; 6 – Прага; 7 – Харків; 8 – Варшава; 9 – Київ; 10 – Братислава; 11 – Афіни; 12 – Краків; 13 – Плунге; 14 – Науйої-Акмяне; 15 – Клайпеда; 16 – Каунас)

Із метою підтвердження коректності розроблених методик для аналізу листя плюща була проведена їх валідація. Розраховані валідаційні

характеристики оцінювали порівняно з критеріями прийнятності аналітичної методики [6].

Вивчення лінійної залежності площини піка від концентрації проводили на 5 модельних розчинах у межах концентрацій від 50 до 250 % від номінальної концентрації з кроком 50 % [6]. Результати досліджень наведені в табл. 3.3 та 3.4 і на рис. 3.4 – 3.7. Вимірювання кожного розчину проводили тричі. Для розрахунків було використано середні значення площі піка основної речовини для кожного з розчинів.

Графік лінійності було побудовано в «нормалізованих» координатах, що дозволяє сформулювати єдині критерії, які пов'язані тільки з допусками вмісту, але не залежать від специфіки конкретних речовин.

Нормалізовані координати X_i та Y_i для побудови графіка визначали за формулою:

$$X_i = \frac{C_i}{C_{st}} \cdot 100\%, Y_i = \frac{S_i}{S_{st}} \cdot 100\%,$$

де C_i – концентрація аналізованої речовини в i -тому аналізованому розчині;

C_{st} – концентрація цієї самої речовини в розчині порівняння;

S_i – площа піка аналізованої речовини для i -ого аналізованого розчину;

S_{st} – площа піка цієї самої речовини для розчину порівняння.

Лінійність характеризується графіком лінійної залежності:

$$Y_i = b \cdot X_i + a,$$

де a – вільний член лінійної залежності для розрахованої регресійної прямої;

b – кутовий коефіцієнт для розрахованої регресійної прямої.

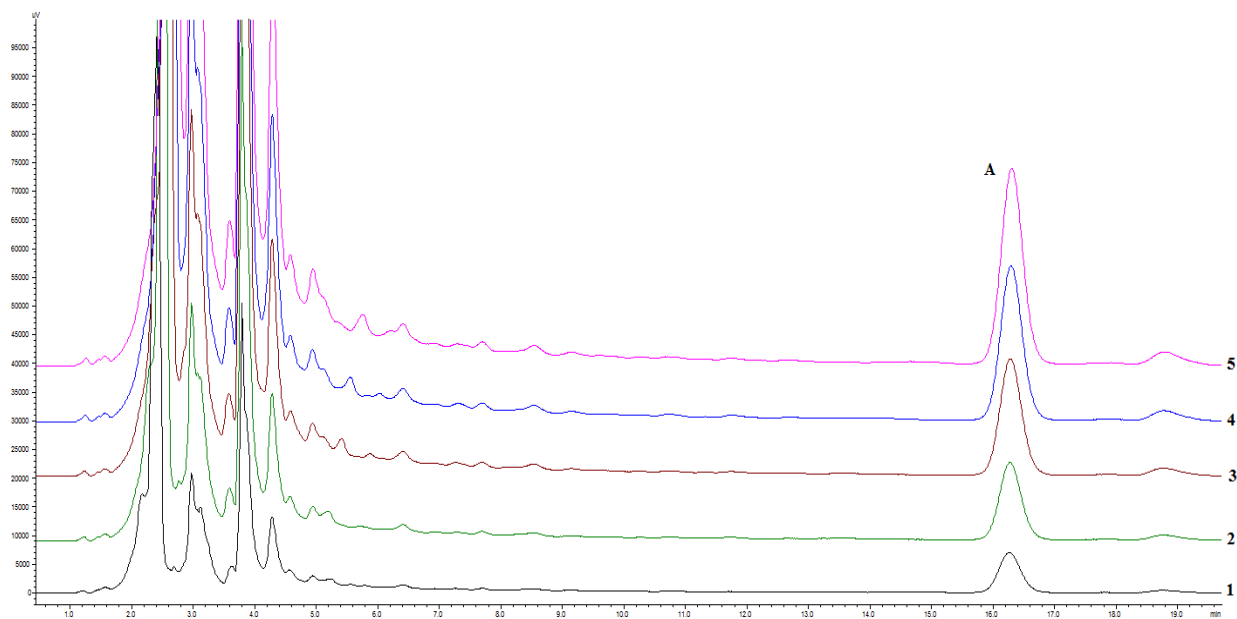


Рис. 3.4. Хроматограми розчинів для вивчення лінійності методики ВЕРХ для кількісного визначення гедеракозиду С: А – гедеракозид С; 1 – 50%; 2 – 100%; 3 – 150%; 4 – 200%; 5 – 250%

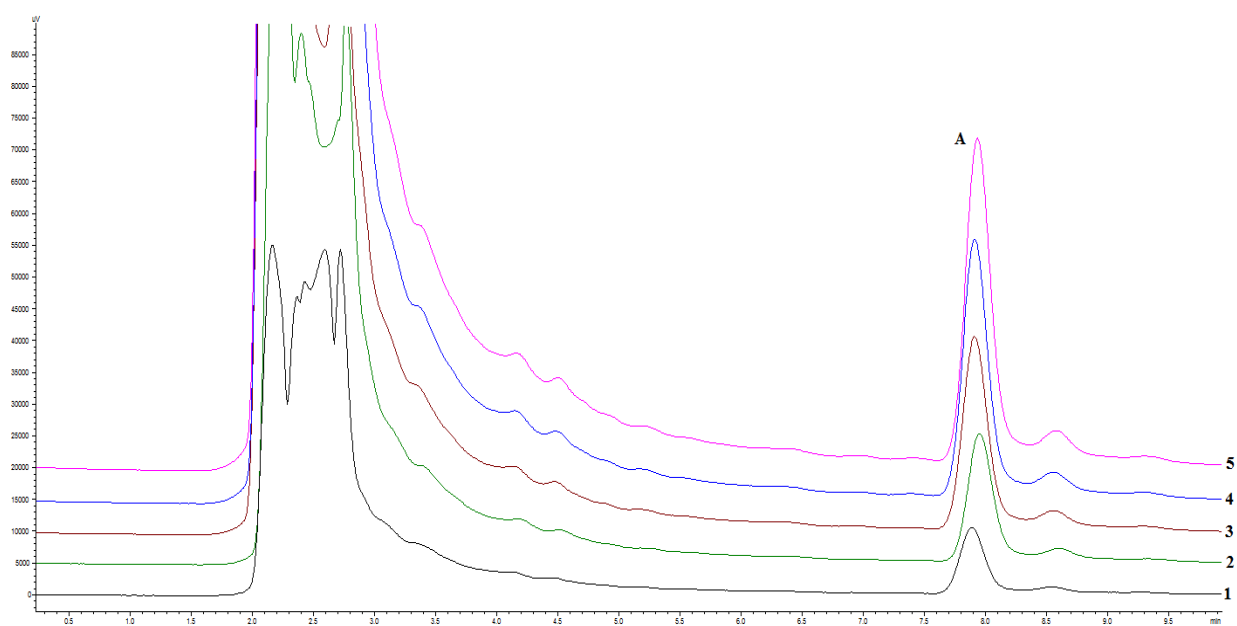


Рис. 3.5. Хроматограми розчинів для вивчення лінійності методики УВЕРХ для кількісного визначення гедеракозиду С: А – гедеракозид С; 1 – 50%; 2 – 100%; 3 – 150%; 4 – 200%; 5 – 250%

На рис. 3.6 зображено графік лінійної залежності площі піка основної речовини від концентрації розчину для ВЕРХ методу.

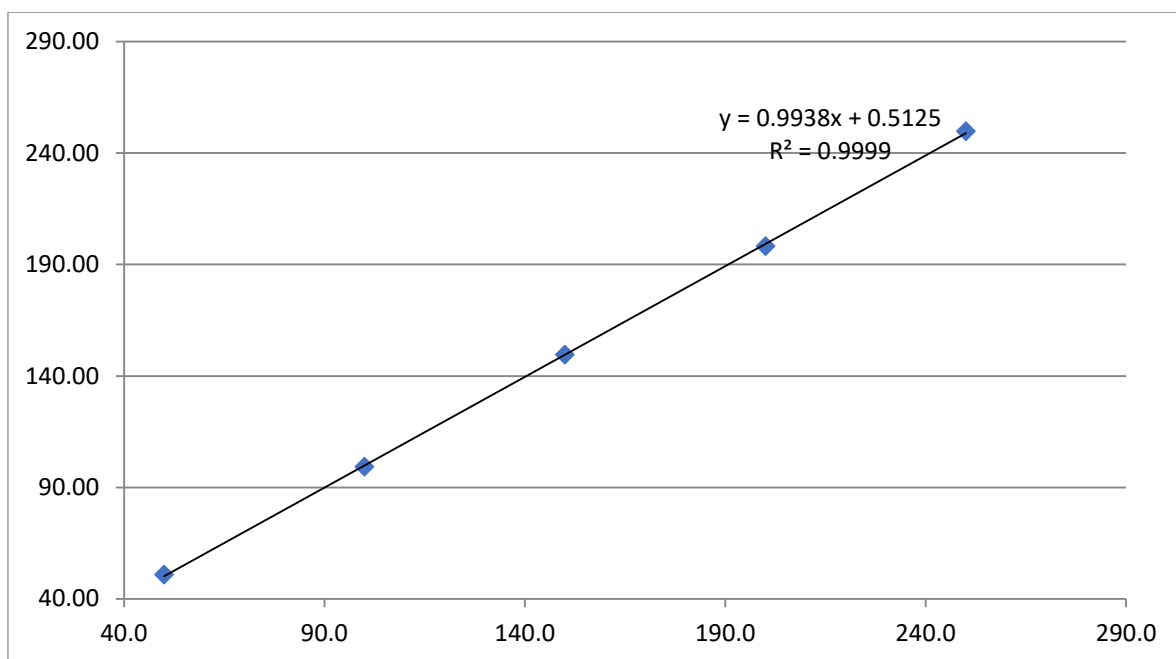


Рис. 3.6. Графік лінійної залежності площі піка основної речовини від концентрації досліджуваної речовини для методу ВЕРХ

Дані результатів перевірки лінійності ВЕРХ методики наведені у табл. 3.3.

Таблиця 3.3

Результати перевірки лінійності ВЕРХ методики кількісного визначення гедеракозиду С

п/п	Параметр	Вимоги	Отримане значення	Виконання критерію
1	a	$\leq 4,1$	0,5125	Виконується
2	r^2	$\geq 0,9978$	0,9999	Виконується
3	S_0	$\leq 2,7$	0,9652	Виконується

На рис. 3.7 зображений графік лінійної залежності площі піка основної речовини від концентрації розчину для УВЕРХ методу.

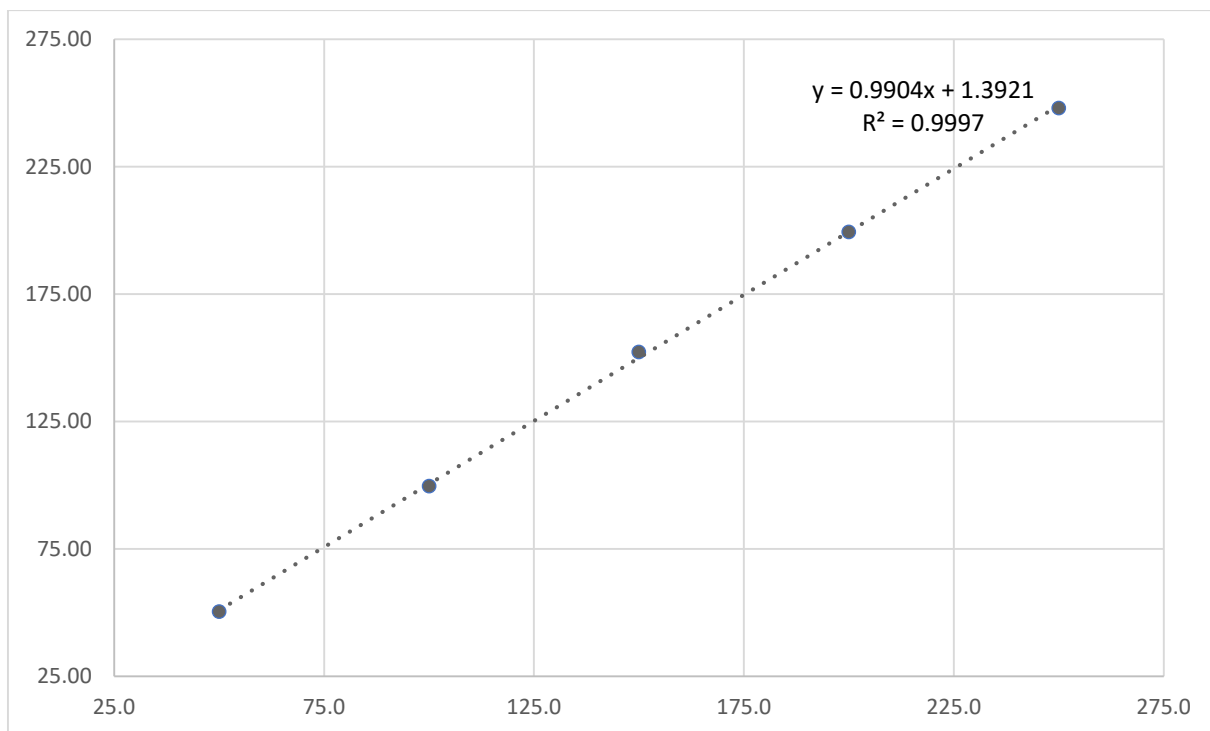


Рис. 3.7. Графік лінійної залежності площі піка основної речовини від концентрації досліджуваної речовини для методу УВЕРХ

Дані результатів перевірки лінійності УВЕРХ методики наведені у таблиці 3.4.

Таблиця 3.4

Результати перевірки лінійності УВЕРХ методики кількісного визначення для гедеракозиду С

п/п	Параметр	Вимоги	Отримане значення	Виконання критерію
1	a	$\leq 4,1$	1,3921	Виконується
2	r^2	$\geq 0,9978$	0,9999	Виконується
3	S_0	$\leq 2,7$	1,3207	Виконується

Для оцінки правильності і прецизійності використовували співвідношення «знайдено/введено»:

$$Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \cdot 100\%.$$

Методика не має містити значної систематичної похибки. Це означає, що величина має незначно відрізнятись від нуля [67]. Отримані дані для обох методів та розраховані статистичні характеристики наведено у табл. 3.5 і 3.6 для ВЕРХ та УВЕРХ відповідно.

Таблиця 3.5

Результати аналізу модельних сумішей гедеракозиду С методом ВЕРХ

Введено у % до концентрації розчину порівняння $(C_i/C_{st}) \cdot 100\%$	Знайдено у % до концентрації розчину порівняння $(A_i/A_{st}) \cdot 100\%$	Знайдено у % до введеного $(A_i/A_{st}) \cdot 100/(C_i/C_{st})$
50	50,88	101,76
100	99,29	99,29
150	149,60	99,74
200	198,27	99,14
250	249,83	99,93
Середнє значення, Z , %		99,97
Відносне стандартне відхилення, S_z , %		1,05
Відносний довірчий інтервал, Δ_z , % = $t(95\%, 4) \cdot S_z$		2,24
Критичне значення для збіжності результатів, Δ_{AS} , %		6,4
Систематична похибка, δ , %		0,03
Критерій статистичної невизначеності систематичної похибки, δ , %		1,0
Критерій практичної невизначеності систематичної похибки, δ , %		2,048
Загальний висновок про методику		Коректна

Таблиця 3.6

Результати аналізу модельних сумішей гедеракозиду С методом УВЕРХ

Введено у % до концентрації розчину порівняння $(C_i/C_{st}) \cdot 100\%$	Знайдено у % до концентрації розчину порівняння $(A_i/A_{st}) \cdot 100\%$	Знайдено у % до введеного $(A_i/A_{st}) \cdot 100/(C_i/C_{st})$
50	50,35	100,70
100	99,63	99,63
150	152,33	101,55
200	199,42	99,71
250	250,00	100,00
Середнє значення, Z , %		100,32
Відносне стандартне відхилення, S_z , %		0,81
Відносний довірчий інтервал, Δ_z , % = $t(95\%, 4) \cdot S_z$		1,72
Критичне значення для збіжності результатів, Δ_{AS} , %		6,4
Систематична похибка, δ , %		0,32
Критерій статистичної невизначеності систематичної похибки, δ , %		0,77
Критерій практичної невизначеності систематичної похибки, δ , %		2,048
Загальний висновок про методику		Коректна

Визначення стабільності (робасності) розчинів проводилось шляхом аналізу свіжоприготованих розчинів та після 24 годин. Відмінність між отриманими значеннями для методів ВЕРХ та УВЕРХ становила 0,39 та 0,14 % відповідно. Оскільки показники відповідають установленим критеріям, методики можуть використовуватись для проведення кількісного визначення.

3.4. Дослідження антиоксидантної активності визначених БАР

Щоб установити маркери, що відповідають за таку активність, були проведені статистичні розрахунки кореляції між антиоксидантною активністю листа плюща та кількісним вмістом визначених компонентів. Дослідження були проведені за допомогою кореляції Спірмена. Кореляція може набувати будь-якого значення в межах від -1 до +1 [82], де знак коефіцієнта кореляції вказує напрямок взаємозв'язку, тоді як величина кореляції (наскільки вона близька до -1 або +1) вказує на силу взаємозв'язку. Так, результати (r_s) можна інтерпретувати таким чином:

- 1 – абсолютний негативний взаємозв'язок;
- 0 – кореляція відсутня;
- +1 – абсолютний позитивний взаємозв'язок.

Результати дослідження показали помірну позитивну та статистично достовірну кореляцію між вмістом флавоноїдів, фенольних кислот та антирадикальними властивостями ($r_s = 0,87$; $p = 0,001$) та ($r_s = 0,69$; $p = 0,029$), відповідно (табл. 3.7). Крім того, було виявлено позитивне, хоча і слабе, співвідношення між кількістю гедеракозиду С та антиоксидантним ефектом.

Таблиця 3.7

Кореляційні дослідження між антиоксидантною активністю та вмістом компонентів знайдених у листі плюща звичайного

	Гедеракозид С	Флавоноїди	Фенольні кислоти
Антиоксиданті властивості	$r_s = 0,54;$ $p = 0,108$	$r_s = 0,87;$ $p = 0,001$	$r_s = 0,69;$ $p = 0,029$

Отримані дані свідчать, що збільшення вмісту флавоноїдів та фенольних речовин приводить до посилення антиоксидантного ефекту в листі плюща, тоді як кількість гедеракозиду С не чинить суттєвого впливу.

Такі результати були для нас очікуваними, оскільки саме ці речовини (флавоноїди та фенольні кислоти) є основними антиоксидантами [99]. Тому використання цих компонентів як маркерів буде слугувати показником для прояву антиоксидантної активності сировини листя плюща.

3.5 Визначення впливу умов навколишнього середовища на БАР листя плюща

Вміст БАР визначає якість та ефективність рослинних препаратів [127]. Умови навколишнього середовища, в яких росте рослина, суттєво впливають на акумуляцію речовин [119].

У літературі зустрічаються відомості, що на вміст БАР суттєво впливають такі фактори: клімат та метеорологічні умови [26, 136], абіотичні фактори [104] та географічне положення [103].

Тому серед усіх параметрів для дослідження впливу умов навколишнього середовища були обрані такі фактори: тривалість сонячного світла (в годинах на рік), ґрунт, тип клімату, показники кількості опадів (мм) та географічні (висота над рівнем моря) (додаток А, табл. А1).

Кореляційний аналіз впливу факторів навколишнього середовища

Результати кореляційного аналізу щодо впливу навколишнього середовища на накопичення БАР показали певну різноманітність між значеннями. Деякі параметри, а саме кількість опадів та висота над рівнем моря, не впливали на кількісний вміст речовин (табл. 3.8). Склад компонентів варіювався у зразках (Рис. 3.8 – 3.10), де кожне число з 3D-діаграми відповідає порядковому номеру місця збору в табл. 3.2.

Різниця вмісту гедеракозиду С у зразках обумовлена тим, що тритерпенові сапоніни відіграють важливу роль у захисному механізмі та взаємодії з навколишнім середовищем [66, 164]. Так, зразки з північних країн мали більшу кількість сапонінів: від 49,630 мг/г (Шилюте) до 109,458 мг/г (Каунас) порівняно з південними регіонами, де кількість сапонінів була в межах від 13,540 мг/г (Сіракузи) до 33,785 мг/г (Дельфи).

Кількість гедеракозиду С мала помірний негативний і статистично достовірний кореляційний зв'язок [82] із тривалістю сонячних годин ($r_s = -0,573$; $p = 0,007$), типом ґрунту ($r_s = -0,682$; $p = 0,001$) і типом клімату ($r_s = -0,789$; $p = 0,000$). Так, найвищий вміст гедеракозиду С був виявлений у місцях із лувізолем як ґрунтом, кількістю сонячних годин - 1600-1800 годин на рік і типом клімату – Dfb (вологий континентальний клімат з теплим літом). Серед усіх регіонів найбільш сприятливими для накопичення цієї БАР у сировині були Литва та Польща.

Вміст флавоноїдів залежав від тих самих факторів: тривалості сонячного світла ($r_s = -0,705$; $p = 0,000$), ґрунт ($r_s = -0,520$; $p = 0,016$) та клімату ($r_s = -0,670$; $p = 0,001$). Ці результати узгоджуються з раніше проведеними дослідженнями [31, 119, 134]. Найнижчі концентрації флавоноїдів виявлені також у південних країнах. У зразках з Італії було знайдено 0,031 мкг/г (Сіракузи), 0,054 мкг/г (Палермо) та 0,043 мкг/г (Катанія) флавоноїдів. З іншого боку, зразки з Греції мали більший вміст флавоноїдів: 0,15 мг/г (Метеора), 0,11 мг/г (Дельфи) та 0,14 мг/г (Афіни). Така різниця може пояснюватися відмінністю типу ґрунтів, оскільки всі інші значущі параметри

(тривалість сонячного світла та клімат) були майже однаковими. Так, зразки рослин, які росли на лувізолі та альбелувізолі показали найвищі концентрації флавоноїдів. Крім того, для кращого накопичення цих компонентів тривалість сонячного світла має становити 1600-1800 годин на рік, а тип клімату має бути Dfb.

Серед досліджуваних факторів навколишнього середовища лише ґрунт вплинув на накопичення фенольних кислот ($r_s = -0,63$; $p = 0,002$). Області з лувізолом містили найбільшу кількість фенольних кислот – від 0,341 мг/г (Варшава) до 2,103 мг/г (Каунас).

Результати кореляційних досліджень щодо впливу факторів навколишнього середовища на накопичення БАР представлені в табл. 3.8.

Таблиця 3.8

Результати вивчення кореляції Спірмена між вмістом речовин та факторами навколишнього середовища

Фактор навколишнього середовища	Гедеракозид С	Флавоноїди	Фенольні кислоти
Тривалість сонячного часу	$r_s = -0,573$; $p = 0,007$	$r_s = -0,705$; $p = 0,000$	$r_s = -0,226$; $p = 0,326$
Ґрунт	$r_s = -0,682$; $p = 0,001$	$r_s = -0,520$; $p = 0,016$	$r_s = -0,63$; $p = 0,002$
Тип клімату	$r_s = -0,789$; $p = 0,000$	$r_s = -0,670$; $p = 0,001$	$r_s = -0,349$; $p = 0,121$
Опади	$r_s = 0,394$; $p = 0,077$	$r_s = 0,191$; $p = 0,408$	$r_s = 0,270$; $p = 0,237$
Висота над рівнем моря	$r_s = -0,214$; $p = 0,351$	$r_s = -0,227$; $p = 0,323$	$r_s = -0,16$; $p = 0,489$

Вміст компонентів у листі *H. helix* значно залежав від умов навколишнього середовища. Був виявлений вплив деяких абіотичних факторів на накопичення компонентів. Тому подібна оцінка впливу навколишнього середовища може дати цінну інформацію для отримання стандартизованої рослинної сировини високої якості.

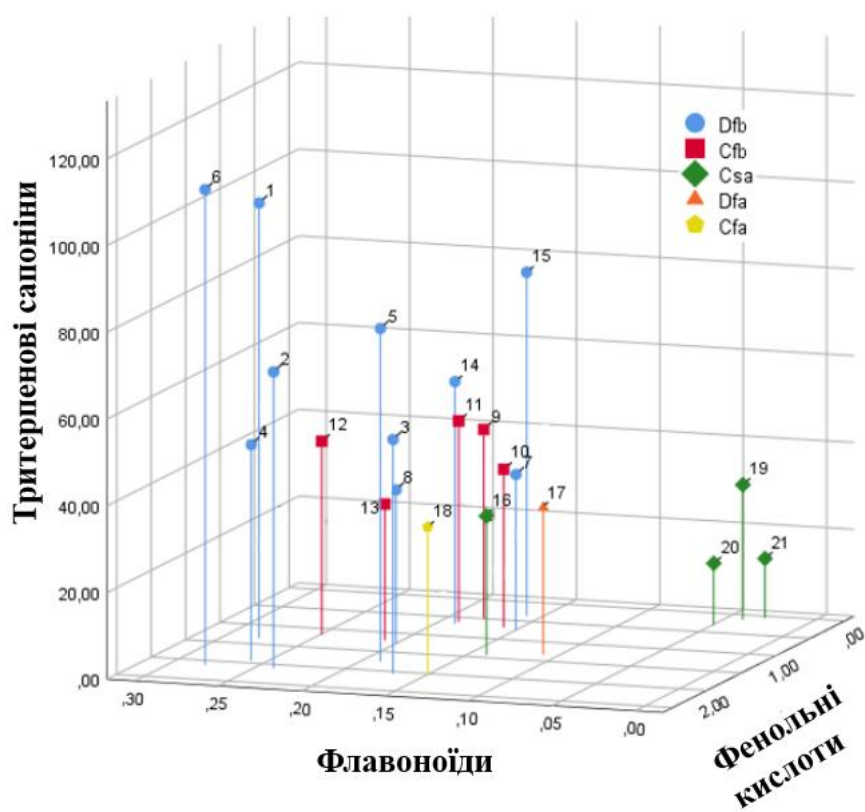


Рис. 3.8. Згрупований 3-D графік впливу типу клімату на накопичення речовин у листі плюща звичайного

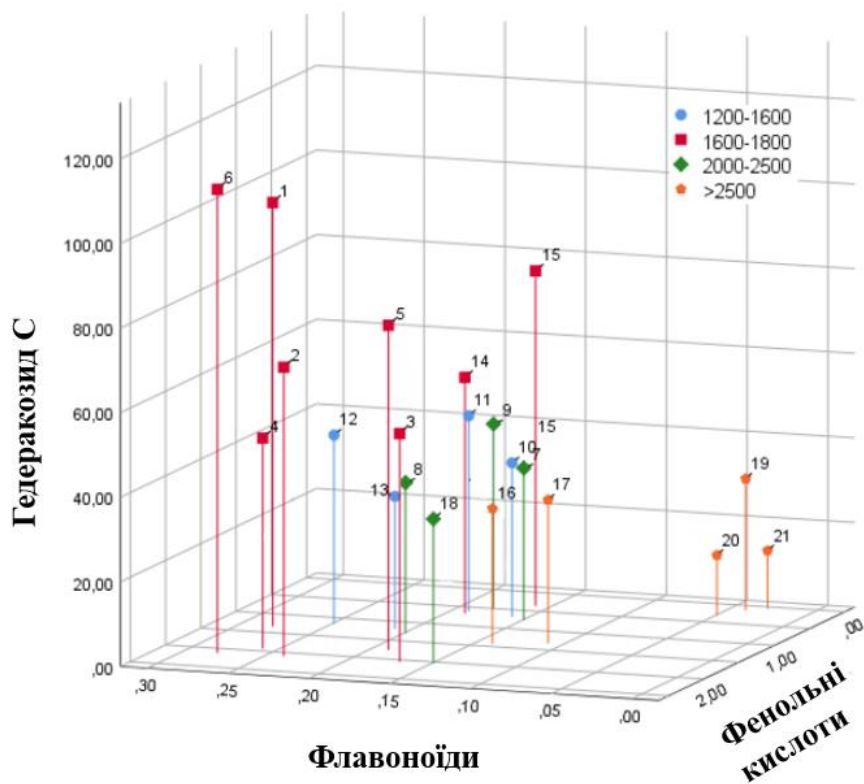


Рис. 3.9. Вплив тривалості сонячного світла на утворення БАР у листі плюща звичайного

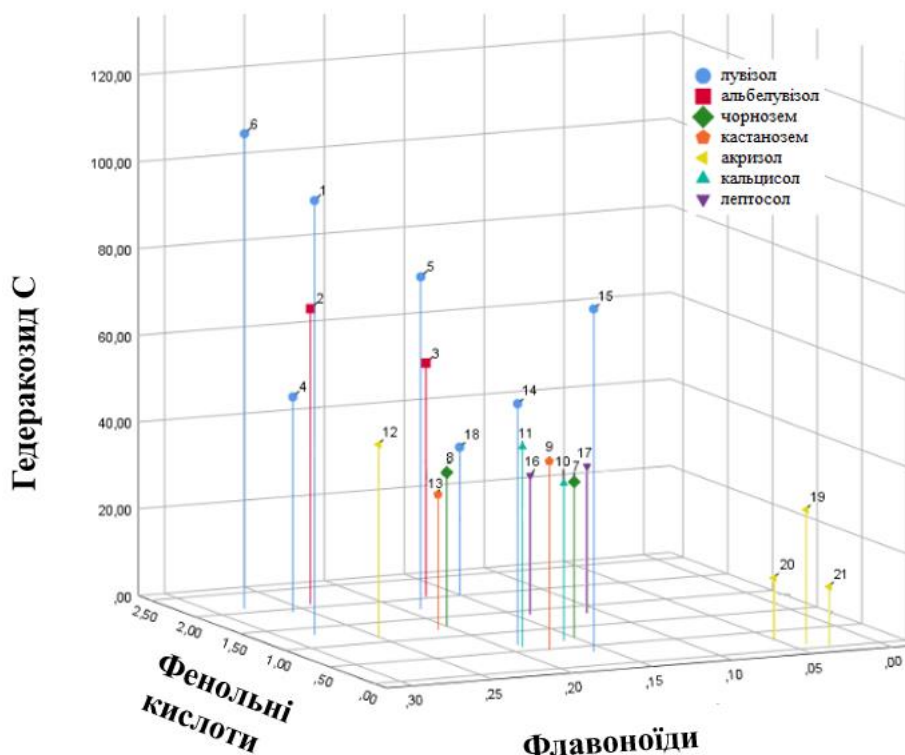


Рис. 3.10. Вплив ґрунту на склад компонентів у листі плюща звичайного

Вивчення рівномірності розподілу даних

Для визначення рівномірності розподілу даних для всіх досліджуваних груп було проведено пост-хок аналіз за допомогою тесту Тьюкі. Серед усіх пар тільки група гедеракозиду С і тривалість сонячного світла мають значний розподіл. Так, наприклад, група з тривалістю сонячних годин (>2500) мала суттєво менший вміст гедеракозиду С порівняно з іншою групою зразків, у якої тривалість була (1600-1800) год/рік (табл. 3.9, рис. 3.11).

Таблиця 3.9

Результати дослідження пост-хок аналізу Тьюкі для групи гедеракозиду С і тривалістю сонячного світла

(I) Тривалість	(J) Тривалість	Середня різниця (I-J)	Станд. похибка	Значен- ня	95% Довірчий інтервал	
					нижня межа	верхня межа
1200-1600	1600-1800	-34,526*	9,336	0,009	-61,066	-7,987
	2000-2500	2,357	10,781	0,996	-28,288	33,002
	>2500	14,687	10,228	0,495	-14,385	43,759
1600-1800	1200-1600	34,526*	9,336	0,009	7,987	61,066
	2000-2500	36,883*	9,336	0,005	10,344	63,422
	>2500	49,214*	8,692	0,000	24,507	73,920
2000-2500	1200-1600	-2,357	10,781	0,996	-33,002	28,288
	1600-1800	-36,883*	9,336	0,005	-63,422	-10,344
	>2500	12,330	10,228	0,632	-16,742	41,403
>2500	1200-1600	-14,687	10,228	0,495	-43,759	14,385
	1600-1800	-49,214*	8,692	0,000	-73,920	-24,507
	2000-2500	-12,330	10,228	0,632	-41,403	16,742

* Середня різниця значуща на рівні 0,05.

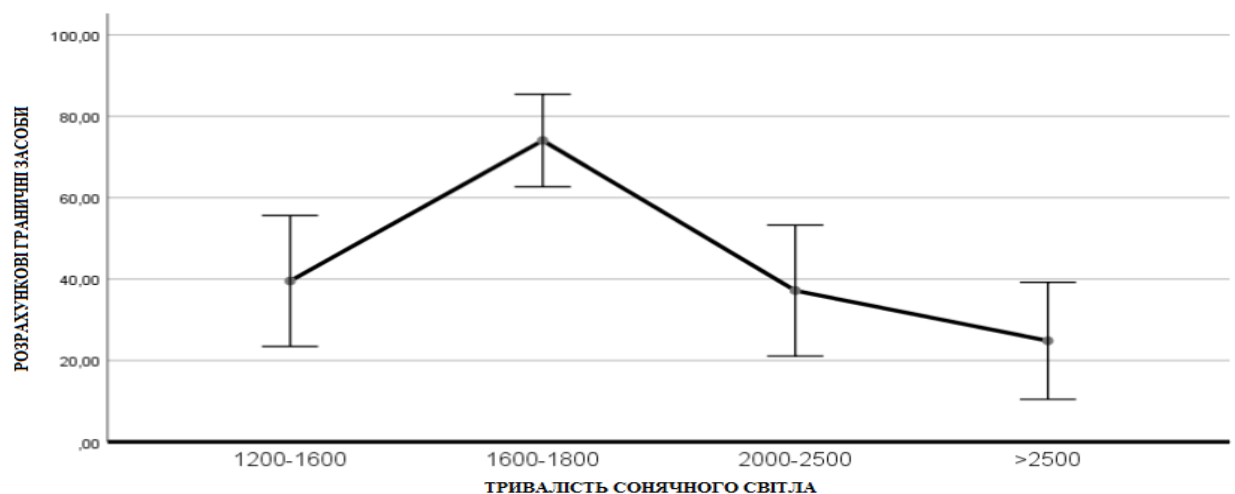


Рис. 3.11. Графік для пост-хок аналізу Тьюкі групи гедеракозиду С і тривалості сонячного світла

Метод головних компонент

Метод головних компонент був застосований для перевірки наявності сегрегації серед зразків відповідно до місця їх зростання (рис. 3.12). Перші дві осі пояснювали 62,00 та 24,15 % варіації відповідно. Зразки листя плюща, зібрані з Науйої-Акмяне, Каунаса, Пумпенай, Шилюте, Плунге, Кракова, Варшави та Клайпеди, були згруповані як зразки з найбільшим вмістом усіх досліджуваних компонентів. Тому ці регіони можна вважати оптимальними для вирощування та збирання *H. helix*. Зразки із Сіракуз та Палермо можна групувати як *H. helix* з найменшим вмістом всіх компонентів. У листі, зібраному в Метеорі, також було виявлено низький вміст гедеракозиду С (13,074 мг/г) та флавоноїдів (0,15 мг/г). Однак він не був включений до групи із Сіракуз та Палермо через значний вміст фенольних кислот (2,02 мг/г).

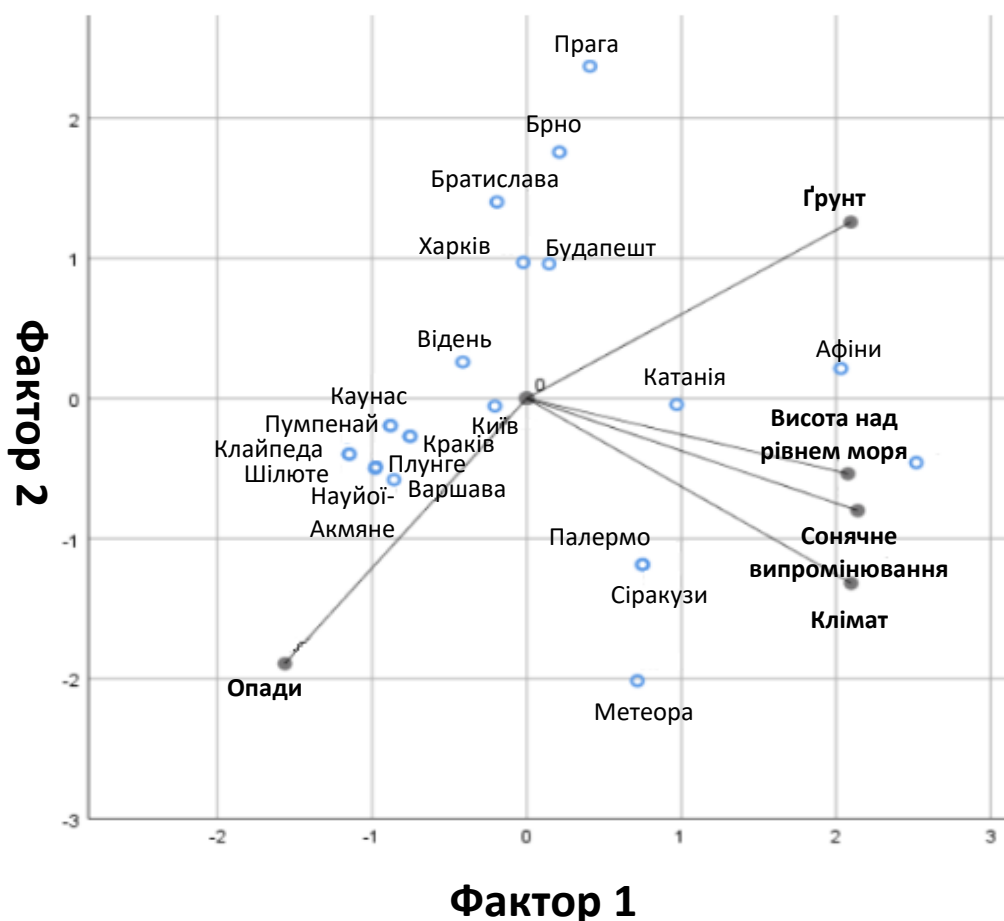


Рис. 3.12. Метод головних компонент аналізованих зразків листя плюща на основі вмісту визначених речовин, згрупованих у класи та абіотичні фактори

3.6 Дослідження хімічного складу листя *H. Helix*

За літературними джерелами [31, 92, 117], листя *H. helix* містить різноманітні компоненти, домінантними серед яких є тритерпенові сапоніни, флавоноїди та фенольні кислоти. У складі листя плюща також було визначено амінокислоти [77].

Для визначення тритерпенових сапонінів та фенольних речовин використовували параметри, вказані в *методиці 7 «Дослідження хімічного складу листя плюща, сухого екстракту та препаратів плюща»* (розд. 2, п. 2.4), додаткова ідентифікація зазначених компонентів проводилась за *методикою 9 «Визначення речовин методом мас-спектрометрії»* (розд. 2, п. 2.4).

Також були проведені *in-vitro* дослідження антиоксидантних властивостей компонентів листя плюща за *методикою 8 «Вивчення *in-vitro* антиоксидантної активності речовин»* (розд. 2, п. 2.4).

Для визначення амінокислот використовували *методику 10 «Визначення амінокислот методом газової хроматографії з мас-детектором»* (розд. 2, п. 2.4).

3.6.1 Вплив різних розчинників та способів екстракції на витяжку тритерпенових сапонінів та фенольних речовин листя *H. helix*

На перших етапах дослідження, вивчали вплив різних розчинників та способів екстракції на витяжку компонентів із сировини *H. helix*. Для цього було використано різні концентрації *метанолу P* – від 20 до 100 %, для екстракції використовували УЗ-баню. Також було перевірено метод екстракції, описаний у ДФУ 2.0 з застосуванням 80 % *метанолу* та зворотнього холодильника. Дослідження проводили на чотирьох різних серіях листя плюща, зібраних у Харкові, Відні, Празі та Науйої-Акмяне.

Приготування розчинів.

Розчин порівняння. Стандарти (галова, неоохлорогенова, хлорогенова, кофейна кислоти, рутин, гіперозид, ізокверцитрин, апігені 7-глюкозид, лютеолін, кверцетин, корична кислота, 6,7-дигідроксиізофлавіон, апігенін,

кемпферол, гедеракозид С, α -гедерин) були розчинені в метанолі Р. Концентрації речовин наведено в табл. 3.21.

Випробовувані розчини. 1,0 г подрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) тричі екстрагують 15 мл (20, 50, 70 або 100 % метанолом Р), витримуючи розчин на ультразвуковій бані протягом 15 хвилин за кімнатної температури. Після фільтрування екстракти об'єднували та доводили до об'єму 50,0 мл за допомогою розчину, який використовували для екстракції.

Випробовувані розчини за методикою ДФУ 2.0. За методикою, зазначеною в ДФУ 2.0, 1,00 г подрібненої на порошок сировини (355) поміщають у круглодонну колбу місткістю 250 мл, додають 50 мл 80 % розчину метанолу та нагрівають зі зворотним холодильником у водяній бані за температури 80 °С протягом 1 год. Охолоджують і фільтрують крізь ватний тампон у мірну колбу місткістю 100 мл. Ватний тампон разом із рослинним залишком знову екстрагують 30 мл суміші зі зворотним холодильником протягом 30 хв, після чого фільтрують. Отримані два фільтрати об'єднують та доводять 80 % розчину метанолу до об'єму 100,0 мл. Перед використанням фільтрують крізь мембранний фільтр [5].

Отримані дані свідчать, що вибір розчинника та спосіб екстракції суттєво впливають на вміст компонентів у витяжці листя плюща (табл. 3.10–3.12, рис. 3.13–3.14).

Так, для екстракції фенольних кислот найкращим був розчин 50 % метанолу, оскільки в середньому за зразками сума всіх екстрагованих речовин сягала 14589,001 мкг/г (табл. 3.10). Трохи меншу кількість було знайдено в 70 % метанолі (14440,702 мкг/г). Далі вміст фенольних кислот знижувався в такому порядку: 100 % метанол (14315,7 мкг/г) (табл. 3.13), 20 % метанол (11072,900 мкг/г) та 80 % метанол (8195,34 мкг/г).

Також варто відзначити, що для деяких окремих речовин необхідне застосування різних розчинників. Так, найбільшу концентрацію хлорогенової та 3,5-дикофеїлхіної кислот (80,678 та 10433,464 мкг/г відповідно) було знайдено в 100% метанольних екстрактах. Зі свого боку, розчин 70 % метанолу

був найкращим розчинником для 4,5-дикофеїлхінної кислоти (502,455 мкг/г), а 50% метанол – для 3,4-дикофеїлхінної (1068,042 мкг/г) та криптохлорогенової кислот (331,069 мкг/г) (табл.3.10, рис. 3.13).

За сумою екстрагованих флавоноїдів розчинники можна розташувати у такому порядку: 100 % метанол (3488,327 мкг/г) > 70 % метанол (3041,560 мкг/г) > 50 % метанол (2359,738 мкг/г) > 80 % метанол (2359,738 мкг/мл) > 20 % метанол (2249,972 мкг/г) (табл. 3.11, табл. 3.14, рис. 3.13).

Досліджуючи витяжку тритерпенових сапонінів, головним чином звертали увагу на екстракцію гедеракозиду С. 100 % метанол забезпечував найвищу концентрацію, що складала 81712,220 мкг/мл (табл. 3.15). Також цей розчинник краще екстрагував інші сапоніни, такі як α -гедерин, гедерасапонін В, гедеракозид D (табл. 3.12, рис 3.14).

Тому, зважаючи на певні переваги, для подальших досліджень було обрано 100 % метанол.

Таблиця 3.10

Вплив різних розчинників та способів екстракції на витяжку фенольних кислот із сировини *H. Helix* (мкг/г)

	Галова кисло- та	Неохлороге- нова кислот	Хлорогено -ва кислота	Коричн а кислота	3,5 - дикофеїлхінна кислота	3,4- дикофеїлхінна кислота	4,5- дикофеїлхінна кислота	Криптохло- рогенова кислота
1	2	3	4	5	6	7	8	9
20 % MeOH Науйої- Акмяне	н/в*	51,331 ±2,549	968,092 ±47,294	н/в*	20770,364 ±957,285	392,430 ±19,381	н/в*	56,448 ±2,196
20 % MeOH Харків	н/в*	160,437 ±8,006	2875,177 ±140,875	н/в*	9929,850 ±473,594	200,748 ±9,573	н/в*	106,399 ±5,327
20 % MeOH Прага	н/в*	29,019 ±1,459	1097,809 ±53,807	н/в*	2011,276 ±97,853	219,208 ±10,527	46,538 ±2,257	20,102 ±0,994
20 % MeOH Відень	н/в*	24,964 ±1,108	375,942 ±16,917	н/в*	4272,508 ±208,426	648,957 ±31,834	15,315 ±0,629	18,825 ±0,927
80 % MeOH Науйої- Акмяне	3,414± 0,167	74,450 ±3,691	1483,758 ±72,538	н/в*	14053,368 ±702,619	620,365 ±30,769	н/в*	25,179 ±1,238
80 % MeOH Харків	21,774 ±1,035	183,964 ±9,083	5473,689 ±259,521	н/в*	6534,471 ±325,352	496,678 ±23,597	н/в*	91,785 ±4,369
80 % MeOH Прага	н/в*	27,014 ±1,329	533,072 ±24,629	34,068 ±1,529	1643,288 ±81,464	74,610 ±3,629	н/в*	4,191 ±0,197
80 % MeOH Відень	н/в*	25,648 ±1,258	429,082 ±19,441	н/в*	899,960 ±43,859	42,501 ±2,089	н/в*	5,032 ±0,247

*— не визначено

Продовж. табл. 3.10

1	2	3	4	5	6	7	8	9
50 % MeOH Науйої- Акмяне	н/в*	21,154 ±1,018	1116,062 ±53,739	н/в*	21576,270 ±1059,519	1295,425 ±63,289	387,316 ±16,859	295,812 ±12,629
50 % MeOH Харків	н/в*	144,163 ±7,192	7479,364 ±368,276	н/в*	12839,253 ±637,269	1365,913 ±65,629	497,076 ±23,386	592,642 ±28,276
50 % MeOH Прага	н/в*	20,337 ±1,008	1252,794 ±59,738	н/в*	1820,743 ±89,703	614,993 ±28,731	415,996 ±19,839	230,648 ±10,148
50 % MeOH Відень	н/в*	19,365 ±0,957	304,785 ±14,297	н/в*	4529,137 ±221,593	996,704 ±47,582	334,830 ±16,086	205,175 ±6,095
70 % MeOH Науйої- Акмяне	2,579 ±0.125	57,043 ±2,768	1237,686 ±6,083	н/в*	21037,284 ±1.038,580	978,156 ±46,083	434,604 ±20,037	53,406 ±2,492
70 % MeOH Харків	26,837 ±1,273	165,694 ±8,571	8169,772 ±402,273	н/в*	13047,268 ±631,463	1180,673 ±57,301	704,534 ±34,726	359,613 ±17,573
70 % MeOH Прага	н/в*	33,964 ±1,653	1423,935 ±70,516	н/в*	2136,829 ±102,441	229,048 ±10,238	515,347 ±24,539	24,519 ±1,120
70 % MeOH Відень	н/в*	25,180 ±1,098	331,258 ±16,295	64,860 ±3,132	4629,087 ±207,534	476,290 ±20,519	355,336 ±16,593	61,871 ±3,019

Таблиця 3.11

Вплив різних розчинників та способів екстракції на витяжку флавоноїдів із сировини *H. Helix* (мкг/г)

	Рутин	Гіперозид	Ізокверци- трин	Апігенін 7- глюкозид	Апіге- нин	Кверце- тин	Лютео- лін	Кемпфе- рол	6-7- дигідрокс и ізофлавои
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
20 % MeOH Науйої- Акмяне	н/в	2611,438 ±128,568	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в
20 % MeOH Харків	н/в	4401,211 ±207,056	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в	3,037 ±0,127	н/в
20 % MeOH Прага	н/в	1400,839 ±67,527	н/в	н/в	н/в	0,871 ±0,024	н/в	н/в	н/в
20 % MeOH Відень	н/в	582,492 ±28,698	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в
80 % MeOH Науйої- Акмяне	97,837 ±4,089	2938,534 ±140,76	43,410 ±1,832	1057,209 ±49,680	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в
80 % MeOH Харків	51,945 ±2,131	2005,499 ±92,083	24,204 ±1,029	934,071 ±42,075	н/в	н/в	12,138 ±0,438	4,267 ±0,072	н/в
80 % MeOH Прага	н/в	1199,256 ±54,289	41,454 ±1,839	340,918 ±16,095	2,340 ±0,076	2,868 ±0,107	н/в	н/в	н/в

Продовж. табл. 3.11

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
80 % MeOH Відень	н/в	600,861 ±27,437	н/в	83,249 ±3,839	н/в	1,233 ±0,027	н/в	н/в	н/в
50 % MeOH Науйої- Акмяне	н/в	2964,508 ±135,419	46,929 ±2,039	783,073 ±34,280	2,224 ±0,108	н/в	н/в	н/в	н/в
50 % MeOH Харків	н/в	4130,617 ±197,059	27,775 ±1,049	612,271 ±27,135	н/в	0,154 ±0,014	7,209 ±0,342	3,259 ±0,109	н/в
50 % MeOH Прага	н/в	1788,378 ±83,918	52,493 ±2,073	300,654 ±15,017	2,931 ±0,129	н/в	н/в	н/в	н/в
50 % MeOH Відень	н/в	432,438 ±19,726	н/в	82,182 ±3,729	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в
70 % MeOH Науйої- Акмяне	93,501 ±2,867	2720,321 ±117,289	52,490 ±1,837	1023,281 ±49,837	2,507 ±0,083	н/в	н/в	н/в	н/в
70 % MeOH Харків	42,815 ±1,834	4548,443 ±219,768	32,925 ±1,273	943,804 ±47,029	н/в	0,249 ±0,011	10,294 ±0,439	4,732 ±0,214	н/в
70 % MeOH Прага	н/в	1755,508 ±87,543	65,392 ±2,154	286,372 ±12,89	3,297 ±0,126	3,429 ±0,145	н/в	н/в	н/в
70 % MeOH Відень	н/в	477,949 ±23,192	н/в	95,289 ±3,706	1,369 ±0,049	2,273 ±0,086	н/в	н/в	н/в

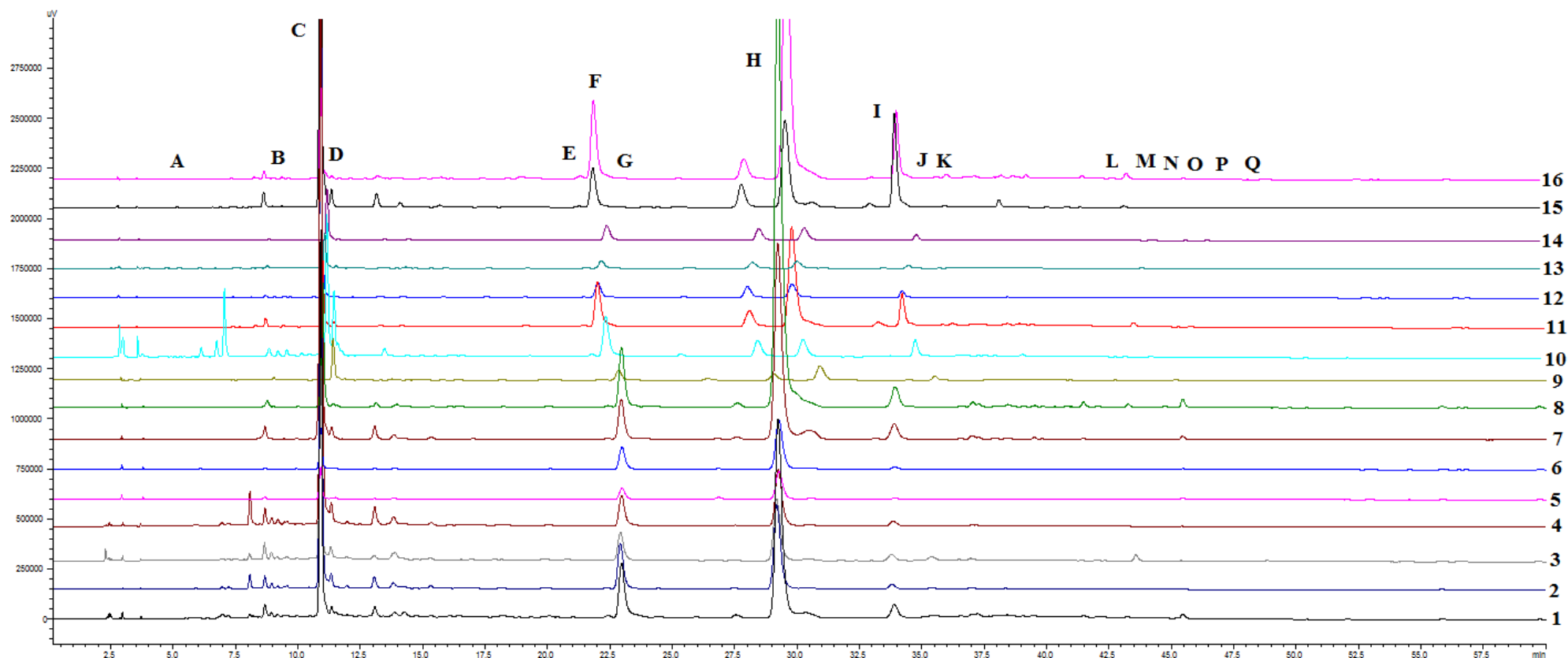


Рис. 3.13. Типові ВЕРХ хроматограми випробовуваних розчинів перевірки впливу розчинників та різних способів екстракції листя *H. helix*, виміряних за довжини хвилі 325 нм: А – галова кислота; В – неохлорогенова кислота; С – хлорогенова кислота; D – криптохлорогенова кислота; Е – рутин; F – гіперозид; G – ізокверцитрин; H – 3,5-дикофеїлхінна кислота; I – 3,4-дикофеїлхінна кислота; J – 4,5-дикофеїлхінна кислота; K – апігенін 7-глюкозид; L – лютеолін; M – кверцетин; N – корична кислота; O – апігенін; P – 6-7-дигідроксиізофлавоон; Q – кемпферол; **20 % метанол**: 1 – Харків, 2 – Прага, 3 – Науйої-Акмяне, 4 – Відень; **50 % метанол**: 5 – Прага, 6 – Відень, 7 – Науйої-Акмяне, 8 – Харків; **70 % метанол**: 9 – Відень, 10 – Прага, 11 – Науйої-Акмяне, 12 – Відень; **ДФУ 2.0**: 13 – Відень, 14 – Прага, 15 – Харків, 16 – Науйої-Акмяне

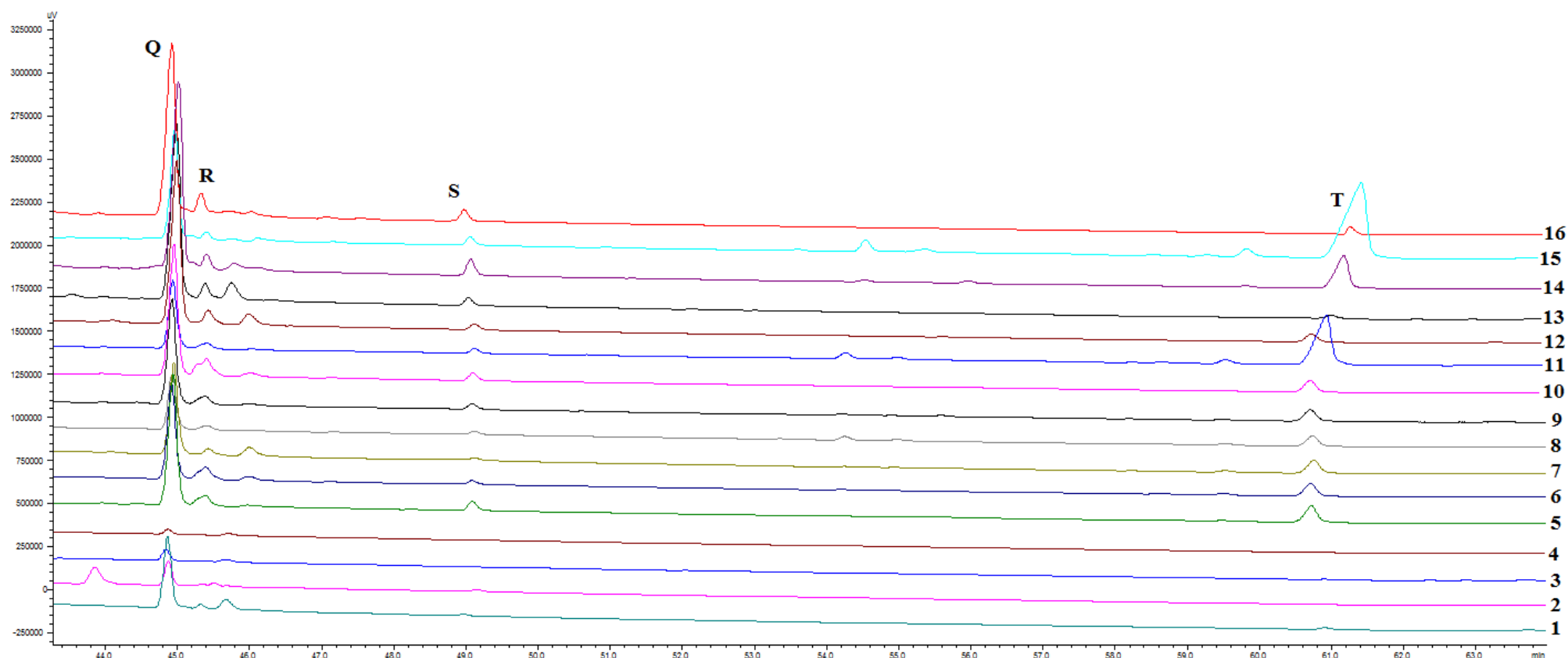


Рис. 3.14. Типові ВЕРХ хроматограми випробовуваних розчинів перевірки впливу розчинників та різних способів екстракції листя *H. helix*, виміряних за довжини хвилі 210 нм: Q –гедеракозид С; R –гедеракозид D; S –гедерасaponін В; Т – α-гедерин; **20 % метанол**: 1 – Науйої-Акмяне, 2 – Харків, 3 – Прага, 4 – Відень; **50 % метанол**: 5 – Відень, 6 – Харків, 7 – Науйої-Акмяне, 8 – Прага; **70 % метанол**: 9 – Відень, 10 – Харків, 11 – Науйої-Акмяне, 12 – Прага; **ДФУ 2.0**: 13 – Науйої-Акмяне, 14 –Відень, 15 – Прага, 16 –Харків.

Таблиця 3.12

Вплив різних розчинників та способів екстракції на витяжку тритерпенових сапонінів із сировини *H. helix* (мкг/г)

	Гедеракозид С	α -гедерин	Гедерасапонін В	Гедеракозид D
20 % Науйої-Акмяне	2875,029 ±101,175	31,812 ±1,432	437,719 ±20,528	812,793 ±47,529
20 % Харків	3633,076 ±29,375	5,171 ±0,243	602,996 ±30,089	396,728 ±17,257
20 % Прага	3550,087 ±149,205	701,703 ±32,093	1513,051 ±70,526	878,109 ±42,059
20 % Відень	3499,902 ±172,591	402,604 ±17,023	2070,072 ±98,031	1108,319 ±53,459
80 % Науйої-Акмяне	60124,782 ±297,391	60,747 ±3,018	1744,284 ±86,421	3145,929 ±156,693
80 % Харків	35470,376 ±289,159	9,223 ±0,429	2844,333 ±139,661	3794,805 ±187,231
80 % Прага	35877,260 ±1632,638	3034,770 ±148,539	2097,056 ±104,291	2036,370 ±98,158
80 % Відень	43486,789 ±2048,539	824,779 ±38,586	1532,970 ±76,237	3516,601 ±164,937
50 % Науйої-Акмяне	48904,020 ±2439,012	331,419 ±15,759	1148,227 ±57,139	3953,443 ±196,512
50 % Харків	42940,396 ±2073,086	240,396 ±19,809	1877,603 ±93,753	9914,671 ±493,238
50 % Прага	38612,099 ±1879,507	257,441 ±2,938	1652,302 ±83,619	4085,755 ±201,250
50 % Відень	44161,503 ±2146,050	392,666 ±18,364	1093,198 ±54,956	1660,022 ±82,001
70 % Науйої-Акмяне	55501,682 ±2709,164	492,635 ±9,238	3268,785 ±163,281	403,047 ±321,562
70 % Харків	52277,273 ±2597,339	272,584 ±13,189	4403,287 ±219,638	8532,222 ±409,137
70 % Прага	40047,989 ±101,549	1555,925 ±7,806	2896,524 ±141,628	4741,418 ±219,070
70 % Відень	50470,251 ±2493,291	290,813 ±14,273	3478,711 ±172,559	6588,106 ±328,210

3.6.2 Кількісне визначення фенольних компонентів, тритерпенових сапонінів та амінокислот

Для визначення кількісного вмісту фенольних речовин і тритерпенових сапонінів як екстрагенту був обраний 100 % метанол. Також цей розчин був використаний для подальшої ідентифікації компонентів мас-спектрометрією за методикою 9 «Визначення речовин методом мас-спектрометрії». Окремі компоненти ідентифікували за допомогою мас- та УФ-спектрів. Зокрема, гедерасапонін В та гедеракозид D були обчислені як еквіваленти гедеракозиду С. Також, 3,5-дикофеїлхінна, 3,4-дикофеїлхінна, 4,5-дикофеїлхінна та криптохлорогенова кислоти представлені як еквіваленти хлорогенової кислоти.

Дев'ять фенольних кислот було виявлено у випробовуваних зразках *H. helix* (табл. 3.13, рис. 3.15). Більшість виявлених фенольних кислот були похідними гідроксикоричної кислоти: неохлорогенова, хлорогенова, корична, кофейна, 3,5-дикофеїлхінна, 3,4-дикофеїлхінна, криптохлорогенова та 4,5-дикофеїлхінна кислоти, крім того була знайдена похідна тригідроксибензойної кислоти – галова. Вміст цих речовин значно варіювався серед усіх досліджених локацій. Концентрації хлорогенової та 3,5-дикофеїлхінної кислот були домінантними серед фенольних кислот зразків плюща, їх кількість значно варіювалась – 30 та 53 разів, відповідно. У більшості зразків 3,5-дикофеїлхінна кислота перевищувала хлорогенову – у 1.5 – 18 разів, за винятком зразків із Пумпенай, Будапешта, Кракова, Метеори, Сіракуз, де хлорогенова кислота мала найбільший вміст. 3,4-дикофеїлхінна кислота була третьою домінуючою фенольною кислотою, виявленою в усіх випробовуваних зразках *H. helix*. Склад галової, коричневої та кофейної кислот був характерним для певних географічних місць. Вони займали до 1 % від загальної кількості виявлених речовин.

Флавоноїдний профіль складався з флавонолів (рутин, гіперозид, ізокверцитрин, кверцетин та кемпферол) та флавонів (апігенін 7-глюкозид, апігенін, лютеолін та 6-7-дигідроксіізофлавіон) (табл 3.14, рис. 3.15). Гіперозид

та апігенін 7-глюкозид були домінантними флавоноїдами. Вони були знайдені в межах від $(45 \pm 1,2)$ до $(4750,9 \pm 7,6)$ мкг / г і від $(113,3 \pm 0,7)$ до $(1918,2 \pm 17,2)$ мкг / г, відповідно. Інші флавоноїди визначені в значно менших кількостях як індивідуальні для кожної локації збору. Найбільша кількість флавоноїдів була знайдена в рослинних зразках, зібраних у Метеорі, Каунасі, Плунге, Науйої-Акмяне, Харкові та Шилюте.

Склад тритерпенових сапонінів був представлений гедеракозидом С, α -гедерином, гедерасапоніном В та гедеракозидом D (табл.3.15, рис. 3.16). Вміст тритерпенових сапонінів можна розташувати в такому порядку: гедеракозид С > гедеракозид D > α -гедерин > гедерасапонін В. Зазначений профіль був знайдений у всіх зразках, крім гедерасапоніну В, який був відсутній в Сіракузах. Концентрація гедеракозиду С коливалася від 3807,7 (Сіракузи) до 79737,3 мкг / г (Варшава) (табл. 3.15). Гедеракозид С був домінуючою речовиною в складі та становив від 31 % до 88 % загальної кількості ідентифікованих тритерпенових сапонінів.

Для дослідження профілю амінокислот використовували *методику 10 «Визначення амінокислот методом газової хроматографії з мас-детектором»* (розд. 2, п. 2.4). Розчини були приготовлені таким чином.

Розчин порівняння. Аліквоту розчину 0,1 М хлористоводневої кислоти, що містить по 100 мкг кожної амінокислоти (аланіну, валіну, лейцину, ізолейцину, проліну, глютамінової кислоти та серину), випаровували досуха за допомогою газу нітрогену. Потім до залишку додавали 100 мкл *ацетонітрилу Р* та 100 мкл MTBSTFA, отриманий розчин нагрівали за температури 100 °С протягом 2,5 годин на бані з гліцерином.

Випробовуваний розчин. 500 мкл розчину, приготованого для кількісного визначення фенольних і тритерпенових сапонінів, випаровували досуха за допомогою газу нітрогену. Потім до залишку додавали 100 мкл *ацетонітрилу Р* та 100 мкл MTBSTFA. Отриманий розчин нагрівали за температурою 100 °С протягом 2,5 годин на бані з гліцерином.

Склад визначених амінокислот був різним. Лише аланін знайшли в усіх зразках (табл. 3.16, рис. 3.17). Аланін та пролін були домінантними сполуками, після яких у менших кількостях знайшли валін, ізолейцин, лейцин, 4-аміномасляна кислота та серин. Кількість аланіну та проліну варіювалася – від 0,7 до 14,4 мкг / г і від 0,8 до 16,4 мкг / г, відповідно.

Таблиця 3.13

Вміст фенольних кислот (мкг/г) у зібраному листі плюща звичайного

Локація	Галова кислота	Неохлоро- генова кислот	Хлороге- нова кислота	Корична кислота	Кофейна кислота	3,5 – дикофеїлхін- на кислота	3,4- дикофеїлхін- на кислота	Криптохло- рогенова кислота	4,5- дикофеїлхін- на кислота
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Науйої- Акмяне	7,770 ±0,030	63,702 ±0,72	1204,802 ±24,601	н/в	н/в	21863,299 ±783,836	990,941 ±48,963	39,158 ±1,758	154,889 ±7,592
Клайпеда	9,320 ±0,164	65,501 ±2,357	2956,602 ±41,833	н/в	н/в	7359,675 ±359,634	670,829 ±32,493	91,534 ±4,489	47,990 ±2,238
Плунге	11,200 ±0,350	85,003 ±2,54	5609,704 ±48,548	н/в	н/в	10277,421 ±509,637	793,643 ±38,837	208,405 ±8,573	87,410 ±4,237
Шілюте	15,440 ±0,277	131,100 ±2,655	5295,203 ±98,607	5,657 ±0,082	н/в	23866,566 ±863,267	1479,981 ±72,596	111,548 ±5,493	210,804 ±9,837
Пумпенай	12,30 ±0,156	92,104 ±1,405	4838,402 ±23,209	н/в	74,503 ±2,730	2904,445 ±143,273	365,402 ±15,021	13,576 ±0,627	52,047 ±2,593
Каунас	13,400 ±0,270	369,401 ±4,187	5035,102 ±43,557	н/в	н/в	10596,315 ±507,364	1538,216 ±75,168	311,762 ±15,439	61,162 ±3,005
Київ	3,300 ±0,061	167,800 ±3,98	3645,403 ±28,72	н/в	н/в	5352,043 ±259,965	172,554 ±8,735	58,996 ±2,476	156,042 ±7,692
Харків	63,100 ±1,553	192,603 ±3,69	8213,202 ±6,06	н/в	н/в	13128,289 ±639,416	1071,853 ±52,694	239,441 ±11,289	145,186 ±7,139
Будапешт	н/в	141,602 ±0,871	5921,504 ±11,057	42,503 ±1,052	н/в	3349,453 ±164,309	188,972 ±9,122	55,891 ±2,68	44,740 ±2,139

Продовж. табл. 3.13

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Прага	н/в	37,003 ±0,582	1518,300 ±15,559	36,903 ±0,584	н/в	2176,952 ±105,967	225,034 ±10,834	58,387 ±2,769	23,019 ±1,128
Брно	н/в	137,10 ±2,585	1274,103 ±4,675	25,802 ±0,921	н/в	1604,520 ±78,637	94,420 ±3,680	210,274 ±10,439	25,732 ±1,139
Відень	н/в	29,403 ±0,712	445,504 ±2,572	50,803 ±0,524	н/в	4565,316 ±220,347	676,861 ±32,678	19,105 ±0,918	22,030 ±1,083
Братисла- ва	н/в	58,483 ±0,924	325,796 ±10,062	24,404 ±0,612	н/в	2881,802 ±141,039	97,576 ±4,268	54,415 ±2,682	19,594 ±0,957
Краків	н/в	86,001 ±2,34	929,702 ±4,586	20,303 ±0,915	н/в	488,187 ±23,937	108,234 ±5,039	51,062 ±2,439	24,189 ±1,059
Варшава	н/в	205,000 ±2,105	1680,001 ±41,573	34,404 ±0,47	н/в	2478,278 ±109,945	152,647 ±7,209	241,468 ±12,29	64,489 ±3,219
Афіни	2,720 ±0,068	139,062 ±1,736	1653,502 ±33,765	57,478 ±0,743	н/в	3996,873 ±197,537	700,144 ±34,533	90,145 ±4,239	205,195 ±10,283
Дельфи	2,880 ±0,027	377,983 ±4,599	3170,103 ±29,552	82,402 ±0,62	н/в	4755,414 ±234,473	858,609 ±41,366	115,557 ±5,269	33,746 ±1,539
Метеора	6,300 ±0,071	267,721 ±3,693	8630,058 ±12,517	132,837 ±1,332	н/в	5143,269 ±251,139	644,698 ±31,083	171,562 ±8,439	69,636 ±3,357
Катанія	н/в	5,963 ±0,094	287,476 ±1,778	н/в	7,457 ±0,086	862,943 ±39,283	38,592 ±1,839	4,169 ±0,176	8,198 ±0,386
Палермо	н/в	69,302 ±1,007	1728,237 ±2,436	н/в	22,124 ±0,355	3362,257 ±163,570	253,249 ±12,375	22,710 ±1,086	43,783 ±2,069
Сіракузи	н/в	5,481 ±0,0137	706,724 ±1,678	н/в	12,559 ±0,134	450,013 ±21,562	35,706 ±1,439	4,392 ±0,182	9,073 ±0,417

Таблиця 3.14

Вміст флавоноїдів (мкг/г) у зібраному листі плюща звичайного

Локація	Рутин	Гіперозид	Ізокверци-трин	Апігенін 7-глюкозид	Апіге-нин	Кверце-тин	Лютео-лін	Кемпфе-рол	6-7-дигідрокси ізофлаво-н
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Науйої-Акмяне	92,503 ±1,625	2761,200 ±8,631	49,004 ±1,254	1918,203 ±17,196	2,151 ±0,075	н/в	н/в	н/в	н/в
Клайпеда	34,221 ±0,711	1585,603 ±2,978	н/в	782,884 ±9,139	1,312 ±0,055	н/в	н/в	н/в	н/в
Плунге	29,502 ±0,745	2614,904 ±30,475	н/в	728,501 ±9,314	н/в	н/в	н/в	н/в	1,838 ±0,045
Шілюте	263,704 ±1,185	3279,387 ±9,722	88,602 ±2,434	147,34 ±4,782	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в
Пумпенай	57,101 ±1,558	3266,802 ±13,364	39,000 ±0,952	147,72 ±2,136	1,623 ±0,018	2,471 ±0,132	н/в	н/в	н/в
Каунас	94,203 ±1,47	4194,904 ±15,963	95,603 ±1,487	1483,101 ±12,215	н/в	0,901 ±0,014	2,002 ±0,012	н/в	н/в
Київ	78,304 ±1,395	2320,401 ±16,102	71,004 ±1,532	385,602 ±2,342	н/в	н/в	н/в	2,202 ±0,017	н/в
Харків	45,102 ±0,525	4750,902 ±7,581	29,802 ±0,419	1458,403 ±11,812	0,700 ±0,015	0,402 ±0,008	14,105 ±0,504	5,476 ±0,042	3,902 ±0,059
Будапешт	68,104 ±1,504	3620,704 ±18,153	77,204 ±1,386	346,868 ±2,581	н/в	1,304 ±0,026	н/в	н/в	н/в

Продовж. табл. 3.14

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Прага	н/в	1627,796 ±13,985	67,902 ±1,539	423,801 ±1,120	3,601 ±0,121	3,803 ±0,091	н/в	н/в	н/в
Брно	28,400 ±0,412	2124,502 ±6,252	24,005 ±0,211	245,331 ±0,948	н/в	н/в	н/в	3,128 ±0,065	н/в
Відень	н/в	574,204 ±17,280	н/в	113,302 ±0,656	1,804 ±0,024	2,511 ±0,025	н/в	н/в	2,729 ±0,053
Братисла- ва	н/в	978,504 ±5,849	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в
Краків	н/в	1209,705 ±15,866	н/в	232,233 ±6,695	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в
Варшава	79,604 ±0,919	2127,502 ±6,573	н/в	299,102 ±8,951	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в
Афіни	27,502 ±0,586	1912,373 ±15,847	н/в	304,164 ±2,172	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в
Дельфи	43,278 ±0,821	1774,661 ±5,644	н/в	774,520 ±9,379	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в
Метеора	89,717 ±0,432	3452,964 ±23,486	н/в	655,241 ±8,795	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в
Катанія	н/в	145,462 ±1,656	н/в	187,454 ±2,798	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в
Палермо	н/в	398,502 ±2,956	н/в	865,732 ±10,747	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в
Сіракузи	н/в	45,002 ±1,225	0,724 ±0,012	268,793 ±4,624	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в

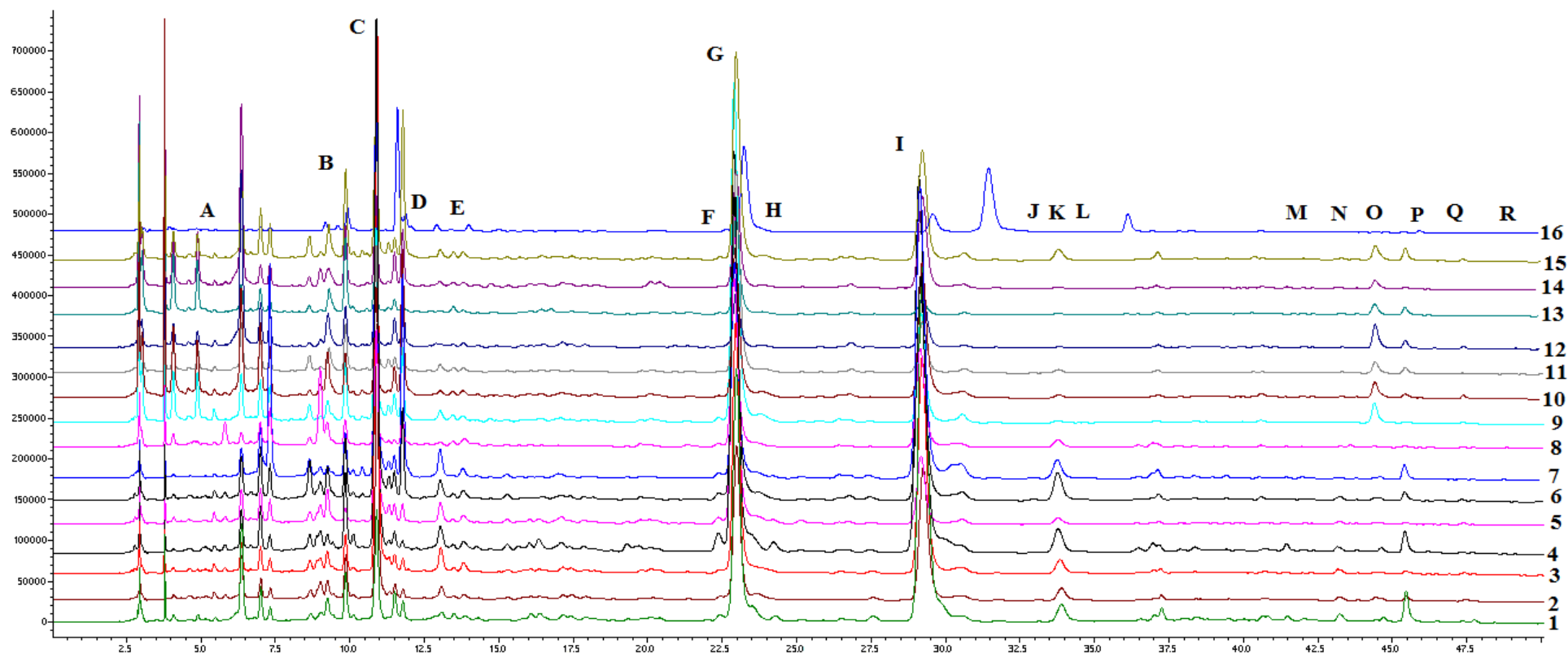


Рис. 3.15. Типові ВЕРХ хроматограми дослідження хімічного складу листа *H. helix*, детектованого за довжини хвилі 275 нм: А – галова кислота, В – неохлорогенова кислота, С – хлорогенова кислота, D – криптохлорогенова кислота, Е – кофейна кислота, F – рутин, G – гіперозид, Н – ізокверцитрин, I – 3,5-дикофеїлхінна кислота, J – 3,4-дикофеїлхінна, К – 4,5-дикофеїлхінна кислота, L – апігенін 7-глюкозид, М – лютеолін, N – кверцетин, О – корична кислота, Р – апігенін, Q – 6-7-дигідроксизофлавіон, R – кемпферол; 1 – Науйої-Акмяне, 2 – Клайпеда, 3 – Плунге, 4 – Шилуте, 5 – Пумпенай, 6 – Каунас, 7 – Київ, 8 – Харків, 9 – Будапешт, 10 – Прага, 11 – Брно, 12 – Відень, 13 – Братислава, 14 – Краків, 15 – Варшава, 16 – Афіни)

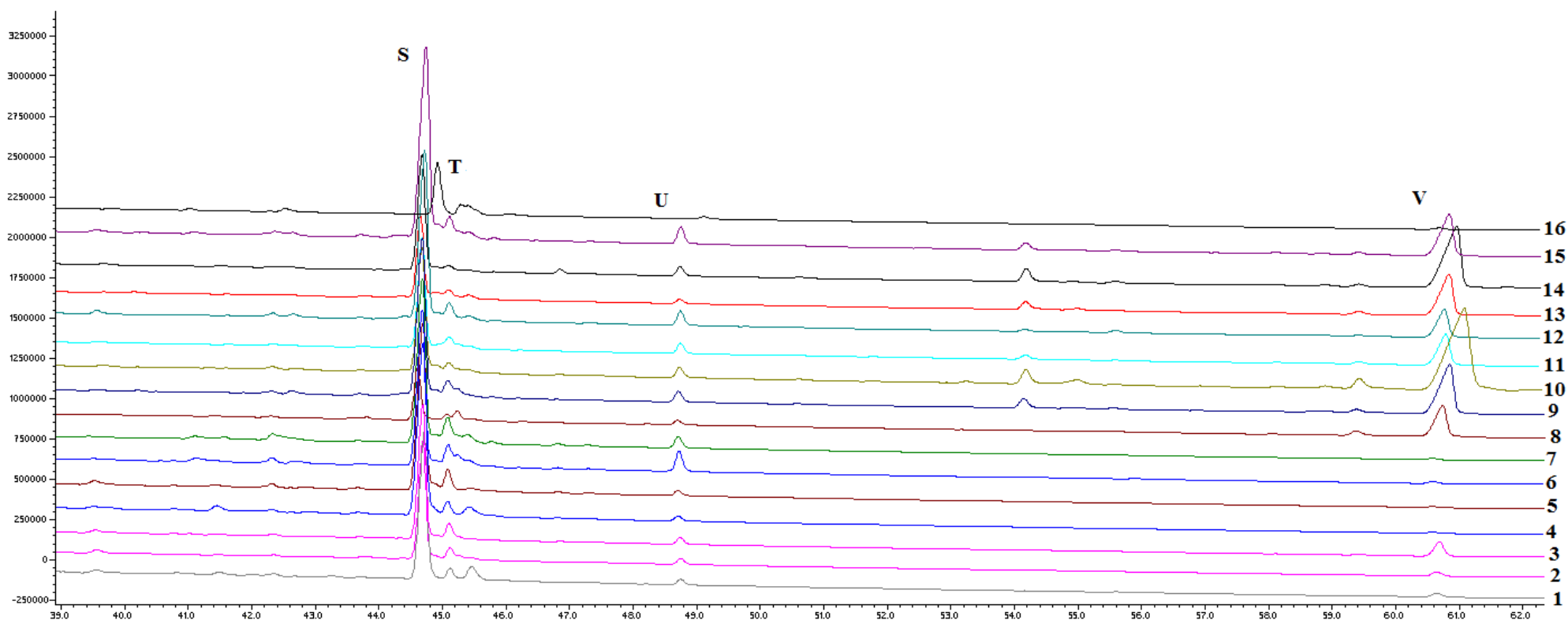


Рис. 3.16. Типові ВЕРХ хроматограми дослідження хімічного складу листя *H. helix*, детектованого за довжини хвилі 210 нм: Q – гедеракозид С, Т – гедеракозид D, U – α -гедерин, V – гедерасaponін В; 1 – Науйої-Акмяне, 2 – Клайпеда, 3 – Плунге, 4 – Шилюте, 5 – Пумпенай, 6 – Каунас, 7 – Київ, 8 – Харків, 9 – Будапешт, 10 – Прага, 11 – Брно, 12 – Відень, 13 – Братислава, 14 – Краків, 15 – Варшава, 16 – Афіни

Таблиця 3.15

Вміст тритерпенових сапонінів (мкг/г) у зібраному листі плюща звичайного

№	Локація	Гедеракозид С	α -гедерин	Гедерасапо- нін В	Гедеракозид D
1	2	3	4	5	6
1	Науйої-Акмяне	61353,903 $\pm 367,654$	607,403 $\pm 7,301$	3111,479 $\pm 103,968$	4557,998 $\pm 218,980$
2	Клайпеда	38851,503 $\pm 73,532$	955,604 $\pm 27,870$	3205,647 $\pm 146,231$	5202,412 $\pm 248,357$
3	Плунге	45936,601 $\pm 69,818$	3372,903 $\pm 18,541$	3634,278 $\pm 153,867$	8377,773 $\pm 409,624$
4	Шілюте	67839,902 $\pm 19,987$	427,504 $\pm 15,371$	2745,980 $\pm 101,523$	6555,194 $\pm 318,597$
5	Пумпенай	63973,701 $\pm 19,677$	249,604 $\pm 26,482$	2762,240 $\pm 109,052$	10825,469 $\pm 537,835$
6	Каунас	55840,304 $\pm 29,009$	507,400 $\pm 27,347$	11049,430 $\pm 463,527$	8545,055 $\pm 425,935$
7	Київ	15474,298 $\pm 37,766$	8314,603 $\pm 15,469$	2529,798 $\pm 107,584$	2161,787 $\pm 107,069$
8	Харків	61248,403 $\pm 62,342$	314,701 $\pm 7,126$	6119,517 $\pm 247,207$	9949,636 $\pm 496,823$
9	Будапешт	56440,100 $\pm 22,803$	16225,204 $\pm 18,947$	5760,029 $\pm 209,306$	3880,97 $\pm 192,08$
10	Прага	43254,804 $\pm 62,739$	40762,703 $\pm 38,212$	5534,141 $\pm 269,907$	3658,029 $\pm 181,673$
11	Брно	34704,604 $\pm 135,268$	8597,402 $\pm 49,781$	7753,724 $\pm 386,938$	8308,414 $\pm 413,739$
12	Відень	62499,902 $\pm 124,991$	7417,604 $\pm 73,079$	9350,092 $\pm 465,830$	7108,550 $\pm 353,423$
13	Братислава	24837,504 $\pm 12,836$	12333,101 $\pm 16,652$	5104,559 $\pm 254,393$	3383,552 $\pm 63,035$
14	Краків	36684,902 $\pm 143,544$	23594,104 $\pm 17,968$	2310,494 $\pm 114,032$	4010,502 $\pm 196,317$
15	Варшава	79737,303 $\pm 86,831$	1272,904 $\pm 36,558$	5818,802 $\pm 290,271$	5997,540 $\pm 298,302$
16	Афіни	31878,892 $\pm 96,971$	1510,202 $\pm 5,766$	1409,571 $\pm 67,265$	5580,771 $\pm 26,728$
17	Дельфи	36257,783 $\pm 60,490$	622,221 $\pm 1,550$	726,567 $\pm 35,928$	11111,451 $\pm 551,593$
18	Метеора	5534,781 $\pm 35,975$	523,963 $\pm 3,093$	1372,012 $\pm 65,937$	5064,449 $\pm 247,637$

Продовж. табл. 3.15

1	2	3	4	5	
19	Катанія	8174,322 ±104,831	3193,079 ±27,892	782,061 ±37,098	2165,920 ±106,382
20	Палермо	6721,450 ±36,074	1601,503 ±7,402	669,412 ±30,429	2150,275 ±106,835
21	Сіракузи	3807,702 ±25,951	6959,357 ±65,683	н/в	1258,020 ±61,836

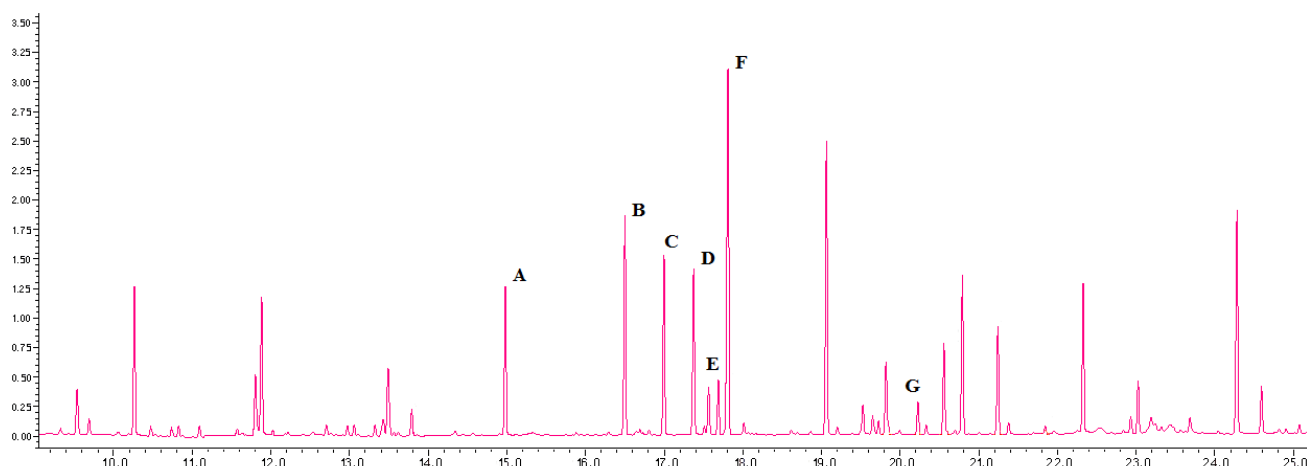


Рис. 3.17. Типова ГХ-МС хроматограма вивчення профілю амінокислот: А – аланін, В – валін, С – лейцин, D – ізолейцин, Е – 4-аміномасляна кислота, F – пролін, G – серин

Таблиця 3.16

Вміст амінокислот (мкг/г) у зразках *H. helix*

Локація	Аланін	Валін	Лейцин	Ізолейцин	4-аміномасляна кислота	Пролін	Серин
1	2	3	4	5	6	7	8
Науйої-Акмяне	4,948 ±0,274	2,015 ±0,075	0,970 ±0,0244	0,738 ±0,024	6,520 ±0,113	5,981 ±0,159	н/в
Клайпеда	9,684 ±0,084	5,644 ±0,182	5,482 ±0,124	4,524 ±0,126	н/в	9,188 ±0,194	2,216 ±0,018
Плунге	6,841 ±0,070	н/в	3,873 ±0,095	3,196 ±0,058	н/в	6,491 ±0,125	н/в
Шілюте	4,330 ±0,126	1,763 ±0,051	0,849 ±0,024	0,646 ±0,012	5,706 ±0,152	5,234 ±0,172	н/в
Пумпенай	5,995 ±0,997	2,441 ±0,022	н/в	0,894 ±0,017	7,899 ±0,194	н/в	н/в

Продовж. табл. 3.16

1	2	3	4	5	6	7	8
Каунас	11,038 ±0,195	н/в	н/в	н/в	н/в	10,472 ±0,263	2,526 ±0,026
Київ	9,678 ±0,348	1,140 ±0,027	н/в	0,706 ±0,015	н/в	н/в	н/в
Харків	2,539 ±0,069	н/в	н/в	n/d	н/в	16,420 ±0,218	н/в
Будапешт	5,326 ±0,066	1,386 ±0,039	1,025 ±0,014	0,818 ±0,024	н/в	3,641 ±0,058	н/в
Прага	14,440 ±0,272	н/в	н/в	6,745 ±0,137	н/в	13,70 ±0,568	н/в
Брно	8,823 ±0,434	н/в	4,994 ±0,194	4,121 ±0,065	н/в	8,371 ±0,148	н/в
Відень	7,114 ±0,155	2,896 ±0,048	н/в	1,061 ±0,035	9,374 ±0,278	н/в	н/в
Братислава	7,442 ±0,137	4,337 ±0,026	н/в	3,476 ±0,085	н/в	7,061 ±0,153	н/в
Краків	3,264 ±0,061	1,329 ±0,045	0,640 ±0,023	0,487 ±0,035	н/в	н/в	н/в
Варшава	10,36 ±0,185	6,038 ±0,193	н/в	4,839 ±0,149	н/в	9,829 ±0,194	2,370 ±0,085
Афіни	2,869 ±0,143	1,672 ±0,036	1,624 ±0,0412	1,340 ±0,037	н/в	н/в	н/в
Дельфи	1,619 ±0,049	0,659 ±0,012	н/в	н/в	2,134 ±0,056	1,957 ±0,057	н/в
Метеора	4,697 ±0,138	2,738 ±0,063	2,659 ±0,092	2,194 ±0,091	н/в	н/в	1,075 ±0,037
Катанія	0,977 ±0,018	0,569 ±0,015	н/в	н/в	н/в	0,927 ±0,034	0,224 ±0,007
Палермо	0,661 ±0,013	0,269 ±0,007	0,130 ±0,003	0,099 ±0,002	0,870 ±0,014	0,798 ±0,023	н/в
Сіракузи	0,925 ±0,022	0,539 ±0,013	0,524 ±0,012	0,432 ±0,0162	н/в	н/в	н/в

Дані кількісного вмісту фенольних компонентів, тритерпенових сапонінів та амінокислот у сировині *H. helix* використовували для ієрархічного кластерного аналізу. Номера зразків з ієрархічного кластерного аналізу (рис. 3.18–3.20) відповідають номерам зразків у табл. 3.15.

За ієрархічним кластерним аналізом фенольні компоненти згрупували усі зразки у три кластери (рис. 3.18). Кількість фенольних речовин у кластерах

розташована в такому порядку: кластер I > кластер II > кластер III. Перший кластер мав зразки з найбільшим вмістом 3,5-дикофеїлхіної, хлорогенової кислот та гіперозиду, в середньому ($3055,7 \pm 10,344$), ($4079,2 \pm 954,2$) та ($3072 \pm 456,9$) мкг/г, відповідно (рис. 3.18). Вміст інших фенольних речовин був більшим порівняно з другим кластером, крім коричної кислоти, яка мала найнижчий вміст. Кластер I об'єднував зразки плюща, зібраного у Литві (Науйої-Акмяне, Каунас, Пумпенай), Східній Україні (Харків), Австрії (Відень), Угорщина (Будапешт) та Польща (Варшава) (рис. 3.18).

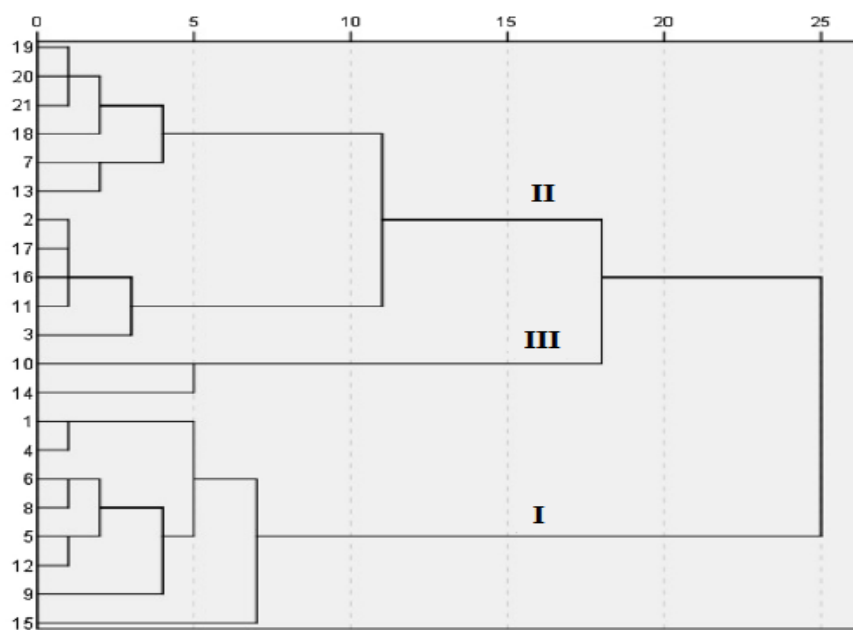


Рис. 3.18. Дендограма ієрархічного кластерного аналізу зразків листя *H. helix* на основі фенольних речовин

Вміст фенольних речовин у кластері II можна визначити таким порядком: 3,5-дикофеїлхінна кислота < хлорогенова кислота < гіперозид, в середньому їх кількість була ($4186,0 \pm 873,1$), ($2726,15 \pm 765,6$) і ($1577,5 \pm 326,7$) мкг/г, відповідно. Цей кластер містив найбільшу кількість коричної кислоти порівняно з кластером I та III. Кластер II об'єднував зразки листя плюща, зібраного у Клайпеді, Плунге, Києві, Брно, Братиславі та всіх південних місцях збору Італії та Греції (в Афінах, Дельфах, Метеорі, Катанії, Палермо та Сіракузах) (рис. 3.18). Кластер II мав найменшу кількість фенольних речовин. Кількість трьох фенольних маркерів, а саме: 3,5-

дикофеїлхінна кислоти, хлорогенової кислоти та гіперозиду в середньому становила $(1332,6 \pm 844,4)$, $(1224,0 \pm 294,3)$ і $(1418,7 \pm 209,05)$ мкг / г, відповідно. Кластер III поєднав зразки зібрані з Праги та Кракова (рис.3.18).

Кластеризація місць збору за вмістом тритерпенових сапонінів виявила три кластери (рис. 3.19). Кластер I характеризувався найбільшою кількістю гедеракозиду C – у середньому $(53581,8 \pm 4090,5)$ мкг / г, при цьому інші сапоніни: α -гедерин, гедерасапонін B та гедеракозид D мали значно нижчі концентрації: $(7384,7 \pm 652,7)$, $4880,5 \pm 859,7(3236,9 \pm 1324,1)$ мкг / г, відповідно. Кластер I поєднав усі литовські зразки (Науйої-Акмяне, Клайпеда, Плунге, Шилуте, Пумпенай, Каунас), зразки з Харкова, Будапешта, Брно, Відня, Варшави та два грецькі зразки (з Афін та Дельф). Кластер II відрізнявся найменшою кількістю тритерпенових сапонінів. За їх середнім вмістом можна розташувати в такому порядку: гедеракозид C ($10758,3 \pm 3261,0$ мкг / г) > α -гедерин ($5487,6 \pm 1844,12$ мкг / г,) > гедеракозид D ($2697,3 \pm 548,1$ мкг / г) > гедерасапонін B ($1743,0 \pm 756,5$ мкг / г). Цей кластер згрупував зразки, зібрані в Південній Європі (у Метеорі, Катанії, Палермо, Сіракузах), Братиславі та Києві. Кластер III складався зі зразків зібраних у Празі та Кракові. Цей кластер характеризувався двома домінантними сапонінами – гедеракозидом C та α -гедерином із середнім вмістом $(39969,8 \pm 3284,9)$ і $(32178,4 \pm 8584,3)$ мкг / г, відповідно.

Кластерний аналіз за амінокислотами згрупував усі зразки у два кластери (рис. 3.20). Загальна кількість амінокислот в кластері II була значно більшою порівняно з кластером I – 26,8 та 11,2 мкг / г, відповідно. Домінантною сполукою в кластері I був аланін – $(4,03 \pm 0,7)$ мкг / г, тоді як кластер II характеризувався двома маркерами амінокислот: проліном та аланіном – $(10,2 \pm 0,2)$ та $(8,9 \pm 1,2)$ мкг / г, відповідно. Кластер II поєднав зразки, зібрані у Клайпеді, Плунге, Каунасі, Харкові, Празі, Брно, Братиславі, Варшаві (рис. 3.20).

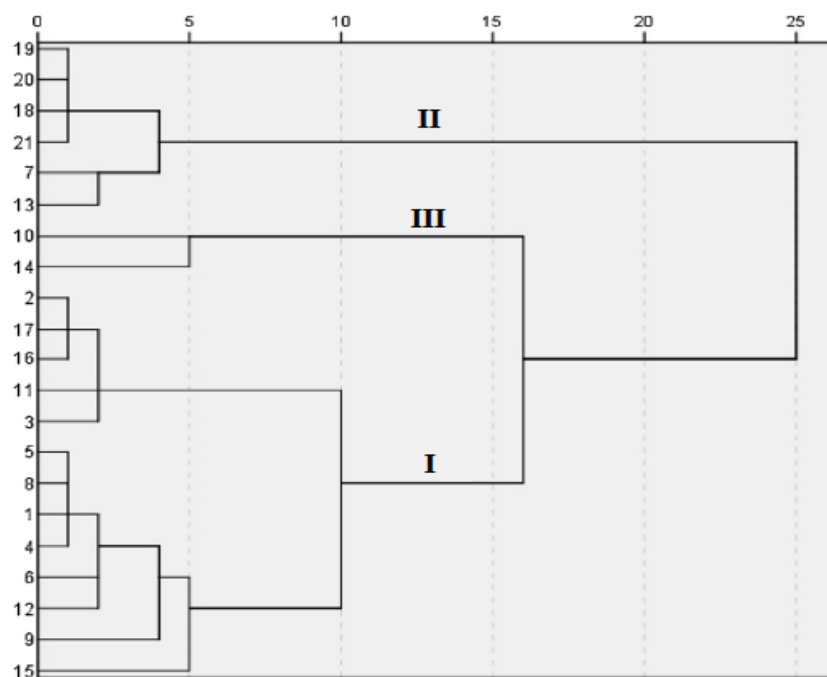


Рис. 3.19. Дендограма ієрархічного кластерного аналізу зразків листя *H. helix* на основі тритерпенових сапонінів

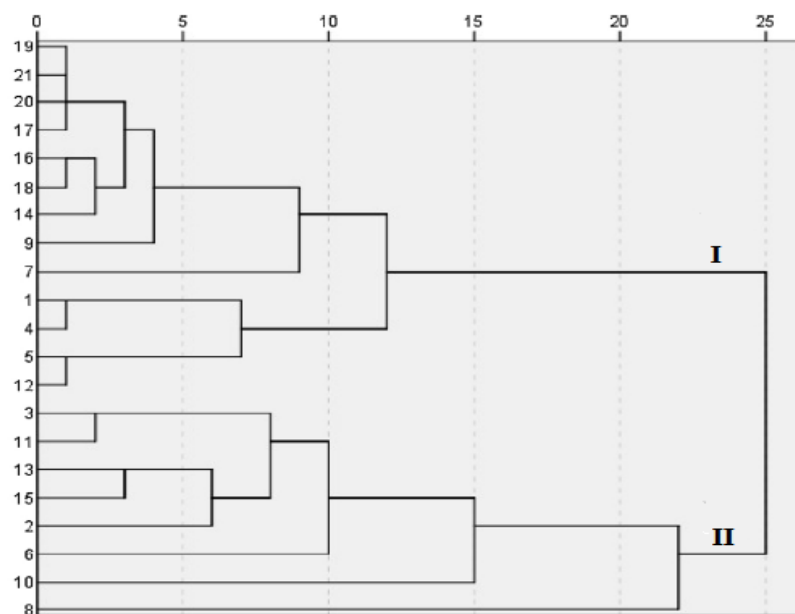


Рис. 3.20. Дендограма ієрархічного кластерного аналізу зразків листя *H. helix* на основі амінокислот

Нами були визначені певні закономірності в профілях компонентів, що може допомогти виявити додаткові речовини-маркери для стандартизації листя плюща (рис. 3.21). Це дозволить відбирати якісну рослинну сировину під час вхідного контролю, що, зі свого боку дозволить збільшити безпечність та ефективність препаратів *H. helix* [49, 173, 115].

Проведене дослідження виявило, що не всі зразки відповідають вимогам якості. У зразках, зібраних у Сіракузах, Метеорі, Палермо, Катанії, Києві та Братиславі кількість гедеракозиду С була менше – 30 мг / г ($p < 0,05$).

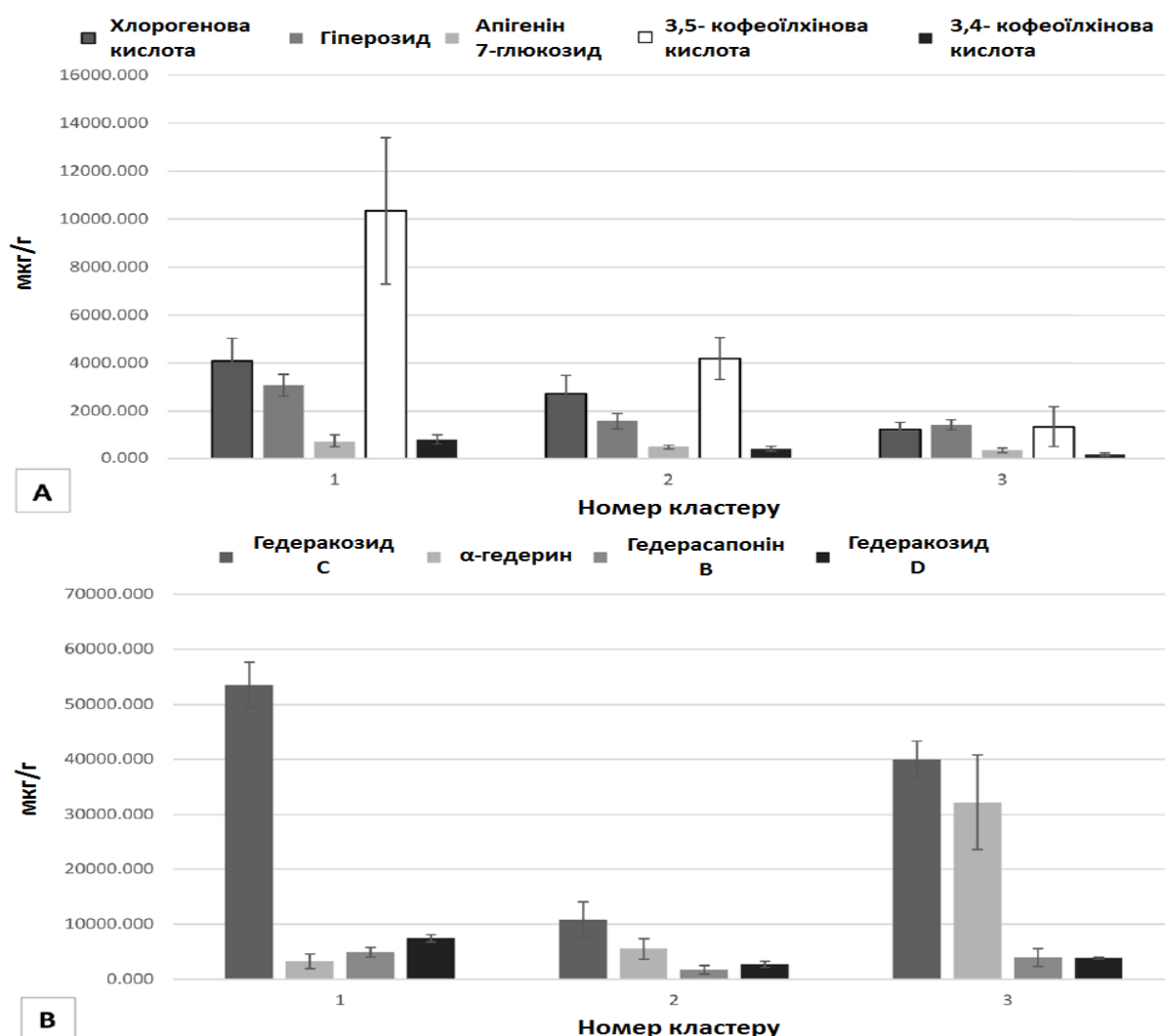


Рис. 3.21. Середні значення основних речовин (мкг/г) зразків листя *H. helix*, знайдених за допомогою ієрархічного аналізу (А – фенольні речовини див. рис. 3.18; В – тритерпенові сапоніни див. рис. 3.19)

У флавоноїдному профілі переважали гіперозид та апігенін-7-глікозид. Рутин, ізокверцитрин, кверцетин, апігенін, кемпферол не мали відмінностей на схемі фітогеографічного розподілу.

Амінокислотний профіль у наших дослідженнях в основному складався з аланіну та проліну. Обидві амінокислоти важливі в синтезі та регенерації білків [77]. У літературі зазначено, що пролін бере участь у механізмах абіотичної стресостійкості рослин. Підвищене вироблення проліну

– це метаболічний механізм акліматизації, який індукує внутрішні антиоксидантні та детоксикаційні механізми [24, 38, 75]. Кількість проліну була значно більшою ($p < 0,05$) у зразках, зібраних із кліматичних зон (Dfb), порівняно із середземноморськими (Csa). Пролін, лейцин, серин і аланін можуть функціонувати як сигнальні молекули або брати участь у синтезі вторинних метаболітів [75]. Проте, оскільки вміст амінокислот складав менше 1% від загального вмісту речовин, використання цієї групи речовин у якості маркерів не рекомендується.

Відзначається, що саме фенольна фракція завдяки своїм антиоксидантним та протизапальним властивостям сприяє лікуванню хронічно-запальних бронхіальних захворювань [161]. На підставі вищесказаного як маркери можна використовувати гедеракозид С, 3,5-дикофеїлхінну хлорогенову кислоти, гіперозид та апігенін 7-глюкозид, оскільки вони мали найбільший вміст серед усіх досліджуваних компонентів. Проте визначення одразу п'яти різних речовини підвищить собівартість аналізу й ускладнить його проведення. Деякі фармакологічні дослідження підкреслюють важливість гедеракозиду С, хлорогенової кислоти та гіперозиду для високої фармакологічної активності продуктів плюща звичайного [27]. Тому з метою забезпечення більш ефективного входного контролю саме ці речовини можуть бути використані для стандартизації листа *H. helix* на виробництві.

3.6.3 Вивчення антиоксидантної активності компонентів листа плюща з використанням ВЕРХ/ABTS методики

За допомогою ВЕРХ/ABTS методу було встановлено профіль речовин, що мають найбільшу антиоксидантну активність *in vitro* (табл. 3.17). Визначені компоненти забезпечували від 85 до 97 % загальної активності у випробовуваних зразках. Найактивнішими речовинами в умовах експерименту виявились 3,5-дикофеїлхінна та хлорогенова кислоти, що

відповідали за 80 % загальної активності. Їх можна обрати маркерами антиоксидантної дії. Інші речовини, можна розташувати у такому порядку: 3,4-дикофеїлхінна кислота < гіперозид < неохлорогенова кислота. Їх антиоксидантні величини корелюють із їх визначеним кількісним вмістом.

Таблиця 3.17

Значення еквівалента тролоксу (мкмоль ТЕ/г) для зразків листя плюща звичайного

Локація	Неохлоро- генова кислот	Кислота хлорогенов а	Гіпе- розид	3,5 – дикофеїлхін- на кислота	3,4- дикофеїлхін- на кислота
1	2	3	4	5	6
Науйої- Акмяне	0,41 ±0,01	2,98 ±0,21	1,12 ±0,08	26,08 ±0,34	1,96 ±0,07
Клайпеда	0,45 ±0,02	6,62 ±0,52	1,07 ±0,10	9,65 ±0,69	1,79 ±0,13
Плунге	0,53 ±0,04	8,46 ±0,65	1,25 ±0,10	6,91 ±0,06	1,09 ±0,07
Шілюте	0,67 ±0,05	7,34 ±0,49	1,38 ±0,11	30,13 ±1,00	2,34 ±0,21
Пумпе- най	0,39 ±0,02	6,56 ±0,54	1,10 ±0,09	1,63 ±0,12	1,07 ±0,01
Каунас	3,02 ±0,01	9,69 ±0,76	1,24 ±0,10	13,82 ±0,28	2,52 ±0,05
Київ	1,76 ±0,13	2,98 ±0,24	1,12 ±0,09	5,46 ±0,46	0,79 ±0,06
Харків	1,35 ±0,11	11,99 ±0,94	1,97 ±0,16	16,09 ±1,15	4,83 ±0,42
Будапешт	0,22 ±0,01	19,70 ±6,57	2,37 ±1,16	14,64 ±3,10	0,85 ±0,60
Прага	1,31 ±0,11	3,18 ±0,26	1,74 ±0,01	2,27 ±0,19	0,75 ±0,01
Брно	0,17 ±0,01	1,21 ±0,10	0,62 ±0,05	1,24 ±0,09	1,26 ±0,01
Відень	1,88 ±0,15	5,67 ±0,47	1,40 ±0,11	3,81 ±0,34	1,00 ±0,09
Братисла- ва	0,91 ±0,07	2,20 ±0,18	0,69 ±0,05	1,69 ±0,11	0,85 ±0,01
Краків	0,70 ±0,05	0,53 ±0,04	0,58 ±0,05	3,52 ±0,01	0,75 ±0,01
Варшава	0,76 ±0,06	9,16 ±0,65	1,52 ±0,37	3,92 ±0,27	0,54 ±0,04

Продовж. табл. 3.17

1	2	3	4	5	6
Афіни	0,30 ±0,01	11,24 ±0,45	1,91 ±0,07	19,41 ±0,74	2,41 ±0,12
Дельфи	1,7 ±0,14	10,69 ±0,85	2,08 ±0,16	16,75 ±1,52	1,52 ±0,52
Метеораа	2,09 ±0,17	16,34 ±1,31	3,21 ±0,25	17,62 ±1,22	1,26 ±0,84
Катанія	0,13 ±0,01	0,96 ±0,07	0,22 ±0,01	5,99 ±0,01	2,28 ±0,17
Палермо	0,30 ±0,02	4,09 ±4,31	0,13 ±0,01	9,29 ±0,66	0,79 ±0,06
Сіракузи	0,05 ±0,00	2,18 ±0,17	0,52 ±0,04	3,15 ±0,01	1,16 ±0,07

3.6.4 Валідація методики ВЕРХ для кількісного визначення тритерпенових сапонінів і фенольних речовин та методики ГХ-МС для кількісного визначення амінокислот

Метрологічні параметри методики наведені в табл. 3.19-3.22. У табл. 3.18 наведені хроматографічні характеристики (час утримування) всіх аналізованих компонентів, а також їх спектральні дані (мас- та УФ-спектри). Коефіцієнти кореляції для діапазонів лінійності фенольних речовин і тритерпенових сапонінів були вище 0,999. Відтворюваність визначалася для всіх випробовуваних речовин, відносні стандартні відхилення знаходилися в діапазоні 0,46–1,45 %. Дослідження правильності проводилось для трьох різних концентрацій, отримані значення знаходилися в діапазоні від 82,01–112,89 % та 97,79 – 102,35 % для амінокислот та фенольних речовин із тритерпеновими сапонінами, відповідно. Також були розраховані межі виявлення та межі кількісного визначення для всіх досліджуваних компонентів (табл. 3.19, 3.21).

Таблиця 3.18

Хроматографічні та спектральні характеристики речовин листя плюща звичайного

Речовина	Час утримуван- ня, хв, УВЕРХ-МС	[М- Н] ⁻	Фрагмен- тарні іони	Час утримуван- ня, хв, ВЕРХ	Максиму- ми поглинан- ня, нм
1	2	3	4	5	6
Галова кислота	1,14	125	169	5,96	271, 214, 197
Неохлорогенова кислота	2,76	353	191, 179, 135	9,36	325, 234, 217
Хлорогенова кислота	3,69	191	353	11,66	327, 241, 218
Кофейна кислота	3,92	135	179	14,18	324, 235, 217
Рутин	4,82	609	-	22,48	352, 255
Гіперозид	5,11	463	300	23,69	353, 255
Ізокверцитрин	5,01	463	300	24,13	352, 255, 228
Нікотифлорин	5,44	593	-	29,51	347, 298, 265
Апігенін 7- глюкозид	5,47	431	-	33,49	337, 266, 237
Лютеолін	6,76	285	-	43,60	348, 266, 253
Кверцетин	6,68	301	-	43,81	369, 254
Корична кислота	6,82	147	-	45,22	276, 222

Продовж. табл. 3.18

1	2	3	4	5	6
6,7-дигідроксі-ізофлавон	6,95	253		48,10	326, 244
Апігенін	7,35	269	-	47,90	337, 267, 237
Кемпферол	7,41	285	-	49,09	365, 265
Гедеракозид С	6,85	1220	-	44,61	195
α -гедерин	8,51	749	-	60,89	195
Гедерасопонін В	7,47	1204	-	48,66	195
Гедеракозид D	6,99	1073	1005	45,25	195
3,5-дикофеїлхінна кислота	5,59	515	353, 191	29,19	329, 233, 216
3,4-дикофеїлхінна кислота	5,72	515	353, 161	33,28	327, 241, 222
4,5-дикофеїлхінна кислота	5,93	515	161	36,8	326, 240, 220

Таблиця 3.19

Параметри лінійності, межі виявлення та межі кількісного визначення ВЕРХ методу для дослідження фенольних речовин і тритерпенових сапонінів

Речовина	Калібрувальна крива	r	Концентрації, (мкг/мл)	Межа виявлення (нг/мл)	Межа кількісного визначення (нг/мл)
1	2	3	4	5	6
Галова кислота	$f(x)=32880.6 \cdot x - 612.983$	0,999971	0,48 – 61,08	30	100
Неохлорогенова кислота	$f(x)=30834.6 \cdot x - 613.100$	0,999959	0,38 – 48	30	80
Хлорогенова кислота	$f(x)=29930.2 \cdot x - 538.361$	0,999950	0,36 – 46	20	70
Кофейна кислота	$f(x)=57646.8 \cdot x - 3853.48$	0,999921	0,72 – 91,92	20	60
Рутин	$f(x)=78502.3 \cdot x + 0$	0,999990	0,3 – 38,75	30	90
Гіперозид	$f(x)=16072.5 \cdot x + 1499.73$	0,999878	0,16 – 20,24	96	290
Ізокверцитрин	$f(x)=22498.4 \cdot x + 2508.57$	0,999864	0,21 – 27,04	75	230
Апігенін 7-глюкозид	$f(x)=24139.7 \cdot x + 3904.44$	0,999894	0,35 – 44,56	73	220
Лютеолін	$f(x)=38477.5 \cdot x + 4025.41$	0,999924	0,25 – 32	53	160

Продовж. табл. 3.19

1	2	3	4	5	6
Кверцетин	$f(x)=43128.4 \cdot x + 2971.98$	0,999906	0,14 – 17,6	25	80
Корична кислота	$f(x)=39349.5 \cdot x + 1454.47$	0,999850	0,16 – 20,08	31	90
6,7- дигідроксіізофлавон	$f(x)=50138.3 \cdot x + 5722.97$	0,999889	0,2 – 25,76	25	80
Апігенін	$f(x)=58103.6 \cdot x + 3915.34$	0,999886	0,1 – 13,02	16,4	50
Кемпферол	$f(x)=29888.8 \cdot x + 1814.27$	0,999924	0,14 – 18,32	37	110
Гедеракозид С	$f(x)=1549.27 \cdot x + 10097.1$	0,999998	6,25 – 400	2,81	8,51
α -гедерин	$f(x)=2910.49 \cdot x + 11218.7$	0,999958	7,82 – 500	10,98	33,26

Таблиця 3.20

Результати визначення правильності ВЕРХ методики для дослідження
фенольних речовин і тритерпенових сапонінів

Компонент	Введено (мкг/мл)	Знайдено (%)	RSD (%)
1	2	3	4
Галова кислота	7,65	101,07	0,65
	30,35	99,69	0,56
	61,2	100,09	0,94
Неохлорогенова кислота	6	100,17	0,55
	24	98,58	0,57
	48	100,14	1,01
Хлорогенова кислота	5,75	100,69	0,86
	23	99,58	1,05
	46	101,91	0,97
Кофейна кислота	11,49	100,01	0,46
	45,96	99,39	0,99
	91,92	100,17	0,37
Корична кислота	4,77	99,41	0,29
	21,01	99,55	0,31
	38,795	99,99	0,56
Рутин	2,53	100,18	0,55
	10,12	100,65	0,92
	20,24	99,78	0,31
Гіперозид	3,433	100,78	0,9
	13,715	100,72	0,71
	26,915	99,77	0,43

Продовж. табл. 3.20

1	2	3	4
Ізокверцитрин	5,57	100,13	0,69
	22,28	99,64	0,9
	44,56	97,79	0,49
Апігенін 7-глюкозид	4	100,38	0,53
	16	100,45	0,63
	32	102,35	0,85
Лютеолін	2,2	101,3	0,49
	8,8	100,54	0,76
	17,6	99,81	0,57
Кверцетин	2,51	99,86	0,8
	10,4	99,15	0,61
	20,08	100,14	1,07
Апігенін	4	100,56	0,79
	16	98,96	0,71
	32	99,8	1,02
6,7- дигідроксіізофлавон	1,63	100,61	0,86
	6,51	100,54	0,76
	13,02	99,79	0,39
Кемпферол	2,29	100,35	0,49
	9,16	100,49	0,68
	18,32	99,83	0,34
Гедеракозид С	6,25	99,24	0,97
	25	100,74	0,91
	50	100,05	0,84
α -гедерин	7,82	98,96	0,93
	31,25	99,34	0,7
	62,5	99,27	0,61

Таблиця 3.21

Параметри лінійності, межі виявлення та межі кількісного визначення ГХ-МС методу для дослідження амінокислот

Речовина	Калібрувальний графік	r	Діапазон концентрації (мкг/мл)	Межа виявлення (нг/мл)	Межа кількісного визначення (нг/мл)
Аланін	$f(x)=276580.863935 \cdot x - 353207.105647$	0,983122	11,15 – 44,6	0,72	2,4
Валін	$f(x)=243032.088633 \cdot x + 49012.859468$	0,975345	14,7 – 58,8	0,585	1,93
Лейцин	$f(x)=277306.790190 \cdot x - 217513.405090$	0,963603	16,5 – 58,8	0,1257	0,459
Ізолейцин	$f(x)=228260.308590 \cdot x + 246041.176091$	0,969531	16,45 – 65,8	0,125	0,491
Пролін	$f(x)=280385.380976 \cdot x + 1325395.667639$	0,972168	14,4 – 57,6	0,184	0,213
Серин	$f(x)=317111.017808 \cdot x + 1640589.305389$	0,957872	13,15 – 52,6	0,375	0,482
Глутамінова кислота	$f(x)=214747.719667 \cdot x - 596641.230769$	0,980993	18,4 – 73,6	0,53	1,76

Таблиця 3.22

Результати вивчення правильності ГХ-МС методу для дослідження
амінокислот

Речовина	Введено (мкг/мл)	Знайдено (%)	RSD (%)
Аланін	11,15	95,86	1,43
	22,3	86,99	1,06
	33,45	102,11	1,32
Валін	14,7	95,11	1,26
	29,4	87,27	1,07
	44,1	106,46	1,10
Лейцин	16,5	96,74	1,44
	33,1	82,01	0,98
	44,1	110,91	0,92
Ізолейцин	16,45	97,57	1,35
	32,9	85,63	1,29
	49,35	111,18	1,08
Пролін	14,4	95,73	1,42
	28,8	97,92	1,12
	43,2	111,75	0,93
Серин	13,15	90,73	1,28
	26,3	100	1,04
	39,45	112,89	0,96
Глютамінова кислота	18,4	85,11	1,22
	36,8	86,02	1,18
	55,2	103,67	0,97

Висновки до розділу 3

1. Заготовлено та проведено порівняльний хімічний аналіз зразків листків плюща в різних країнах Європи, а саме в Австрії, в Греції, в Італії, в Литві, в Польщі, в Словаччині, в Угорщині, в Україні, в Чехії.

2. Розроблено точні та специфічні ВЕРХ та УВЕРХ методики для кількісного визначення гедеракозиду С у сировині з ізократичним режимом хроматографування. Вони забезпечують зменшення часу для проведення аналізу порівняно з градієнтним ВЕРХ методом, що пропонується ДФУ 2.0. Також було встановлено, що методи не мають статистично значущої різниці в отриманих значеннях за t-критерієм Стюдента.

3. Методом ВЕРХ з діодно-матричним детектором було ідентифіковано та кількісно виміряно 20 компонентів, серед яких були тритерпенові сапоніни, фенольні кислоти та флавоноїди. Домінантною речовиною серед усіх компонентів був гедеракозид С. Вміст гедеракозиду С коливався від 3807,7 (м. Сіракузи. Італія) до 79737,3 мкг/г (м. Варшава. Польща). Її вміст становив від 31 до 88 % від загальної кількості ідентифікованих тритерпенових сапонінів. Хлорогенова та 3,5-дикофеїлхінна кислоти були переважаючими сполуками у фенольних профілях усіх випробовуваних зразків листків плюща, їх кількість значно варіювалась від $(325,796 \pm 10,062)$ мкг/г до $(8630,058 \pm 12,517)$ мкг/г і від $(450,013 \pm 21,562)$ мкг/г до $(23866,566 \pm 863,267)$ мкг/г відповідно. Серед флавоноїдного профілю, в більшості зразків переважав гіперозид, його концентрації були в межах від $(45 \pm 1,2)$ мкг/г до $(4750,9 \pm 7,6)$ мкг/г.

4. Кожен із визначених компонентів було перевірено на антиоксидантний ефект за допомогою ВЕРХ/ABTS методу. Знайдені речовини проявляли від 85 до 97 % загальної активності аналізованих зразків. 3,5-дикофеїлхінна та хлорогенова кислоти мали найбільший вклад та за експериментальними даними чинили до 80 %. Активність інших речовин

можна розташувати у такому порядку: неохлорогенова кислота > гіперозид > 3,4-дикофеїлхінна кислота.

5. Методом ГХ-МС у листі плюща було ідентифіковано та виміряно вміст 7 амінокислот, із них 3 незамінні. Аланін було знайдено в усіх зразках, хоча його вміст варіювався від 0,925 (Сіракузи) до 14,440 мкг/г (Прага).

6. За допомогою кореляційного аналізу були встановлені параметри навколишнього середовища, які найбільше впливають на накопичення речовин в *H. helix*. А саме, накопичення тритерпенових сапонінів статистично достовірно (помірно негативно) залежало від тривалості сонячного світла, типу ґрунту та типу клімату. Оптимальні показники для накопичення тритерпенових сапонінів наступні — кількість сонячних годин 1600-1800 на рік, ґрунт лувізол та помірно вологий клімат (тип Dfb за класифікацією Кеппена). Подібні закономірності виявлено і для флавоноїдів за винятком того, що оптимальним типом ґрунту виявився альбувезол. На накопичення фенольних кислот серед усіх факторів впливав лише тип ґрунту, найбільший вміст БАР цієї групи виявлено у зразках рослин, що зростали на ґрунті лувізол. Загальний вміст амінокислот залежав здебільшого від клімату та кількості сонячних годин. Загальний вміст БАР у зразках, що були зібрані в північних регіонах Європи був вищим, ніж у зразках з південних регіонів. Найбільш перспективною для фармацевтичного виробництва виявилась сировина з Литви та Польщі. Отримані дані можуть бути корисними для створення фітогеографічного профілю листя плюща, що зі свого боку, дозволить покращити управління природними ресурсами і стратегіями вирощування та збору сировини *H. helix* із однорідним фотохімічним складом для забезпечення виробництва стандартизованої високоякісної продукції.

РОЗДІЛ 4

ВИВЧЕННЯ ХІМІЧНОГО СКЛАДУ ТА АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ ПРЕПАРАТІВ ПЛЮЩА ЗВИЧАЙНОГО. РОЗРОБКА ТА ОЦІНКА МЕТОДИК ДЛЯ СТАНДАРТИЗАЦІЇ НОВИХ ПРЕПАРАТІВ НА ОСНОВІ ЕКСТРАКТУ ЛИСТЯ ПЛЮЩА – КАПСУЛ «ГЕДЕРИН» ТА СИРОПУ «ГЕДЕРИН+»

4.1 Стандартизація лікарських засобів, що містять екстракт листя плюща звичайного

4.1.1 Визначення хімічного складу препаратів

Для пошуку речовин-маркерів у препаратах *H. helix* був застосован метод «хімічний відбиток пальців». Вона широко використовується науковцями світу завдяки своїй здатності до оцінки профілів різних рослинних препаратів [100]. Хроматографічне дослідження профілю фітокомпонентів забезпечує розширений аналіз із визначення як маркерів, так і вторинних метаболітів у препаратах, що містять рослинний екстракт. Цей підхід ухвалено US Food and Drug Administration (FDA), European Medicine Evaluation Agency (EMA) та State Food and Drug Administration of China [71, 97, 172]. Крім того, цей метод був успішно застосований у компонентному аналізі рослинних препаратів [101, 177, 179].

Для того щоб знайти речовини-маркери для лікарських засобів, що містять екстракт листя плюща звичайного, було визначено та кількісно виміряно 20 компонентів у різних ЛФ *H. helix*.

Також доцільно підтвердити наявність антиоксидантних властивостей препаратів плюща, оскільки, як вже відзначалось раніше, ЛЗ із таким ефектом мають певні переваги у лікуванні кашлю [143]. Останнім часом для визначення профілю компонентів та їх антиоксидантної активності застосовували ВЕРХ/ABTS метод [31, 112, 113, 140]. У той же час дослідження антиоксидантів у препаратах плюща звичайного за допомогою ВЕРХ/ABTS методу *in vitro* раніше не проводились.

Крім препаратів, було досліджено сухі екстракти листя плюща звичайного. Список усіх об'єктів аналізу наведений у розд. 2 табл. 2.1. Параметри аналізу хімічного складу наведені в *методиці 7* (розд. 2, п. 2.4).

Досліджувані розчини для аналізу ВЕРХ методом та вивчення антиоксидантної активності ВЕРХ/ABTS методом готувалися таким чином:

Випробовуваний розчин сухого екстракту листя плюща. 200 мг сухого екстракту поміщають в мірну колбу місткістю 20,0 мл, додають 15 мл метанолу *P* й витримують на УЗ-бані протягом 20 хвилин за кімнатної температури. Після охолодження розчину доводять його до позначки тим же розчинником та ретельно перемішують.

Випробовуваний розчин капсул, які містять сухий екстракт листя плюща. 400 мг вмісту капсул поміщають у мірну колбу місткістю 20,0 мл, додають 15 мл метанолу *P* й витримують на УЗ-бані протягом 20 хвилин за кімнатної температури. Після охолодження розчину його доводять до позначки тим же розчинником та ретельно перемішують.

Випробовуваний розчин сиропу, який містить сухий екстракт листя плюща. 8,0 мл сиропу переносять у мірну колбу місткістю 20,0 мл, додають 10 мл метанолу *P* й витримують на УЗ-бані протягом 20 хвилин за кімнатної температури. Після охолодження розчину його доводять до позначки тим же розчинником та ретельно перемішують.

Випробовуваний розчин крапель, які містять екстракт листя плюща. 2,0 мл крапель поміщають у мірну колбу місткістю 20,0 мл, додають 15 мл метанолу *P* й витримують на УЗ-бані протягом 20 хвилин за кімнатної температури. Після охолодження розчину його доводять до позначки тим же розчинником та ретельно перемішують.

Випробовуваний розчин таблеток, які містять сухий екстракт листя плюща. 400 мг порошку таблеток поміщають у мірну колбу місткістю 20,0 мл, додають 15 мл метанолу *P* й обробляють на УЗ-бані протягом 20 хвилин за кімнатної температури. Після охолодження розчину його доводять до позначки тим же розчинником та ретельно перемішують.

Метрологічні характеристики ВЕРХ методики для дослідження хімічного складу препаратів плюща наведені в розд. 3, табл. 3.18–3.20.

Стандартизація препаратів плюща звичайного включала визначення аналогічних компонентів у досліджуваних зразках. Застосований метод дозволив провести визначення 20 компонентів (зокрема, 4 тритерпенових сапонінів, 6 флавоноїдів та 10 фенольних кислот). Крім лікарських препаратів *H. helix* були проаналізовані сухі екстракти листя плюща звичайного.

Профілі фенольних кислот екстрактів були близькими, за винятком галової кислоти, що була відсутня у другому екстракті (табл. 4.1). Крім того, відрізнявся кількісний вміст інших компонентів. Серед усіх речовин кемпферол мав найбільше відхилення – понад 135,28 %, тоді як гедеракозид С найнижче – 7,18 %. Кількісні відмінності можна обумовити різницею походження сировини, технологією приготування або процесом сушіння.

Профілі всіх ЛФ були подібні до сухих екстрактів.

Фенольні речовини *H. helix* можуть сприяти деяким фармакологічним ефектам [68]. Профіль фенольних кислот був представлений галовою, неохлорогеновою, хлорогеновою, коричною, кофеїною, 3,5-дикофеїлхінною, 3,4-дикофеїлхінною, 4,5-дикофеїлхінною та криптохлорогеновою кислотами (табл. 4.1, рис. 4.1). Переважно всі вони були знайдені в кожному зразку, за винятком галової, коричневої та кофеїнової кислот. Середні концентрації всіх кислот значно варіювалися. Хлорогенова та 4,5-дикофеїлхінна кислоти мали найвищі значення і становили близько 60 % від загального вмісту фенольних кислот.

Профіль флавоноїдів складався з таких речовин: рутин, гіперозид, ізокверцитрин, 6-7-дигідроксіізофлавіон, кверцетин, кемпферол, нікотифлорин (табл. 4.2, рис. 4.1). Гіперозид був знайдений у всіх зразках. Лише у сиропі «Гедерин+» не були виявлені рутин та ізокверцитрин.

Вміст тритерпенових сапонінів переважав у всіх зразках (табл. 4.3, рис. 4.2). Їх загальна кількість становила близько 80 % у кожному зразку. Переважно, кількісний вміст тритерпенових сапонінів розташовувався в

такому порядку: гедеракозид С > гедеракозид D > α-гедерин > гедерасапонін В. Гедеракозид С мав найбільший вміст серед усіх сапонінів.

Калію сорбат був знайдений у деяких зразках за УФ-спектром. Він не був кількісно визначений під час хімічного дослідження препаратів плюща звичайного, оскільки був знайдений лише в деяких препаратах, а саме: у сиропях «Гелітуспан», «Проспан», «Гедерин» та «Гедерин+».

Основні компоненти, що відповідають за антиоксидантну активність, представлені в табл. 4.4. Визначені компоненти відповідають за 92-100 % антиоксидантної активності в зразку. Серед усіх компонентів неохлорогенова та хлорогенова кислоти разом з гіперозидом були присутні майже в кожному зразку з високими показниками антиоксидантної активності. Крім того, 3,4-дикофеїлхінна та 4,5-дикофеїлхінна кислоти мали значну активність, однак вони були знайдені лише в сухих екстрактах, капсулах та краплях від кашлю.

Відповідно до отриманих результатів аналізу рослинної сировини та препаратів плюща звичайного як речовини-маркери запропоновано використовувати хлорогенову кислоту, гіперозид та гедеракозид С. Такий вибір пояснюється їх високим вмістом у всіх зразках та фармакологічними властивостями, які будуть вигідно доповнювати одна одну в лікуванні бронхітів.

Таблиця 4.1

Вміст фенольних кислот у лікарських засобах плюща звичайного

Об'єкт	Галова кислота	Неохлорогенова кислот	Кислота хлорогенова	Корична кислота	Кофейна кислота	3,5 – дикофеїл-хінна кислота	3,4- дикофеїл-хінна кислота	4,5- дикофеїл-хінна кислота	Криптохлорогенова кислота
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C1 ¹	8,24 ±0,24	112,03 ±3,41	506,87 ±13,42	0,34 ±0,01	7,60 ±0,17	178,61 ±8,89	283,50 ±14,07	560,31 ±25,97	144,27 ±7,19
C2 ¹	7,94 ±0,19	102,59 ±3,24	482,22 ±11,42	0,51 ±0,01	6,67 ±0,12	172,17 ±8,57	273,87 ±13,58	540,65 ±26,08	138,34 ±6,29
C3 ¹	8,23 ±0,16	109,47 ±2,57	496,13 ±8,65	0,30 ±0,01	7,15 ±0,17	175,93 ±8,47	278,51 ±13,73	560,20 ±27,65	140,96 ±7,01
C4 ¹	8,04 ±0,24	108,30 ±1,45	491,40 ±14,57	0,33 ±0,01	7,19 ±0,19	173,60 ±8,59	274,78 ±13,50	544,86 ±26,32	139,30 ±6,86
C5 ¹	8,70 ±0,34	105,81 ±2,57	494,59 ±14,92	0,56 ±0,02	6,93 ±0,16	178,35 ±8,87	279,81 ±13,72	569,47 ±27,61	143,82 ±7,07
S1 ²	0,36 ±0,01	15,06 ±0,37	364,80 ±14,82	0,52 ±0,02	5,30 ±0,15	16,21 ±0,76	32,12 ±1,27	43,66 ±1,40	20,21 ±0,89
S2 ²	н/в	8,75 ±0,31	124,06 ±3,62	1,03 ±0,01	2,82 ±0,11	6,53 ±0,29	34,11 ±1,68	38,07 ±1,87	36,76 ±1,82
S3 ²	0,42 ±0,01	4,27 ±0,15	14,16 ±0,57	0,59 ±0,02	0,67 ±0,01	2,49 ±0,12	2,62 ±0,11	6,06 ±0,27	15,28 ±0,69
S4 ²	0,90 ±0,03	36,82 ±0,91	116,38 ±3,17	н/в	2,40 ±0,04	33,64 ±1,42	51,24 ±2,43	72,12 ±2,86	64,62 ±3,07

Продовж. табл. 4.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
S5 ²	н/в	23,23 ±0,91	99,40 ±2,79	0,40 ±0,01	н/в	8,90 ±0,39	17,38 ±0,74	11,03 ±0,43	28,30 ±1,24
S6 ²	н/в	17,28 ±0,38	25,31 ±0,83	н/в	н/в	4,62 ±0,22	1,71 ±0,06	4,42 ±0,17	15,07 ±0,63
EF ³	н/в	91,86 ±4,56	1177,73 ±29,57	2,96 ±0,12	10,13 ±0,28	10,22 ±0,48	17,06 ±0,73	39,20 ±1,86	33,91 ±1,57
D ⁴	2,76 ±0,07	126,33 ±6,29	745,90 ±24,37	1,45 ±0,03	4,40 ±0,16	118,31 ±54,98	262,20 ±13,08	328,47 ±16,42	123,22 ±6,14
E1 ⁵	86,31 ±2,65	2145,15 ±54,52	10539,29 ±234,69	0,21 ±0,01	146,35 ±2,57	1489,07 ±73,68	2151,32 ±105,76	4700,32 ±219,57	3698,14 ±179,36
E2 ⁵	н/в	2668,71 ±33,51	12279,99 ±361,59	21,70 ±0,82	н/в	3431,72 ±164,34	5348,11 ±263,44	11028,1 ±541,29	2842,09 ±137,83

¹ – кількість речовини (мкг) в капсулі

² – кількість речовини (мкг) в 1 мл сиропу

³ – кількість речовини (мкг) в таблетці

⁴ – кількість речовини (мкг) в 1 мл крапель від кашлю

⁵ – кількість речовини (мкг) в 1 г сухого екстракту

Таблиця 4.2

Вміст флавоноїдів у лікарських засобах плюща звичайного

Об'єкт	6-7-дигідрокси ізофлавіон	Кверцетин	Кемпферол	Рутин	Гіперозид	Ізокверцитрин	Нікотифлорин
C1 ¹	н/в	49,44±1,74	7,46±0,27	6,45±0,23	410,00±6,21	9,25±0,25	17,09±0,82
C2 ¹	н/в	48,85±1,24	7,23±0,24	9,20±0,14	396,98±12,94	9,96±0,34	17,15±0,83
C3 ¹	н/в	48,57±1,58	7,23±0,25	9,45±0,27	398,39±17,21	10,06±0,35	16,87±0,78
C4 ¹	н/в	48,38±1,31	7,19±0,22	9,28±0,14	395,99±15,79	10,14±0,38	17,00±0,75
C5 ¹	н/в	49,12±1,54	7,35±0,29	9,46±0,34	403,39±16,09	8,48±0,24	16,68±0,82
S1 ²	н/в	8,00±0,24	1,00±0,02	4,90±0,15	243,50±6,24	1,80±0,04	н/в
S2 ²	н/в	9,39±0,27	0,13±0,01	9,39±0,19	49,49±2,46	3,70±0,12	н/в
S3 ²	0,16±0,01	н/в	н/в	2,78±0,11	27,84±1,38	0,76±0,02	н/в
S4 ²	0,22±0,01	н/в	2,61±0,06	6,81±0,24	47,02±2,34	4,76±0,13	н/в
S5 ²	н/в	н/в	н/в	8,92±0,26	10,43±0,51	5,00±0,14	н/в
S6 ²	н/в	н/в	н/в	н/в	2,89±0,05	н/в	н/в
EF ³	н/в	4,86±0,11	н/в	16,67±0,34	540,55±13,89	9,33±0,27	н/в
D ⁴	н/в	н/в	0,19±0,01	15,10±0,23	746,83±18,25	3,50±0,09	2,54±0,05
E1 ⁵	н/в	897,15±24,57	133,32±2,57	176,42±3,81	7752,61±18,36	190,46±5,39	54,49±2,69
E2 ⁵	н/в	56,24±1,82	2,96±0,11	222,97±4,41	9894,44±174,29	104,58±2,59	322,63±16,11

Таблиця 4.3

Вміст тритерпенових сапонінів у лікарських засобах плюща звичайного

Об'єкт	Гедеракозид С	α -гедерин	Гедерасапонін В	Гедеракозид D
C1 ¹	7538,71±124,53	570,89±14,45	289,18±14,37	1100,83±55,01
C2 ¹	7318,19±204,90	545,86±13,97	289,24±13,76	1021,70±51,03
C3 ¹	7398,19±200,14	545,96±19,37	297,03±14,08	976,92±47,69
C4 ¹	7250,34±214,13	530,10±15,06	283,47±14,08	1037,91±51,29
C5 ¹	7447,41±253,24	555,93±19,74	261,14±13,01	946,86±46,53
S1 ²	3246,50±103,56	277,00±11,58	24,44±1,20	150,88±7,34
S2 ²	4396,71±164,28	173,37±6,57	140,40±76,57	663,05±32,53
S3 ²	4673,64±121,86	203,29±64,01	137,38±6,76	524,80±24,93
S4 ²	3011,80±59,01	104,16±3,82	89,19±4,39	423,29±21,08
S5 ²	1287,33±35,46	33,46±0,84	57,30±2,73	174,40±8,27
S6 ²	622,57±18,58	н/в	14,31±0,68	21,56±1,01
EF ³	8303,67±324,45	560,35±16,07	27,96±1,13	114,68±5,14
D ⁴	5477,85±108,37	634,65±17,57	243,50±12,37	1237,32±61,27
E1 ⁵	139433,64±852,86	10505,21±26,26	3612,05±176,35	26441,31±1324,07
E2 ⁵	114994,08±749,04	8426,40±124,23	5718,13±278,39	19807,03±986,53

Таблиця 4.4

Значення еквівалента тролоксу антиоксидантної активності окремих речовин у лікарських засобах плюща звичайного

Зразок	Неохлорогенова кислот	Кислота хлорогенова	Криптохлорогенова кислота	Гіперозид	3,4- дикофеїлхінна кислота	4,5- дикофеїлхінна кислота
1	2	3	4	5	6	7
C1 ¹	120,23 $\pm 5,87 \times 10^{-3}$	546,68 $\pm 27,31 \times 10^{-3}$	75,91 $\pm 3,67 \times 10^{-3}$	345,03 $\pm 17,09 \times 10^{-3}$	362,67 $\pm 18,08 \times 10^{-3}$	637,86 $\pm 30,98 \times 10^{-3}$
C2 ¹	110,21 $\pm 5,29 \times 10^{-3}$	520,62 $\pm 25,89 \times 10^{-3}$	72,50 $\pm 3,53 \times 10^{-3}$	334,41 $\pm 16,69 \times 10^{-3}$	346,41 $\pm 17,87 \times 10^{-3}$	609,27 $\pm 29,53 \times 10^{-3}$
C3 ¹	116,40 $\pm 5,79 \times 10^{-3}$	530,18 $\pm 25,86 \times 10^{-3}$	73,39 $\pm 3,59 \times 10^{-3}$	332,18 $\pm 16,59 \times 10^{-3}$	350,64 $\pm 17,49 \times 10^{-3}$	616,70 $\pm 29,97 \times 10^{-3}$
C4 ¹	114,60 $\pm 5,71 \times 10^{-3}$	522,56 $\pm 26,07 \times 10^{-3}$	72,43 $\pm 3,61 \times 10^{-3}$	328,56 $\pm 16,26 \times 10^{-3}$	346,04 $\pm 17,19 \times 10^{-3}$	608,62 $\pm 30,17 \times 10^{-3}$
C5 ¹	114,50 $\pm 5,49 \times 10^{-3}$	537,88 $\pm 26,81 \times 10^{-3}$	74,67 $\pm 3,57 \times 10^{-3}$	342,29 $\pm 17,06 \times 10^{-3}$	356,77 $\pm 17,76 \times 10^{-3}$	627,48 $\pm 31,29 \times 10^{-3}$
S1 ²	77,56 $\pm 3,76 \times 10^{-3}$	518,25 $\pm 25,13 \times 10^{-3}$	29,17 $\pm 1,39 \times 10^{-3}$	270,28 $\pm 13,27 \times 10^{-3}$	н/в	н/в
S2 ²	56,56 $\pm 2,13 \times 10^{-3}$	187,20 $\pm 9,27 \times 10^{-3}$	31,24 $\pm 1,57 \times 10^{-3}$	41,65 $\pm 1,98 \times 10^{-3}$	н/в	н/в
S3 ²	н/в	н/в	н/в	24,20 $\pm 1,18 \times 10^{-3}$	н/в	н/в
S4 ²	22,73 $\pm 1,10 \times 10^{-3}$	43,40 $\pm 2,11 \times 10^{-3}$	9,53 $\pm 0,39 \times 10^{-3}$	40,72 $\pm 1,79 \times 10^{-3}$	н/в	н/в

Продовж. табл. 4.4

1	2	3	4	5	6	7
S5 ²	1,35 $\pm 0,05 \times 10^{-3}$	16,03 $\pm 0,78 \times 10^{-3}$	1,56 $\pm 0,05 \times 10^{-3}$	9,09 $\pm 0,43 \times 10^{-3}$	н/в	н/в
S6 ²	0,50 $\pm 0,01 \times 10^{-3}$	0,85 $\pm 0,03 \times 10^{-3}$	н/в	н/в	н/в	н/в
EF ³	98,59 $\pm 4,87 \times 10^{-3}$	993,98 $\pm 47,38 \times 10^{-3}$	н/в	588,83 $\pm 29,37 \times 10^{-3}$	н/в	н/в
D ⁴	135,58 $\pm 6,76 \times 10^{-3}$	762,87 $\pm 31,59 \times 10^{-3}$	64,83 $\pm 3,05 \times 10^{-3}$	356,63 $\pm 17,78 \times 10^{-3}$	335,42 $\pm 16,75 \times 10^{-3}$	373,94 $\pm 18,58 \times 10^{-3}$
E1 ⁵	3029,3 $\pm 149,83 \times 10^{-3}$	22426,51 $\pm 986,39 \times 10^{-3}$	2268,17 $\pm 112,58 \times 10^{-3}$	8865,86 $\pm 441,93 \times 10^{-3}$	10049,89 $\pm 499,95 \times 10^{-3}$	17104,79 $\pm 850,98 \times 10^{-3}$
E2 ⁵	3935,3 $\pm 195,58 \times 10^{-3}$	16627,51 $\pm 825,57 \times 10^{-3}$	2801,39 $\pm 138,09 \times 10^{-3}$	10839,36 $\pm 538,86 \times 10^{-3}$	2830,14 $\pm 140,48 \times 10^{-3}$	5993,07 $\pm 297,53 \times 10^{-3}$

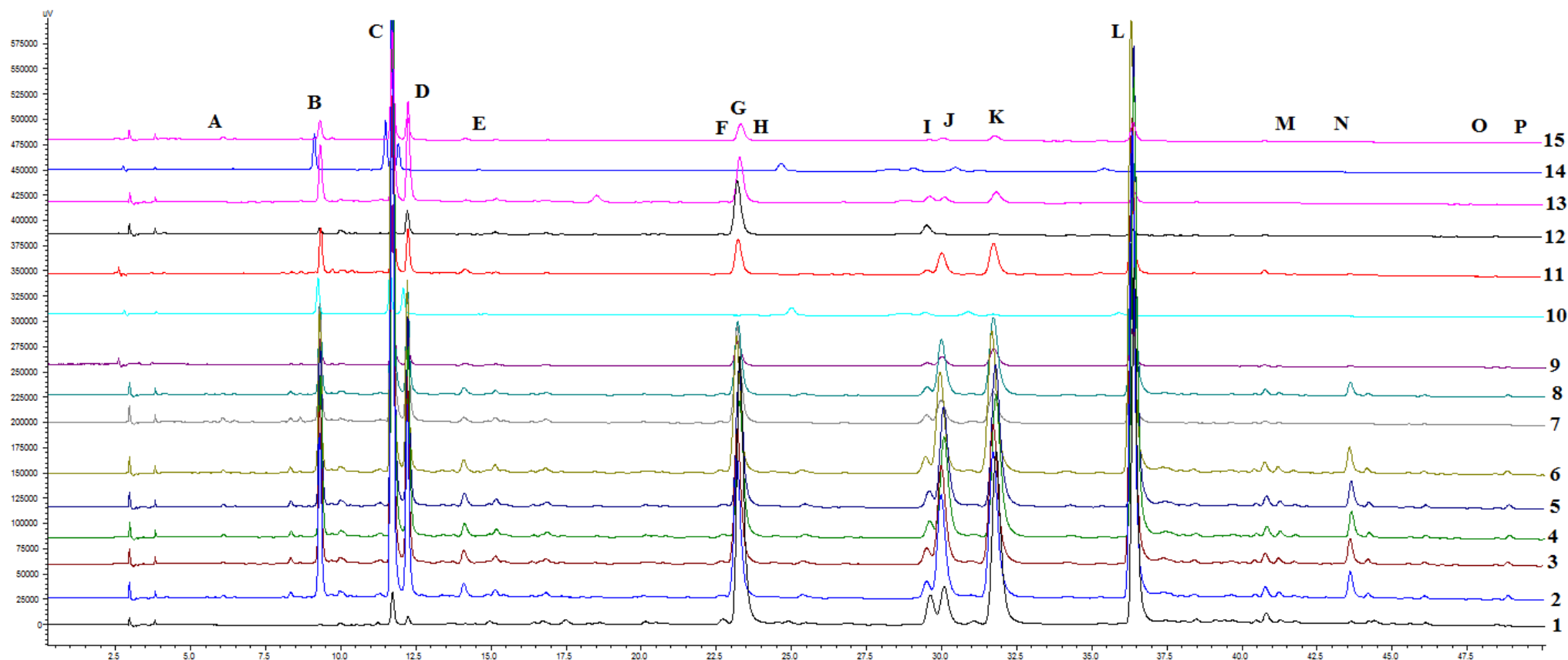


Рис. 4.1. Типові ВЕРХ хроматограми дослідження хімічного складу лікарських засобів плюща звичайного, детектованих за довжини хвилі 325 нм (1 – D, 2 – C1, 3 – C2, 4 – C3, 5 – C4, 6 – C5, 7 – E1, 8 – E2, 9 – S1, 10 – S5, 11 – S4, 12 – S3, 13 – EF, 14 – S2, 15 – S5): А – галова кислота, В – неохлорогенова кислота, С – хлорогенова кислота, D – криптохлорогенова кислота, Е – кофейна кислота, F – рутин, G – гіперозид, Н – ізокверцитрин, І – 3,5-дикофеїлхінна кислота, J – нікотифлорин, К – 3,4-дикофеїлхінна кислота, L – 4,5-дикофеїлхінна кислота, М – кверцетин, N – корична кислота, О – 6-7-дигідрокси ізофлавіон, Р – кемпферол

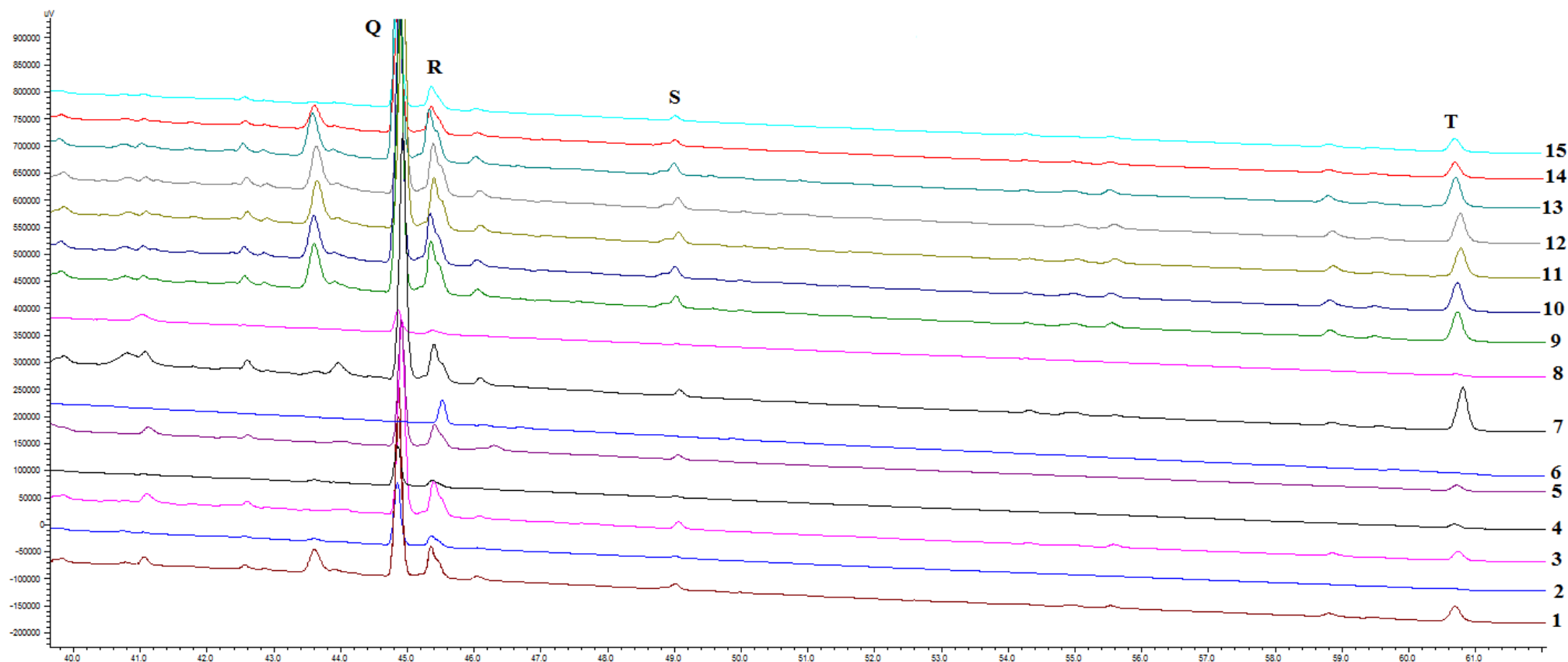


Рис. 4.2. Типові ВЕРХ хроматограми дослідження хімічного складу препаратів плюща звичайного, детектованих за довжини хвилі 210 нм (1 – S1, 2 – S5, 3 – S2, 4 – S5, 5 – S4, 7 – D, 8 – EF, 9 – C1, 10 – C2, 11 – C3, 12 – C4, 13 – C5, 14 – E2, 15 – E1): Q – гедеракозид С, R – гедеракозид D, S – гедераспонін В, Т – α -гедерин

4.1.2 Дослідження подібності лікарських засобів за результатами ВЕРХ методики

Подібності між препаратами ґрунтувалися на всіх визначених компонентах. Коефіцієнти кореляції зразків наведені в табл. 4.5. Отримані результати свідчать, що всі зразки мають високу подібність, оскільки всі вони мають досить подібні профілі компонентів. Усі значення знаходилися в діапазоні 0,973-0,999, що демонструє високий ступінь кореляції між зразками. Це пояснюється тим, що загальний профіль речовин є в усіх зразках незалежно від виробників та лікарських форм.

Подібність серед ЛЗ різних виробників вивчалася на рідкій ЛФ – сиропах, оскільки лише в них є однакова кількість екстракту *H. helix* (7 мг). Розрахований показник RSD за вмістом кожного компонента значно відрізнявся. Зокрема, найнижча виявлена різниця становила 18,12% для гедеракозиду С, а найвища – 147,89% для галової кислоти. Можливе пояснення отриманих даних полягає в тому, що рослинна сировина та деякі виробничі процеси були різними. Проте, відносно високі коефіцієнти подібності вказують на схожу якість лікарських форм усіх виробників.

Також внутрішньовиробнича подібність була оцінена для п'яти серій капсул «Гедерин». Схожість значень для п'яти партій була високою (0,999), що свідчить про високу відтворюваність технологічного процесу. Тобто вміст речовин залежно від різних серій для препаратів *H. helix* був прийнятним.

Також ієрархічні кластерні аналізи були використані для оцінки подібності зразків за вмістом компонентів (рис. 4.3–4.5).

Кластеризація за фенольними кислотами об'єднала усі зразки у три групи (рис. 4.3). Вміст хлорогенової кислоти в кластерах знаходився у такому порядку: кластер III > кластер I > кластер II. Третій кластер представлений лише таблетками «Проспан», оскільки він мав найвищу кількість хлорогенової кислоти – $(1177,73 \pm 29,57)$ мкг, незважаючи на низький вміст інших кислот, які знаходились у межах від $(2,96 \pm 0,12)$ до $(39,20 \pm 1,86)$ мкг. Другий кластер складається з капсул «Гедерин» і крапель «Геделікс». Вони містили найбільшу

кількість інших фенольних кислот: галової, неохлорогенової, коричнеї, кофейної, 3,5-дикофеїлхінної, 3,4-дикофеїлхінної, 4,5-дикофеїлхінної, криптохлорогенової: кислот в середньому ($7,32 \pm 2,25$), ($110,76 \pm 8,28$), ($0,58 \pm 0,48$), ($6,66 \pm 1,14$), ($166,16 \pm 23,58$), ($517,33 \pm 93,14$), ($138 \pm 7,67$) мкг відповідно. III кластер поєднав усі сиропи і мав найнижчі концентрації всіх виявлених фенольних кислот.

Кластерний аналіз виконаний за вмістом флавоноїдів, виявив три кластери (рис. 4.4). Гіперозид був домінантним компонентом і впливав на групування. Таким чином, II кластер показав найбільший вміст ($540,55 \pm 13,89$) мкг і складався з таблеток «Проспан». Третій кластер характеризувався найнижчою концентрацією – в середньому ($294,25 \pm 27,54$) мкг. Цей кластер складається із сиропів («Гелітуспан», «Проспан», «Гербіон», «Гедерина», «Гедерина+»). Кількість гіперозиду в кластері I становила в середньому ($398,40 \pm 85,99$) мкг.

Кластеризація зразків за кількістю тритерпенових сапонінів згрупувала їх у два кластери (рис. 4.5). Кластер I був представлений капсулами «Гедерин» і таблетками «Проспан». Усі вони мали найвищий вміст сапонінів, а саме: гедеракозиду C, α -гедерину, гедерасапоніну B, гедеракозиду D у середніх концентраціях ($7529,42 \pm 393,29$), ($551,50 \pm 14,11$), ($243,67 \pm 87,10$) та ($866,48 \pm 272,09$) мкг, відповідно. З іншого боку, кластер II мав найнижчі значення.

Відповідно до отриманих результатів не спостерігалось суттєвої різниці серед інших препаратів *H. helix*. За отриманими даними можна зробити висновок, що препарати мають відносно однорідний компонентний склад. Однак кількісний вміст компонентів варіювався залежно від виробника. Тому, визначення декількох речовин-маркерів для стандартизації препаратів *H. helix* дозволить забезпечити пацієнтів ефективними та безпечними ЛЗ. Такий підхід може стати потужним інструментом для забезпечення якості препаратів плюща звичайного.

Таблиця 4.5

Порівняння подібності лікарських засобів плюща звичайного за визначеними компонентами*

	C1	C2	C3	C4	C5	S1	S2	S3	S4	S5	S6	EF	D
C1		0,999	0,999	0,999	0,999	0,990	0,995	0,993	0,996	0,995	0,989	0,982	0,993
C2	0,999		0,999	0,999	0,999	0,990	0,995	0,994	0,996	0,995	0,989	0,983	0,992
C3	0,999	0,999		0,999	0,999	0,990	0,994	0,993	0,996	0,994	0,99	0,983	0,992
C4	0,999	0,999	0,999		0,999	0,990	0,995	0,993	0,996	0,995	0,989	0,983	0,993
C5	0,999	0,999	0,999	0,999		0,991	0,994	0,993	0,996	0,994	0,990	0,984	0,991
S1	0,990	0,990	0,990	0,990	0,991		0,987	0,988	0,988	0,991	0,991	0,999	0,983
S2	0,995	0,995	0,994	0,995	0,994	0,987		0,999	0,999	0,998	0,992	0,979	0,988
S3	0,993	0,994	0,993	0,993	0,993	0,988	0,999		0,999	0,997	0,994	0,981	0,982
S4	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,988	0,999	0,999		0,998	0,994	0,98	0,987
S5	0,995	0,995	0,994	0,995	0,994	0,991	0,998	0,997	0,998		0,995	0,986	0,989
S6	0,989	0,989	0,990	0,989	0,990	0,991	0,992	0,994	0,994	0,995		0,988	0,973
EF	0,982	0,983	0,983	0,983	0,984	0,999	0,979	0,981	0,98	0,986	0,988		0,976
D	0,993	0,992	0,992	0,993	0,991	0,983	0,988	0,982	0,987	0,989	0,973	0,976	

* - розшифровка позначень наведена у р. 2, п. 2.1, табл. 2.1

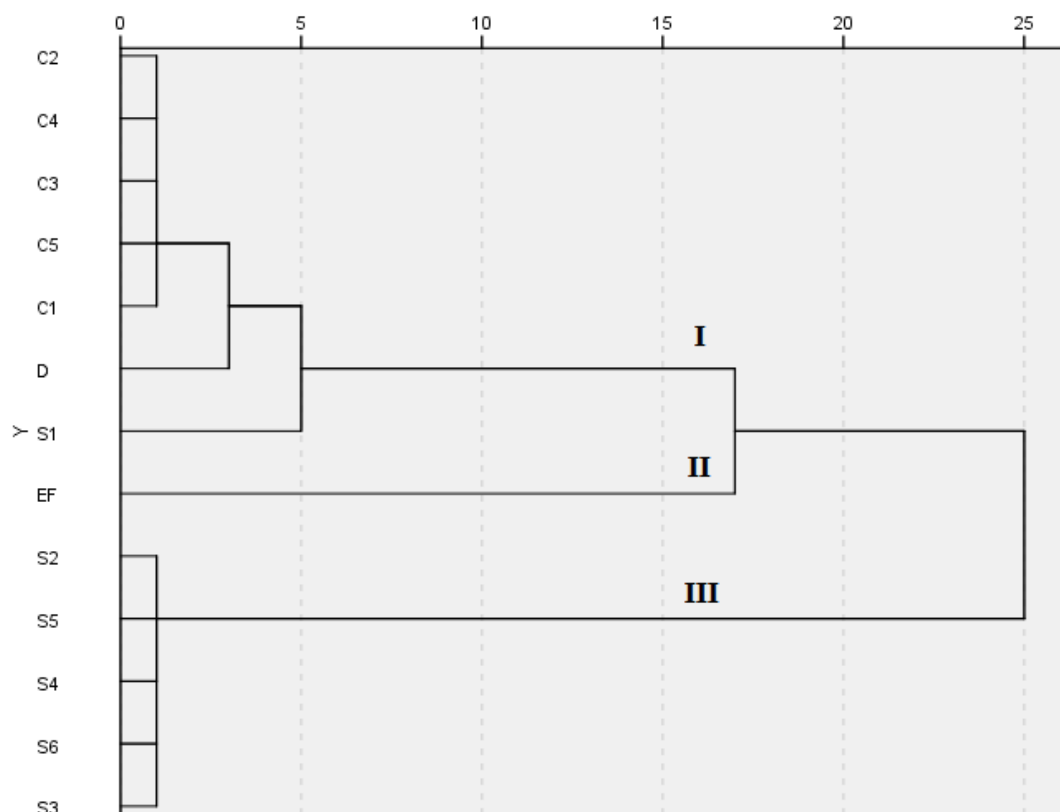


Рис. 4.3. Дендограма ієрархічного кластерного аналізу зразків препаратів *H. helix* на основі фенольних кислот

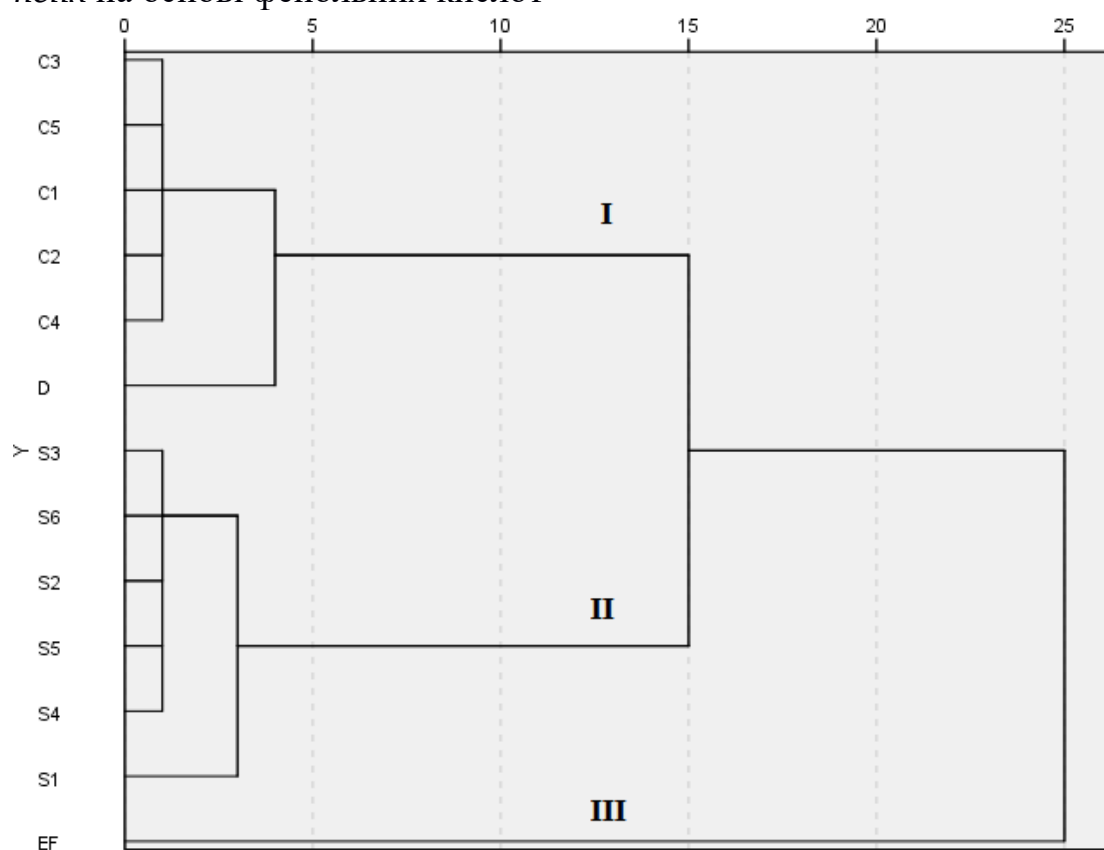


Рис. 4.4. Дендограма ієрархічного кластерного аналізу зразків препаратів *H. helix* на основі флавоноїдів

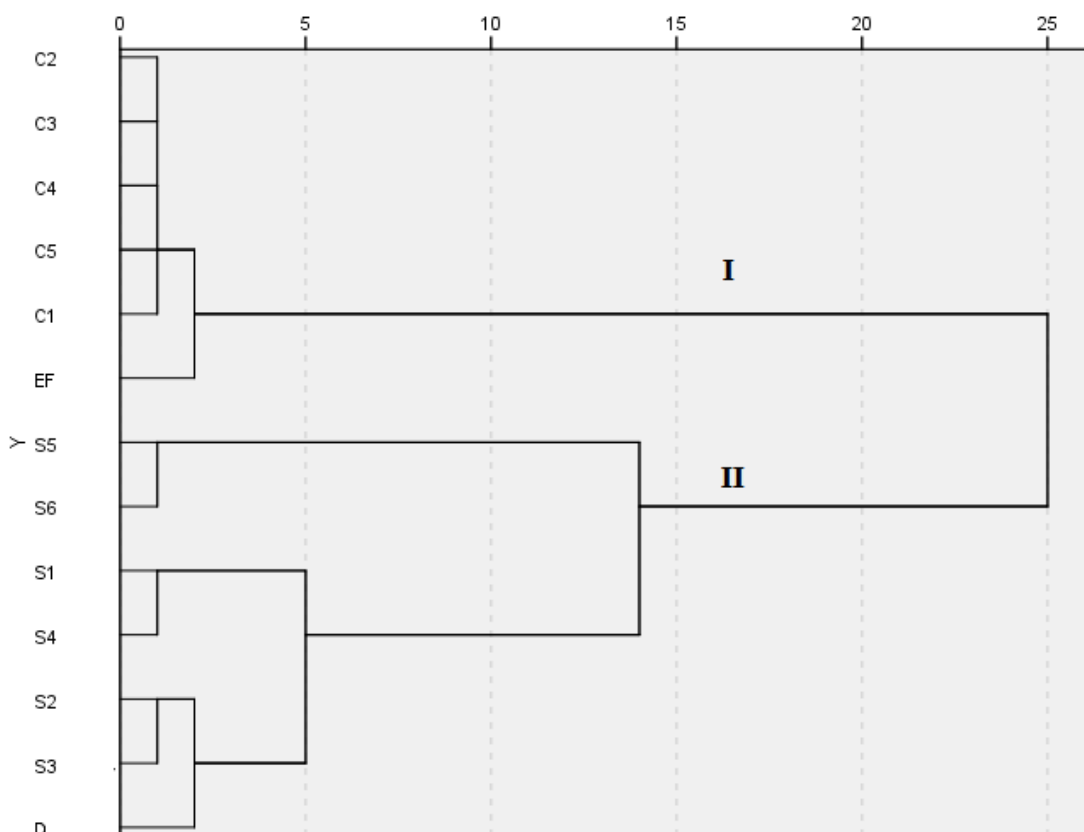


Рис. 4.5. Дендограма ієрархічного кластерного аналізу зразків препаратів *H. helix* на основі тритерпенових сапонінів

4.2 Дослідження нових лікарських засобів капсул «Гедерин» та сироп «Гедерин+» з використанням ВЕРХ, УВЕРХ та ВЕТШХ методик

4.2.1 Аналіз сухого екстракту листя плюща звичайного та капсул із сиропом на його основі

Технологічна схема виробництва капсул «Гедерин» та сироп «Гедерин+» передбачає використання сухого екстракту плюща звичайного. Відповідно до ДФУ та ЄФ для підтвердження якості ЛЗ на основі екстракту листя плюща необхідно проводити кількісне визначення гедеракозиду С. Екстракти *H. helix* входять до складу різних ЛФ: таблеток, сиропів, крапель, капсул, які мають різний склад допоміжних речовин. Тому розроблені методи мають бути досить специфічними і точними для проведення стандартизації різних ЛФ. Крім того, підприємство широко впроваджує принципи «зеленої хімії», тому одним із завдань було обрання методики, що характеризується найменшим впливом на навколишнє середовище та виробничий персонал, найменшою кількістю відходів та найнижчою собівартістю.

Для досліджень були використані ВЕРХ та УВЕРХ методи, які було розроблено для кількісного визначення гедеракозиду С у сировині плюща звичайного за наведеними *методиками 4 та 5* відповідно (розд. 2, п. 2.4).

Крім того, ми досліджували перспективи застосування ВЕТШХ, що в деяких випадках має певні переваги порівняно з ВЕРХ, а саме: коротший час аналізу, менша кількість рухомої фази, необхідної для проведення аналізу, мінімізація перешкод від попереднього аналізу, а також можливість аналізу зразків і стандартів, які можуть бути одночасно проаналізовані за тих самих умов, що забезпечує кращу аналітичну точність та відтворюваність [130]. Для кількісного визначення гедеракозиду С було використано ВЕТШХ метод за *методикою 6* (розд. 2, п. 2.4). Порівняння методів (ВЕРХ, УВЕРХ та ВЕТШХ) проводили під час аналізу екстрактів, капсул та сиропу. Методи були валідовані відповідно до вимог Міжнародної конференції з гармонізації [18] та ДФУ [7].

Оптимізація рухомих фаз наведена в розд. 3, п. 3.3. Для аналізу випробовуваних зразків застосовувалися різні колонки: ACE C18 (150 × 4,6 мм, з розміром часток 5 мкм) та Eclipse XDB – C18 (150 × 4,6 мм, з розміром часток 5 мкм). Найкраще розділення було досягнуто за допомогою колонки ACE C18. Час утримування гедеракозиду С становив близько 15,9 хвилин для ВЕРХ методу (рис. 4.6). Розраховані кількості речовин наведені в табл. 4.6.

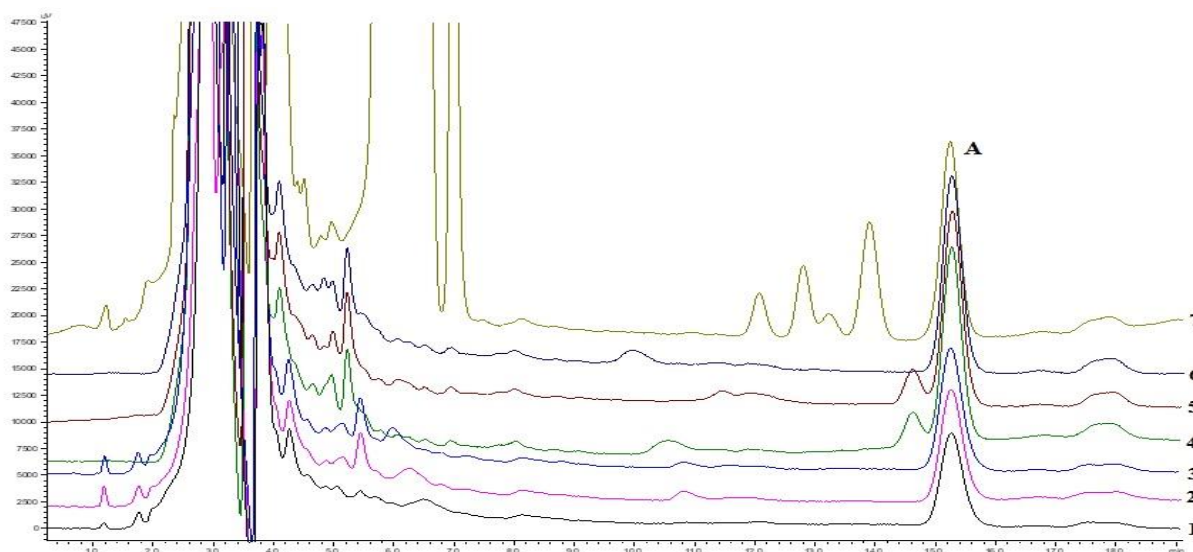


Рис. 4.6. ВЕРХ хроматограми досліджуваних зразків (А – гедеракозид С, 1-3 – екстракти (три різні серії), 4-6 – капсули (три різні серії), 7 – сироп)

Застосування УВЕРХ методики дозволило скорити час дослідження. Однак під час аналізу сиропу не спостерігалось розділення між гедеракозидом С та іншим компонентом (рис. 4.7), тому необхідно було підвищити специфічність методики.

Сиропні матриці – це складні суміші різноманітних допоміжних речовин, таких як розріджувачі, солюбілізатори, консерванти. Уведення всіх цих компонентів у хроматографічну систему може призвести до зниження специфічності визначення, погіршення ефективності колонки, розщеплення форми піків та сильного скорочення терміну експлуатації колонок, особливо УВЕРХ колонок, де розмір частинок сорбенту становить менше 2 мкм.

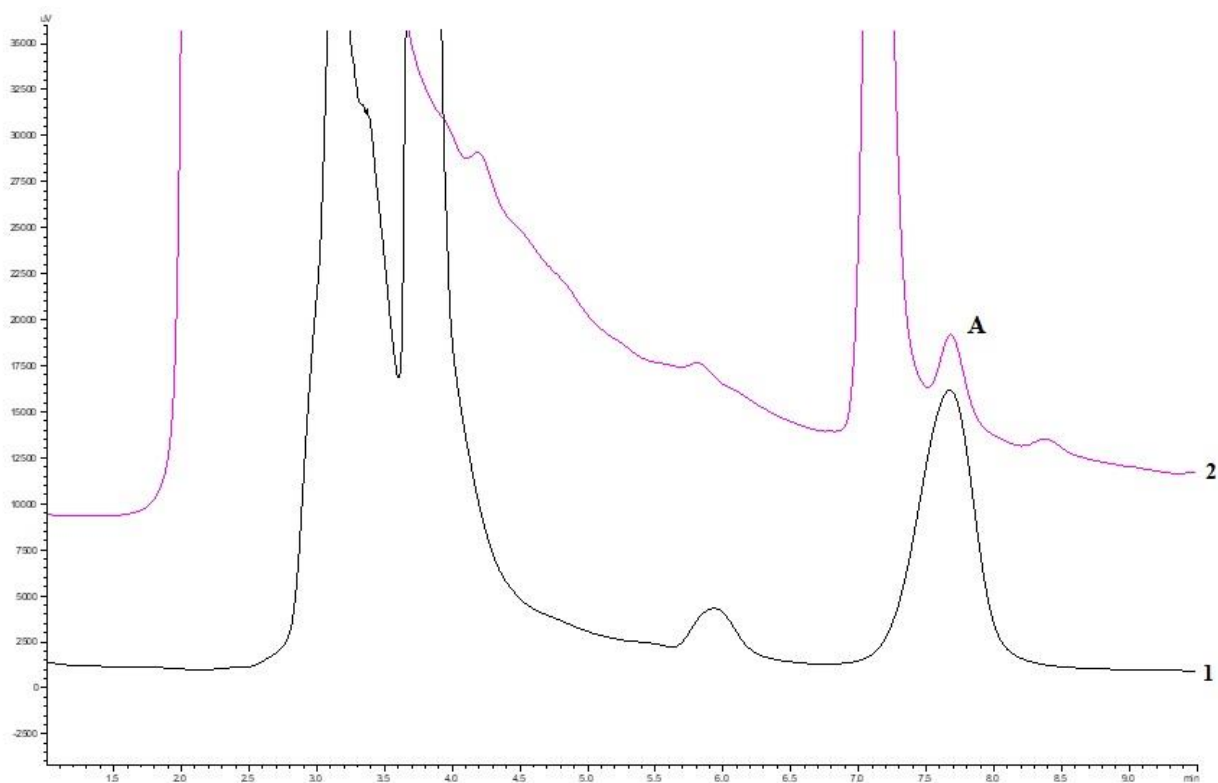


Рис. 4.7. Хроматограми зразків сиропу з використанням твердофазної екстракції (1) та без (2)

Оскільки пробопідготовка відіграє важливу роль у проведенні аналізу, то для методу УВЕРХ її було змінено. Так, для видалення допоміжних речовин з матриці застосували твердофазну екстракцію, що дозволило б забезпечити більшу специфічність. Крім того, раніше не повідомлялось про жодний

аналітичний метод, що використовує твердофазну екстракцію для визначення гедеракозиду С. Запропонований метод показав прийнятне розділення речовин (рис. 4.7).

Хроматограми деяких проаналізованих зразків показані на рис. 4.8. Розділення між гедеракозидом С та іншими компонентами було задовільним, а коефіцієнт розділення був більше за 2 у всіх досліджуваних розчинах. Розраховані кількості за методом УВЕРХ наведені в табл. 4.6.

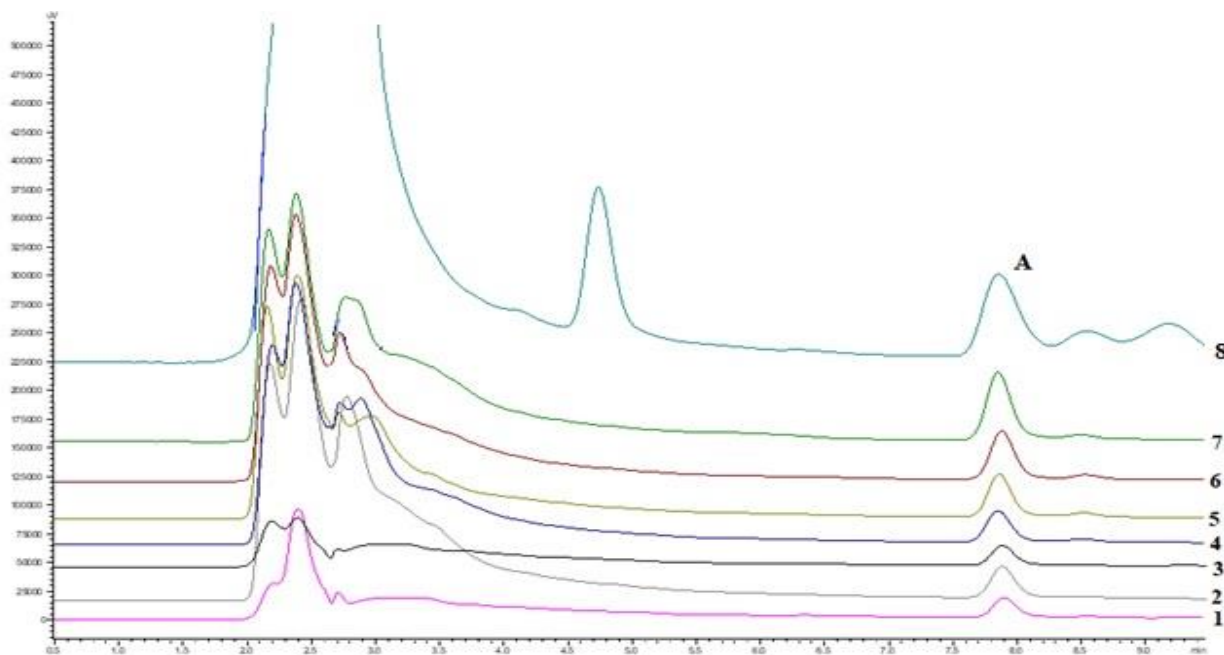


Рис. 4.8. Хроматограми аналізованих зразків методом УВЕРХ: 1 – стандарт гедеракозиду С, 2-4 – екстракт, 5-7 – капсули, 8 – сироп

Для ідентифікації гедеракозиду С ЄФ та ДФУ пропонують використовувати метод ТШХ. Тому умови цієї методики були перенесені на ВЕТШХ пластини. Метод має певні переваги, зокрема скорочення часу дослідження, що досить доцільно для виробників у разі аналізу великої кількості серій лікарських засобів. Проте, під час аналізу сиропу виникли деякі складнощі. Для очищення аналізованого зразка застосували твердофазну екстракцію. Для елюювання компонентів було перевірено різні розчини, серед них *метанол Р* та його суміші з *водою Р* (60 та 80 %), а також *ацетонітрил Р* та його суміші з *водою Р* (60 та 80%). Найкращим виявився *метанол Р*. Результати, отримані під час дослідження, наведені на рис. 4.9 і в табл. 4.6.

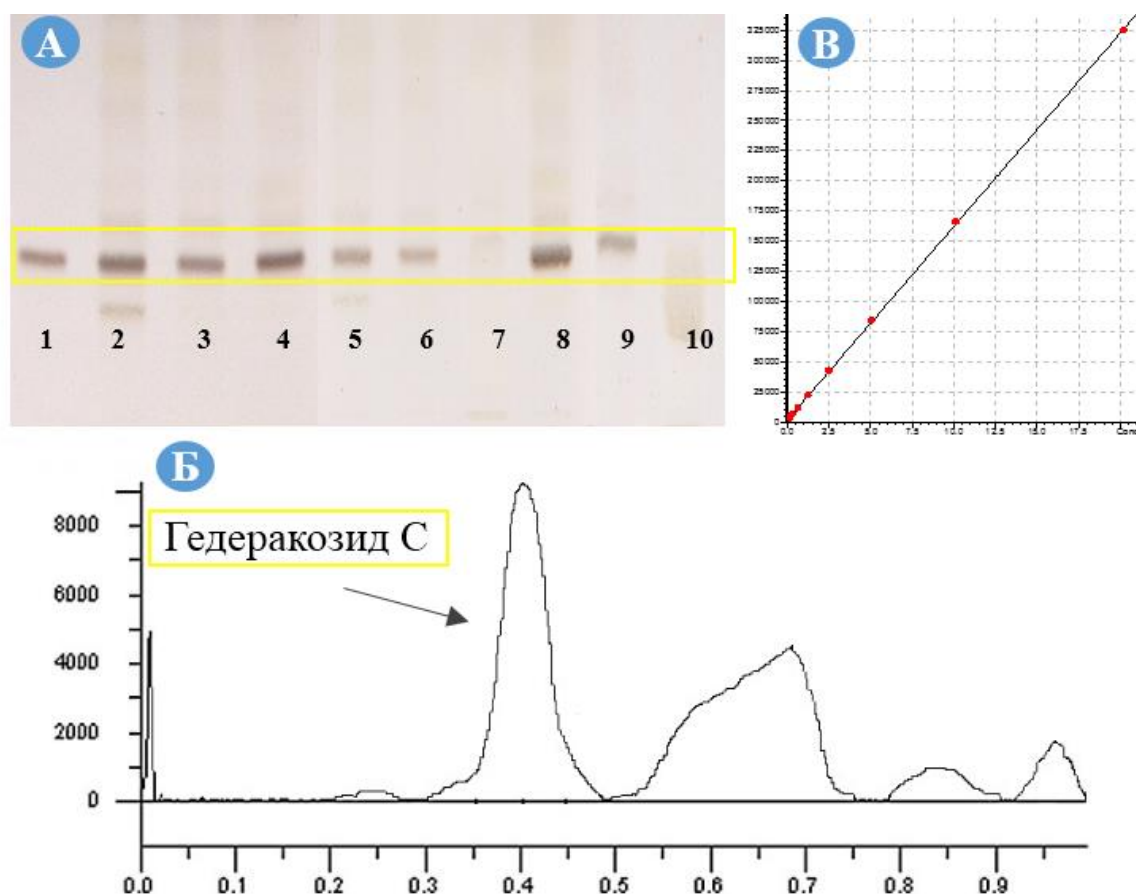


Рис. 4.9. Результати ВЕТШХ досліджень: А – ВЕТШХ пластина, Б – типова хроматограма, отримана з кожної доріжки, В – калібрувальна крива для кількісного виміру гедеракозиду С; 1– стандарт гедеракозиду С, 2, 4, 5– екстракт плюща листа, 9 – сироп, 3, 6, 8 – капсули, 7 – плацебо капсул, 10– плацебо сиропу)

Для досягнення найкращих результатів аналізу, приготування розчинів слід проводити таким чином.

Приготування розчинів для ВЕРХ та УВЕРХ методів

Розчин порівняння для ВЕРХ та УВЕРХ методів. 6 мг гедеракозиду С поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняють в 10 мл метанолу Р, доводять об'єм розчину водою Р до позначки та перемішують.

Випробовуваний розчин сухого екстракту листа плюща для ВЕРХ та УВЕРХ методів. 28 мг сухого екстракту плюща поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 10 мл метанолу Р та витримують на УЗ-бані протягом 15 хвилин за кімнатної температури, після чого розчину дають охолонути, доводять розчин до мітки водою Р та перемішують.

Випробовуваний розчин капсул «Гедерин», які містять сухий екстракт листя плюща, для ВЕРХ та УВЕРХ методів. 280 мг препарату (точна наважка) поміщають у мірну колбу місткістю 250,0 мл, додають 10 мл метанолу *P* та обробляють ультразвуком протягом 15 хвилин за кімнатної температури, після чого розчину дають охолонути, доводять розчин до мітки водою *P* та перемішують.

Випробовуваний розчин сиропу «Гедерин+», який містить сухий екстракт листя плюща, для ВЕРХ та УВЕРХ методів. 5,0 мл сиропу (точна наважка) перемішують у мірну колбу місткістю 50,0 мл, заповнюють колбу на 80% водою *P*, обробляють ультразвуком протягом 15 хвилин за кімнатної температури, доводять розчин до мітки та перемішують.

Твердофазна екстракція для сиропу при аналізі УВЕРХ методу.

Отриманий розчин пропускали крізь патрон для твердофазної екстракції з сорбентом C18 у такому порядку:

- патрон промивали об'ємом метанолу *P*, що дорівнює об'єму патрона;
- потім патрон промивали об'ємом води *P*, що дорівнює двом об'ємам патрона;
- до верхньої частини патрона за допомогою адаптера приєднували корпус одноразового шприца без голки і поршня;
- крізь патрон пропускали 5,0 мл випробовуваного розчину;
- патрон промивали водою *P* два рази порціями по 3 мл;
- висушували патрон за допомогою вакууму протягом 5 хв;
- проводили елюювання проби двома порціями по 2 мл суміші: ацетонітрил *P* – вода *P* (60 : 40) в мірну колбу місткістю 5 мл, доводили об'єм колби водою *P* до позначки та перемішували.

Приготування розчинів для ВЕТШХ методу

Розчин порівняння для ВЕТШХ. 5,0 мг гедеракозиду *C* переносять у мірну колбу місткістю 5,0 мл, розчиняють у метанолі *P* і доводять до мітки тим же розчинником.

Випробовуваний розчин сухого екстракту листя плюща. 50 мг сухого екстракту плюща поміщають у мірну колбу місткістю 20,0 мл, додають 15 мл метанолу *P* й установлюють на УЗ-баню протягом 15 хвилин за кімнатної температури. Після цього розчину дають охолонути, доводять розчин до мітки тим самим розчинником та перемішують.

Випробовуваний розчин капсул «Гедерин», які містять сухий екстракт листя плюща. 300 мг препарату поміщають у мірну колбу місткістю 20,0 мл, додають 15 мл метанолу *P* та обробляють ультразвуком протягом 15 хвилин, після чого доводять розчин до мітки тим же розчинником та перемішують.

Випробовуваний розчин сиропу «Гедерин+», який містить сухий екстракт листя плюща. 2,0 мл сиропу (точна наважка) поміщають у мірну колбу місткістю 5,0 мл, додають 2 мл водою *P*, обробляють ультразвуком протягом 15 хвилин, після чого доводять розчин до мітки тим самим розчинником та перемішують.

Отриманий розчин пропускали крізь патрон для твердофазної екстракції із сорбентом С18 у такому порядку:

- патрон промивали об'ємом метанолу *P*, що дорівнює об'єму патрона;
- потім патрон промивали об'ємом води *P*, що дорівнює двом об'ємам патрона;
- до верхньої частини патрона за допомогою адаптера приєднували корпус одноразового шприца без голки і поршня;
- крізь патрон пропускали 5,0 мл випробовуваного розчину;
- патрон промивали водою *P* два рази порціями по 3 мл;
- висушували патрон за допомогою вакууму протягом 5 хв;
- проводили елюювання проби двома порціями по 2 мл метанолом *P* у мірну колбу місткістю 5 мл, доводили об'єм колби тим самим розчинником до позначки та перемішували.

Для розрахунків кількісного вмісту гедеракозиду *C* за зазначеними методами слід використовувати такі формули розрахунків.

Вміст гедеракозиду в сухому екстракті листя плюща (X_4) для ВЕРХ та УВЕРХ методів, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$X_4 = \frac{S_i \cdot m_{st} \cdot 100 \cdot P}{S_{st} \cdot m_i \cdot 100} = \frac{S_i \cdot m_{st} \cdot P}{S_{st} \cdot m_i}, \text{ де}$$

S_i – середнє значення площ піків гедеракозиду С, розраховане з хроматограм випробовуваного розчину для сухого екстракту листя плюща;

S_{st} – середнє значення площ піків гедеракозиду С, розраховане з хроматограм розчину порівняння;

m_i – маса наважки сухого екстракту листя плюща, у грамах;

m_{st} – маса наважки *стандарту гедеракозиду С*, у грамах;

P – вміст основної речовини у *стандарті гедеракозиду С*, у відсотках.

Вміст гедеракозиду в капсулах (X_5) для ВЕРХ та УВЕРХ методів, у міліграмах, обчислюють за формулою:

$$X_5 = \frac{S_i \cdot m_{st} \cdot 250 \cdot m_c \cdot P}{S_{st} \cdot m_i \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{S_i \cdot m_{st} \cdot 2.5 \cdot m_c \cdot P}{S_{st} \cdot m_i \cdot (100 - W)}, \text{ де}$$

S_i – середнє значення площ піків гедеракозиду С, розраховане з хроматограм випробовуваного розчину для капсул, які містять сухий екстракт листя плюща;

S_{st} – середнє значення площ піків гедеракозиду С, розраховане з хроматограм розчину порівняння;

m_i – маса наважки капсули капсульної маси, взятої для приготування випробовуваного розчину для капсул, які містять сухий екстракт листя плюща, у міліграмах;

m_{st} – маса наважки *стандарту гедеракозиду С*, у міліграмах;

m_c – середня маса вмісту капсул, у міліграмах;

P – вміст основної речовини у *стандарті гедеракозиду С*, у відсотках;

W – втрата в масі при висушуванні, у відсотках.

Вміст гедеракозиду (X_6) в 1 мл сиропу для ВЕРХ та УВЕРХ методів, в грамах, обчислюють за формулою:

$$X_6 = \frac{S_i \cdot m_{st} \cdot 50 \cdot \rho \cdot P}{S_{st} \cdot m_i \cdot 100 \cdot 100} = \frac{S_i \cdot m_{st} \cdot \rho \cdot P}{S_{st} \cdot m_i \cdot 200}, \text{де}$$

S_i – середнє значення площ піків гедеракозиду С, розраховане з хроматограм випробовуваного розчину для сиропу, який містить сухий екстракт листя плюща;

S_{st} – середнє значення площ піків гедеракозиду С, розраховане з хроматограм розчину порівняння;

m_i – маса наважки сиропу, взятої для приготування випробовуваного розчину для сиропу, який містить сухий екстракт листя плюща, у грамах;

m_{st} – маса наважки *стандарту гедеракозиду С*, у грамах;

ρ – густина сиропу, в г/см³;

P – вміст основної речовини у *стандарті гедеракозиду С*, у відсотках.

Вміст гедеракозиду в сухому екстракті листя плюща (X_7) для ВЕТШХ методу, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$X_7 = \frac{S_i \cdot m_{st} \cdot 20 \cdot P}{S_{st} \cdot m_i \cdot 5} = \frac{S_i \cdot m_{st} \cdot 4 \cdot P}{S_{st} \cdot m_i}, \text{де}$$

S_i – середнє значення площ піків гедеракозиду С, розраховане з хроматограм випробовуваного розчину для сухого екстракту листя плюща;

S_{st} – середнє значення площ піків гедеракозиду С, розраховане з хроматограм розчину порівняння;

m_i – маса наважки сухого екстракту листя плюща, у грамах;

m_{st} – маса наважки *стандарту гедеракозиду С*, у грамах;

P – вміст основної речовини у *стандарті гедеракозиду С*, у відсотках;

Вміст гедеракозиду в капсулах (X_8) для ВЕТШХ методу, у міліграмах, обчислюють за формулою:

$$X_8 = \frac{S_i \cdot m_{st} \cdot 20 \cdot m_c \cdot P}{S_{st} \cdot m_i \cdot 5 \cdot (100 - W)} = \frac{S_i \cdot m_{st} \cdot 4 \cdot m_c \cdot P}{S_{st} \cdot m_i \cdot (100 - W)}, \text{де}$$

S_i – середнє значення площ піків гедеракозиду С, розраховане з хроматограм випробовуваного розчину для капсул які містять сухий екстракт листя плюща;

S_{st} – середнє значення площ піків гедеракозиду С, розраховане з хроматограм розчину порівняння;

m_i – маса наважки капсули капсульної маси, взятої для приготування випробовуваного розчину для капсул які містять сухий екстракт листя плюща, у міліграмах;

m_{st} – маса наважки *стандарту гедеракозиду С*, у міліграмах;

m_c – середня маса вмісту капсул, у міліграмах;

P – вміст основної речовини у *стандарті гедеракозиду С*, у відсотках;

W – втрата в масі при висушуванні, у відсотках

Вміст гедеракозиду (X_9) в 1 мл сиропу для ВЕТШХ методу, в грамах, обчислюють за формулою:

$$X_9 = \frac{S_i \cdot m_{st} \cdot 5 \cdot \rho \cdot P}{S_{st} \cdot m_i \cdot 5 \cdot 100} = \frac{S_i \cdot m_{st} \cdot \rho \cdot P}{S_{st} \cdot m_i \cdot 100}, \text{ де}$$

S_i – середнє значення площ піків гедеракозиду С, розраховане з хроматограм випробовуваного розчину для сиропу, який містить сухий екстракт листя плюща;

S_{st} – середнє значення площ піків гедеракозиду С, розраховане з хроматограм розчину порівняння;

m_i – маса наважки сиропу, взятої для приготування випробовуваного розчину для сиропу, який містить сухий екстракт листя плюща, у грамах;

m_{st} – маса наважки *стандарту гедеракозиду С*, у грамах;

ρ – густина сиропу, в г/см³;

P – вміст основної речовини у *стандарті гедеракозиду С*, у відсотках.

Результати були отримані для всіх зразків після аналізу кожним методом (табл. 4.6). Кожен зразок аналізували не менше трьох разів. Отримані результати були порівняні за допомогою критерію Стюдента.

Таблиця 4.6

Вміст гедеракозиду С у зразках та різниця між методами

Аналізовані зразки	Вміст гедеракозиду С, середнє $\pm$ SD			Вимоги	Порівняння за критерієм Стьюдента		
	ВЕРХ	УВЕРХ	ВЕТШХ		ВЕРХ/ УВЕРХ	ВЕРХ/ ВЕТШХ	УВЕРХ/ ВЕТШХ
Екстракт І, %	$19,57 \pm 0,23$	$19,65 \pm 0,34$	$19,83 \pm 0,21$	Не менше 14%	2,68	3,07	2,81
Екстракт ІІ, %	$16,02 \pm 0,17$	$15,93 \pm 0,16$	$16,10 \pm 0,39$		2,72	2,51	2,95
Екстракт ІІІ, %	$18,92 \pm 0,24$	$18,98 \pm 0,35$	$19,11 \pm 0,28$		2,54	3,19	3,01
Капсули І, мг	$8,39 \pm 0,37$	$7,99 \pm 0,27$	$8,47 \pm 0,39$	Не менше 7 мг	2,83	2,02	3,87
Капсули ІІ, мг	$8,76 \pm 0,26$	$8,91 \pm 0,40$	$8,98 \pm 0,43$		2,82	3,05	2,11
Капсули ІІІ, мг	$8,53 \pm 0,21$	$8,49 \pm 0,37$	$8,61 \pm 0,1$		2,56	2,73	2,89
Сироп, мг/мл	$0,603 \pm 0,019$	$0,63 \pm 0,028$	$0,611 \pm 0,024$	Не менше 0,6 мг/мл	2,82	3,34	2,77

Таблиця розподілу Стюдента має значення $t(95\%; 2) = 4,30$. Розраховані t значення менші за наведені у таблиці, отже, відмінності між значеннями не суттєві. Тому запропоновані методи ВЕРХ, УВЕРХ та ВЕТШХ можуть використовуватися для рутинного контролю гедеракозиду С в екстракті, капсулах та сиропі.

4.2.2 Валідація розроблених методик

Валідація була проведена для всіх методик за такими параметрами: лінійність, специфічність, прецизійність, правильність, стабільність, крім того, було визначено межу виявлення та межу кількісного визначення [3, 32].

Специфічність. Вплив допоміжних речовин плацебо для капсул та сиропу був досліджений шляхом порівняння хроматограм, отриманих із тестових, порівняння та плацебо розчинів. Розчин плацебо містив такі самі компоненти і в тих самих пропорціях, що і тестовий, крім екстракту плюща. Отримані результати показали відсутність впливу допоміжних речовин на визначення гедеракозиду С.

Лінійність, межа виявлення та межа кількісного визначення. Визначення лінійності проводили, аналізуючи серію розчинів, які містили різну концентрацію гедеракозиду С. Результати визначення лінійності наведені в табл. 4.7; хроматограми вивчення лінійності для ВЕРХ та УВЕРХ методів – на рис. 4.10-4.11.

Правильність. Дослідження правильності оцінювали шляхом виміру розчинів із відомою концентрацією досліджуваної речовини. Кількість гедеракозиду С у зразках становила 80, 100 та 120 % (табл. 4.8). Отримані дані були в діапазоні 99,10–100,70, що свідчить про те, що запропоновані методи є точними для визначення гедеракозиду С.

Прецизійність. Дослідження було проведено протягом двох днів різними аналітиками з використанням розчину зі 100 % концентрацією гедеракозиду С. У результаті були отримані значення RSD та похибки для кожного з методів (табл. 4.9).

Таблиця 4.7

Результати вивчення лінійності, межа виявлення та межа кількісного визначення для розроблених методів

Метод	Калібрувальна крива	R ²	Діапазон концентрацій, (мкг/мл)	Межа виявлення (нг/мл)	Межа кількісного визначення (нг/мл)
ВЕРХ	$y = 1,0029x - 0,2421$	0,9999	48-72	0,93	2,83
УВЕРХ	$y = 0,9907x + 1,4288$	0,9999	48-72	1,59	4,83
ВЕТШХ	$y = 1,0068x - 0,4124$	0,9988	800-1200	50,24	150,74

Таблиця 4.8

Результати вивчення правильності розроблених методик

Концентрація (%)	Знайдено (%)			RSD (%)			Знайдено (%)		
	ВЕРХ	УВЕРХ	ВЕТШХ	ВЕРХ	УВЕРХ	ВЕТШХ	ВЕРХ	УВЕРХ	ВЕТШХ
80%	80,1	79,87	79,28	0,11	0,05	0,37	100,12	99,84	99,1
100%	100,02	100,01	100,04	0,09	0,21	0,25	100,02	100,01	100,04
120%	118,96	119,87	120,84	0,1	0,11	0,17	99,13	99,89	100,7

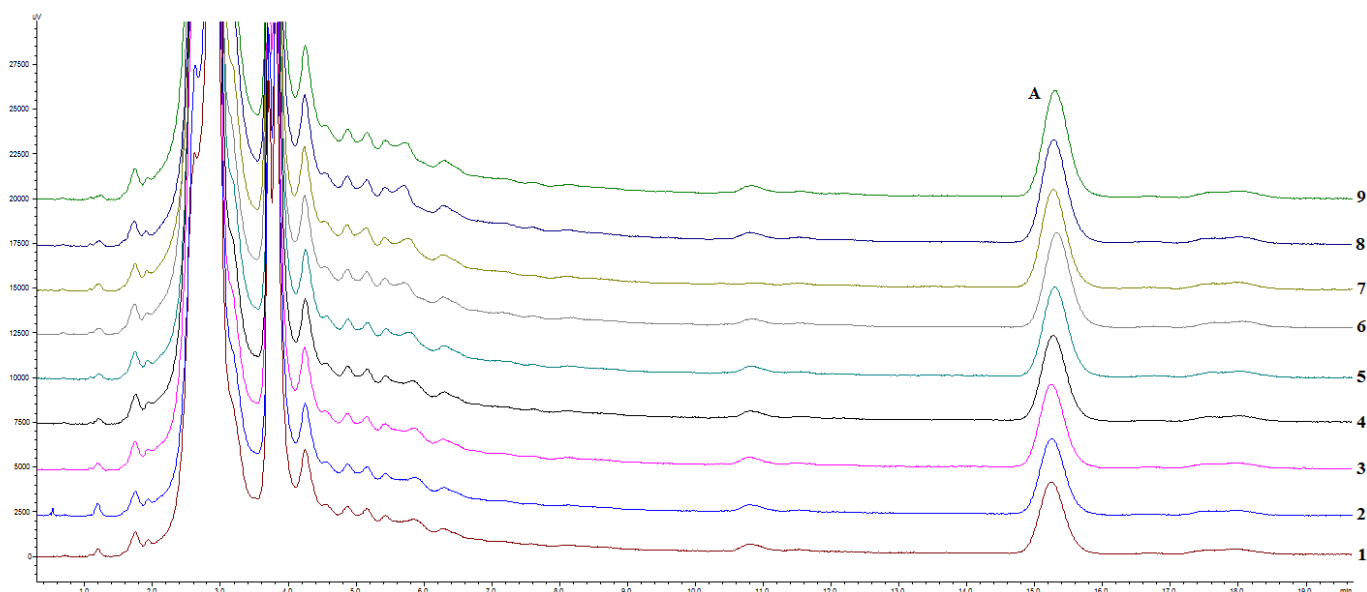


Рис. 4.10. Типові хроматограми для дослідження лінійності методики ВЕРХ:
А– гедеракозид С; 1 – 80%, 2 – 85%, 3 – 90 %, 4 – 95 %, 5 – 100 %, 6 – 105 %, 7 – 110 %, 8 – 115 %, 9 – 120 %

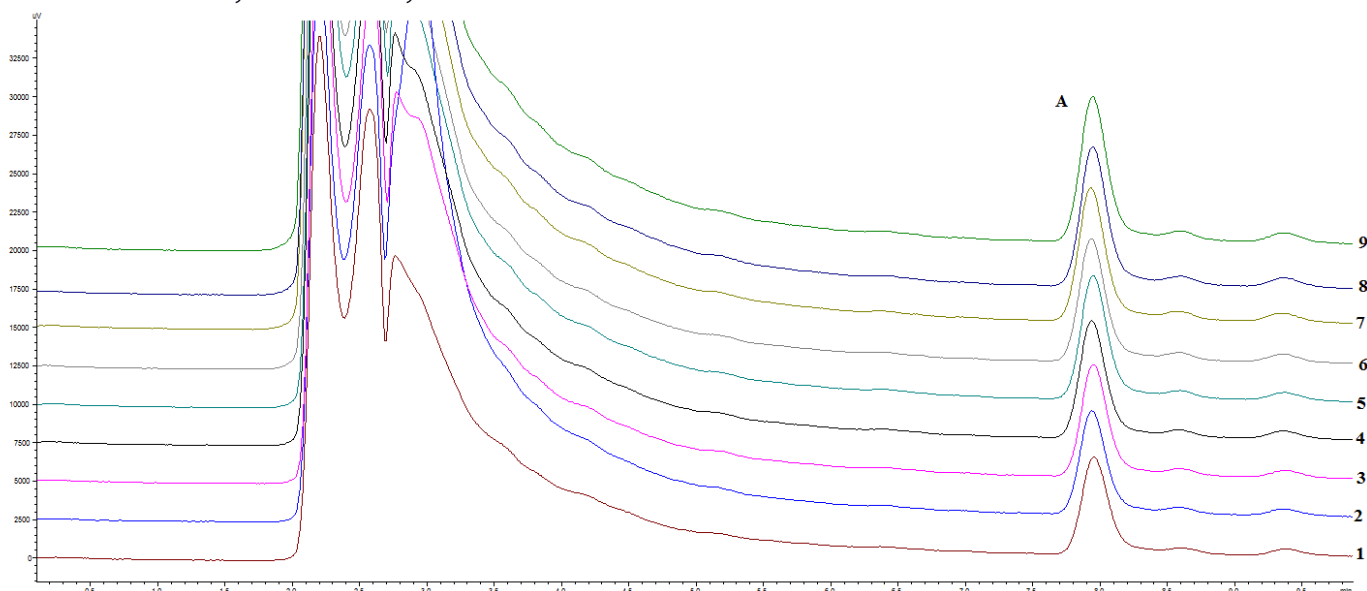


Рис. 4.11. Типові хроматограми для дослідження лінійності методики УВЕРХ:
А– гедеракозид С; 1 – 80%, 2 – 85%, 3 – 90 %, 4 – 95 %, 5 – 100 %, 6 – 105 %, 7 – 110 %, 8 – 115 %, 9 – 120 %

Таблиця 4.9

Результати вивчення прецизійності для розроблених методів

Метод	Концентрація (мкг/мл)	Intra-Day ($n = 6$)			Inter-Day ($n = 12$)		
		Знайдено $\pm$ S.D., %	RSD, %	Похибка, %	Знайдено $\pm$ S.D., %	RSD, %	Похибка, %
ВЕРХ	60	100,28 $\pm$ 0,42	0,52	0,83	100,14 $\pm$ 0,25	0,98	1,35
УВЕРХ	60	100,95 $\pm$ 0,48	0,46	1,23	101,13 $\pm$ 0,14	0,91	1,91
ВЕТШХ	1000	100,14 $\pm$ 0,21	0,53	0,61	100,30 $\pm$ 0,37	0,59	0,76

Вивчення *стабільності* розчину гедеракозиду С здійснювали протягом 24-х годин для стандартного розчину. Встановлено, що розчин був стабільний для всіх методів, ВЕРХ, УВЕРХ та ВЕТШХ, оскільки відхилення площ речовини становило 0,395 %, 0,138 % та 0,387 % відповідно.

Усі методи показали задовільні результати під час проведення валідації, тому можуть бути рекомендовані для визначення гедеракозиду С у різних лікарських формах.

4.2.3 Економічна оцінка розроблених методик

Одним із завдань роботи було порівняння вартості розроблених методик. Дослідження проводились на кафедрі соціальної фармації доц. Корж Ю.В. під керівництвом проф. Котвіцької А.А. Із метою розрахунку порівняльної вартості аналітичних досліджень для методів аналізу (ВЕРХ, УВЕРХ, ВЕТШХ) був проведений аналіз національного законодавства [96]. За стандартами бухгалтерського обліку, до складу витрат включаються: прямі витрати на оплату праці, інші прямі витрати, змінні накладні та фіксовані накладні [37]. Інші витрати включають внутрішньовиробничий рух матеріалів, напівфабрикати, інструменти та обладнання, готові вироби, нестачу та втрати від пошкодження матеріалу, оплату простоїв тощо. Амортизація основних фондів є частиною накладних витрат. Слід зазначити, що перелік та склад предметів собівартості (робіт, послуг) установлюється підприємством самостійно. Тому, враховуючи положення національного законодавства щодо визначення собівартості продукції та специфіку аналітичних досліджень, ми сформували такі статті витрат: основна сировина, допоміжні матеріали, електроенергія, транспортні та заготівельні витрати, заробітна плата, соціальні виплати, основні засоби, переробка [124]. Розрахунки проводилися з урахуванням часу аналітичного дослідження для кожного методу, а саме: ВЕРХ – 20 хв, УВЕРХ – 10 хв, ВЕТШХ – 10 хв, а вартість розрахунків представлена в євро. Перерахунок здійснено за курсом Національного банку України станом на 13.09.2019 р. 1 євро = 27,22 грн [16].

Розрахунок вартості необхідних реагентів для проведення аналітичних досліджень здійснювався на основі офіційної бази даних компанії Sigma-Aldrich [159] (табл. 4.10).

Таблиця 4.10

Калькуляція собівартості витрат за статтею «Основна сировина і матеріали»
та «Допоміжні матеріали»

Сировина і матеріал	Ціна, євро	Кількість для аналізу 1 тестового зразка	Вартість, євро
Метод ВЕРХ			
Основна сировина і матеріали			
Ацетонітрил 2,5 л	304,70	5,8 мл	0,71
Мембранний фільтр 0,45 мкм № 100	261,00	1 шт.	2,61
Вода для хроматографії 1 літр	26,60	14,2	0,38
Колонка ACE 5 C18 (150×4,6) (5000 зразків)	622,00	1 шт.	0,12
Предколонка 5 шт (500 зразків)	129,00	1 шт.	0,26
Разом	4,08		
Допоміжні матеріали			
Рукавички латексні з пудрою № 100	2,54	1 шт.	0,03
Одноразова неткана шапочка медична № 100	2,06	1 шт.	0,02
Бахіли медичні стерильні № 50	3,01	1 шт.	0,06
Разом	0,11		

Продовж.табл. 4.10

1	2	3	4
Метод УВЕРХ			
Основна сировина і матеріали			
Ацетонітрил 2,5 л	304,7	0,15 мл.	0,02
Мембранний фільтр 0,22 мкм № 1000	1660	1 шт.	1,66
Вода для хроматографії 1 л.	26,6	0,35 мл.	0,01
Колонка ACQUITY VEN C18 1.7µm 2.1 x 50 мм	760	1 шт.	0,15
Предколонка 3 шт.(500 зразків)	649	1 шт.	1,30
Разом			3,14
Допоміжні матеріали			
Рукавички латексні з пудрою № 100	2,54	1 шт.	0,03
Одноразова неткана шапочка медична № 100	2,06	1 шт.	0,02
Бахіли медичні стерильні № 50	3,01	1 шт.	0,06
Разом			0,11
Метод ВЕТШХ			
Основна сировина і матеріали			
ВЕТШХ пластина із силікагелем 60 F254 на скляній підкладці	162,00	1 шт.	0,81
Безводная мурашина кислота 1л	50,8	0,5 мл	0,03
Ацетон 1 л	54,40	2,5 мл	0,10
Метанол 2,5 л	62,70	2,5 мл	0,06
Етилацетат 1 л	10,00	3,75 мл	0,39
Етанол 1 л	40,80	10 мл	0,41

Продовж.табл. 4.10

1	2	3	4
Сірчана кислота конц. 2,5 л	115,00	2,5	0,12
Разом			1,92
Допоміжні матеріали			
Рукавички латексні з пудрою № 100	2,54	1 шт.	0,03
Одноразова неткана шапочка медична № 100	2,06	1 шт.	0,02
Бахіли медичні стерильні № 50	3,01	1 шт.	0,06
Разом			0,11

Витрати за статтею «Електроенергія» – це безпосередні витрати в технологічному процесі у разі виконання аналітичного дослідження. Згідно з технічними характеристиками обладнання (енергоспоживання кВт/год), терміном проведення аналітичного дослідження та національним тарифом за електроенергію для побутових та малих непобутових споживачів 0,09 Євро/кВт·год із урахуванням податку на додану вартість здійснено розрахунок вартості за статтею «Електроенергія» [123], яка склала: за методом ВЕРХ – 0,70 Євро, за методом УВЕРХ – 0,39 Євро, за методом ВЕТШХ – 0,35 Євро.

Розрахунок витрат за статтею «Заробітна плата» здійснено на основі офіційних даних Державної служби статистики станом на 01.06.2019 р. щодо середньої заробітної плати за місяць старшого наукового співробітника, яка становила 293 євро. За місяць роботи старший науковий співробітник відпрацьовує 176 годин.

Результати розрахунку статей витрат за різними методами аналітичного дослідження в узагальненому вигляді наведено в табл. 4.11.

Стаття «Основна сировина і матеріали» займає найбільшу частку в структурі загальних витрат. Для дослідження ВЕРХ їх питома вага становить 60,36%, УВЕРХ – 65,83 %, ВЕТШХ – 64,43%.

Таблиця 4.11

Калькуляція собівартості аналітичного дослідження методами аналізу ВЕРХ,
УВЕРХ, ВЕТШХ

Калькуляційна одиниця – 1 аналіз зразка

Статті витрат	Метод ВЕРХ (час аналізу – 20 хв)		Метод УВЕРХ (час аналізу – 10 хв)		ВЕТШХ (час аналізу – 10 хв)	
	Сума, євро	Питома вага, %	Сума, євро	Питома вага, %	Сума, євро	Питома вага, %
Основна сировина і матеріали	4,08	60,44	3,14	65,83	1,92	64,86
Допоміжні матеріали	0,11	1,3	0,11	2,31	0,11	3,72
Електроенергія	0,70	10,37	0,39	8,18	0,35	11,82
Транспортно-заготівельні витрати	0,04	0,59	0,03	0,63	0,02	0,68
Заробітна плата	0,56	8,3	0,42	8,81	0,28	9,46
Відрахування на соціальні заходи	0,21	3,11	0,16	3,35	0,11	3,72
Амортизація основних засобів	1,05	15,56	0,52	10,9	0,17	5,74
Повна собівартість	6,75	100	4,77	100	2,96	100

Витрати на застосування методу ВЕТШХ були в 2,3 та 1,6 раз нижчі, ніж методів ВЕРХ та УВЕРХ відповідно. Також були підраховані витрати аналітичних досліджень за допомогою ВЕРХ, УВЕРХ та ВЕТШХ для всіх об'єктів (екстракт, капсули та сироп) (табл. 4.12).

Таблиця 4.12

Розрахунок вартості аналізу кожного зразку кожним з методів

Об'єкт	Вартість, євро		
	Методи		
	ВЕРХ	УВЕРХ	ВЕТШХ
Екстракт	9,40	7,41	3,48
Капсули	13,38	11,39	3,48
Сироп	7,96	9,75	6,68

4.2.4 Оцінка впливу аналітичних методик на навколишнє середовище

Усі розроблені хроматографічні методи оцінювали на їх «зеленість», використовуючи аналітичну екошкалу для вибору методу з меншим впливом на навколишнє середовище [19]. Також були враховані різні способи пробопідготовки для кожного зі зразків (екстракт, капсули та сироп). ВЕРХ (табл. 4.13) та УВЕРХ (табл. 4.14.) методи показали схожі значення екошкали. Так, ВЕРХ має значення 78, 78, 84 для екстракту, капсул та сиропу, відповідно; УВЕРХ – 81, 81, 78. Метод ВЕТШХ (табл. 4.15) мав суттєво інші результати – 59, 59, 53. Тобто метод ВЕТШХ був визнаний менш «зеленим» порівняно з ВЕРХ та УВЕРХ.

Таблиця 4.13

Розрахунок штрафних балів для ВЕРХ методу при аналізі одного зразку

Реагент/Прилад		Штрафні бали			
Ацетонітрил 2,9 мл		4			
Вода 7,1 мл		0			
ВЕРХ		1			
Відходи		8			
Виробнича небезпека		3			
Пробопідготовка					
Екстракт	Штраф-ні бали	Капсули	Штраф-ні бали	Сироп	Штраф-ні бали
Метанол 10 мл	6	Метанол 20 мл	6	Вода 45 мл	0
Вода 90 мл	0	Вода 230 мл	0		
Разом штрафних балів: 22		Разом штрафних балів: 22		Разом штрафних балів: 16	
Загальний бал за шкалою – 78		Загальний бал за шкалою – 78		Загальний бал за шкалою – 84	

Таблиця 4.14

Оцінка штрафних балів для УВЕРХ методу в аналізі одного зразку

Реагент/Прилад					Штрафні бали
Ацетонітрил 0,145 мл					4
Вода 0,355 мл					0
УВЕРХ					0
Відходи					6
Виробнича небезпека					3
Пробопідготовка					
Екстракт	Штрафні бали	Капсули	Штрафні бали	Сироп	Штрафні бали
Метанол 10 мл	6	Метанол 20 мл	6	Вода 45 мл + 21,4 мл	0
Вода 90 мл		Вода 230 мл	0	Метанол 6 мл	6
				Ацетонітрил 1,6 мл	4
Всього штрафних балів: 19		Всього штрафних балів: 19		Всього штрафних балів: 23	
Загальний бал за шкалою – 81		Загальний бал за шкалою – 81		Загальний бал за шкалою – 77	

Таблиця 4.15

Оцінка методу ВЕТШХ в аналізі одного зразка

Реагент/Прилад				Штрафні бали	
Безводна мурашина кислота 0,5 мл				2	
Ацетон 2,5 мл				4	
Метанол 2,5 мл				6	
Етил ацетат 3,75 мл				4	
Сульфатна кислота 2,5 мл				2	
Етанол 10 мл				4	
Нагрівач				2	
ВЕТШХ				0	
Відходи				8	
Виробнича небезпека				3	
Пробопідготовка					
Екстракт	Штрафні бали	Капсули	Штрафні бали	Сироп	Штрафні бали
Метанол 20 мл	6	Метанол 20 мл	6	Вода 3 мл + 18 мл	0
				Метанол 6 мл + 5 мл	12
Разом штрафних балів: 41		Разом штрафних балів: 41		Разом штрафних балів: 47	
Загальний бал за шкалою – 59		Загальний бал за шкалою – 59		Загальний бал за шкалою – 53	

Було розроблено хроматографічні методи (ВЕРХ, УВЕРХ, ВЕТШХ) для рутинного аналізу гедеракозиду С у сировині (екстракт) та оригінальних лікарських формах (капсули та сироп). Кожен з методів був валідований за такими параметрами: специфічність, лінійність, правильність, прецизійність, стабільність, а також були розраховані межа виявлення та межа кількісного визначення. Всі вони є точними аналітичними методами для визначення гедеракозиду С у різних зразках. Також був оцінений вплив кожного методу на навколишнє середовище. Метод ВЕТШХ визнаний менш «зеленим», ніж ВЕРХ та УВЕРХ. З іншого боку, ВЕТШХ потребує менших фінансових витрат в 2,3 та 1,6 раз ніж ВЕРХ та УВЕРХ, відповідно.

4.3 Аналіз синтетичних компонентів сиропу «Гедерин+»

Поєднання рослинних екстрактів та синтетичних речовин є однією із тенденцій сучасної фармації. Такі комбінації показують кращі результати порівняно з препаратами, що містять тільки синтетичний компонент чи рослинний екстракт [152]. Іноді додавання рослинного екстракту може мати корисні ефекти з погляду зменшення побічних ефектів і збільшення тривалості дії [154]. Проте хімічні взаємодії між рослинними та синтетичними компонентами можуть призвести до погіршення стабільності ЛЗ [35, 60, 83].

Сальбутамолу сульфат (рис. 4.12) — це агоніст β_2 -адренергічних рецепторів короткої дії, який використовується для купірування бронхоспазму в лікуванні астми та хронічних обструктивних захворювань легень (ХОЗЛ). Цей ЛЗ найчастіше застосовується в педіатричній практиці [23].

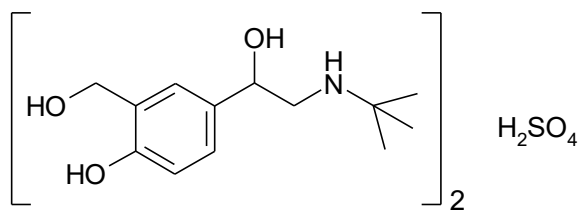


Рис. 4.12. Структурна формула сальбутамолу сульфату

Тому комбінація β_2 -агоніста сальбутамолу сульфату та екстракту плюща може мати синергічний ефект, зокрема, завдяки модуляції гедеракозидом С та іншими сполуками плюща β_2 -адренорецепторів (мішені дії сальбутамолу) і м'якій політропній дії.

Проте, оскільки екстракти містять, як правило, суміш різних компонентів, що збільшує ймовірність хімічної взаємодії між синтетичними та рослинними складовими, виникає необхідність у проведенні досліджень стабільності препарату [54].

Як консервант в аналізованому сиропі використали калію сорбат. Цю речовину часто використовують для пригнічення росту дріжджів, цвілі та росту бактерій у ЛЗ. Проте застосування цього консерванту обмежується, оскільки він може викликати алергічні реакції [56]. Тобто, кількісне визначення цієї речовини також необхідне для забезпечення безпечності препарату.

4.3.1 Розробка методик визначення компонентів та дослідження стабільності сиропу «Гедерин+»

На сьогодні невизначеною є можливість взаємодії компонентів комбінованого сиропу — екстракту листя плюща, сальбутамолу сульфату та допоміжних речовин. Доказом такої взаємодії або її відсутності є дослідження кількісного вмісту компонентів у процесі зберігання протягом часу. Такі дослідження проводяться під час вивчення стабільності ЛЗ за попередньо розробленими та валідованими методиками.

4.3.1.1 Розробка методики кількісного визначення сальбутамолу сульфату та калію сорбату

Для кількісного визначення субстанції сальбутамолу сульфату ЄФ пропонує використовувати неводне потенціометричне титрування із застосуванням перхлоратної кислоти. Проте цей спосіб є неприйнятним для

аналізу багатокомпонентних ЛФ. Крім того, деякі літературні джерела пропонують використовувати різні ВЕРХ методики [22, 129]. Ці методики пропонують проводити дослідження в ізократичному режимі з використанням колонки, заповненої C18 сорбентом, із різними рухомими фазами: суміш ацетонітрилу з водою [110] або фосфатним буферним розчином [22, 129]. Також у літературних даних зустрічаються спектрофотометричні методи [73, 118] та капілярний електрофорез [59]. Оскільки запропоновані спектрофотометричні методи засновані на реакції сальбутамолу з іншими реагентами, це може призвести до втрати досліджуваної речовини через неповноту взаємодії або небажаних побічних реакцій. Одним з основних недоліків капілярного електрофорезу є відтворюваність [121].

Такі методи, як ГХ [156, 174], ВЕРХ [106, 148], ВЕРХ з мас-детектором [137] та капілярний електрофорез [42, 102], використовувались для кількісного визначення калію сорбату в різних фармацевтичних препаратах.

Незважаючи на те, що всі зазначені вище методи були успішно валідовані та застосовані в рутинному контролі фармацевтичних препаратів, жоден з них не давав можливості для одночасного визначення обох компонентів (сальбутамолу сульфату та калію сорбату) в одному аналізі. Для кількісного виміру речовин був обраний метод ВЕРХ, оскільки він має високу специфічність і дозволяє проводити оцінку кількох компонентів за умови правильного добору хроматографічних параметрів.

Для розробки методики одночасного визначення сальбутамолу сульфату та калію сорбату попередньо досліджено вплив різних параметрів (градієнтні режими, розчинники, рН та склад рухомої фази) з використанням стандартного розчину сальбутамолу сульфату (табл 4.16).

Під час розробки методики досліджували різні рН фосфатних буферних розчинів. Оскільки сальбутамолу сульфат має основні властивості, в кислих умовах він стає протонованим, як результат спостерігається зменшення його часу утримування (раннього елюювання). Зі свого боку, це може заощадити час аналізу, що є перевагою під час рутинного контролю ЛФ. Тому для

проведення цього дослідження були використані фосфатні буферні розчини з рН 3,0, 3,5 та 4,0. Оскільки при рН фосфатного буферного розчину 3,0 параметри піку (кількість теоретичних тарілок та симетрія піку) були найкращими (табл 4.16), саме цей розчин застосовувався в подальших дослідженнях як компонент рухомої фази.

Таблиця 4.16

Вплив різних параметрів рухомої фази на аналіз сальбутамолу сульфату

Параметр		Кількість теоретичних тарілки (N)	Фактор асиметрії (T)	RSD, % (n=3)
рН буферного розчину (БР)	3,0	6251	1,42	0,22
	3,5	6061	1,53	0,29
	4,0	6160	1,51	0,23
Розчинник	Вода Р	6983	1,2	0,09
	Метанол Р	4035	1,36	0,17
	Рухома фаза А	6323	1,21	0,16
	БР із рН 3.0	2595	1,27	0,21
Склад рухомої фази А	MeCN/БР (5/95 об/об)	5268	1,53	0,36
	MeCN/MeOH/БР (4/6/90 об/об/об)	4657	1,33	0,27
	MeOH/БР (10/90 об/об)	6251	1,42	0,22
	MeCN/MeOH/БР (2/8/90 об/об)	6323	1,2	0,16
	MeCN/MeOH/БР (8/12/80 об/об/об)	2994	1,27	0,18
	MeCN/MeOH/БР (5/5/90 об/об/об)	3567	1,39	0,21

Для встановлення оптимального складу рухомої фази А були досліджені фосфатний буферний розчин із рН 3,0 (БР), метанол Р (MeOH) та ацетонітрил Р (MeCN), у різних співвідношеннях. За результатами експериментальних досліджень найбільш придатною для аналізу (табл. 4.16) виявилась суміш: ацетонітрил Р – метанол Р – фосфатний буферний розчин із рН 3.0 (20 : 80 : 900 об/об/об). Оптимальна швидкість потоку становила 1 мл/хв. Як сорбент було обрано С18, у запропонованих умовах час утримування сальбутамолу сульфату складав приблизно 5 хвилин, тому загальний час аналізу становив 15 хв.

Для визначення оптимальної пробопідготовки для розчинення проби використовували *метанол Р*, *воду Р*, фосфатний буферний розчин із рН 3,0 та рухому фазу А. З усіх перелічених найкращим розчинником була вода, тому для подальшого аналізу її використовували для розчинення стандартів та сиропу.

Проте під час дослідження сиропу в тих же умовах калію сорбат мав значно більший час утримування і заважав аналізу наступних хроматограм. Тому нами був використаний градієнтний режим з *ацетонітрилом Р* як рухома фаза Б. У разі додавання цього елюенту час утримування калію сорбату зменшився і з'явилася можливість визначити його протягом 15 хвилин аналізу. Для досягнення прийнятного розділення між компонентами були досліджені різні градієнтні режими. Крім того, серед різних типів сорбентів намагалися вибрати такий, що найбільше підійшов би для аналізу. Розглядали такі варіанти колонок: Symmetry C18 (150 × 4,6, розмір частинок 5 мкм) і Supelcosil C8 (150 × 4,6 мм, розмір частинок 3 мкм). Основна відмінність між колонками полягала в утримуванні речовин. У випадку використання октилсилільного сорбенту час утримування був коротшим, разом з тим досягалося прийнятне розділення. Тому для методики визначення був обраний цей сорбент, оскільки зменшення часу аналізу може бути перевагою у рутинному контролі ЛЗ.

Найбільш прийнятні умови хроматографування, які використовувались для подальшого аналізу, були викладені в *методиці 11* (розд. 2, п 2.4). Розчини були приготовлені таким чином:

Розчин порівняння. Стандарти сальбутамолу сульфату та калію сорбату розчиняли у *воді Р*, для одержання розчинів з концентрацією 20 мкг/мл та 80 мкг/мл, відповідно.

Випробовуваний розчин. 5,0 мл препарату поміщали у мірну колбу місткістю 50,0 мл, доводили об'єм розчину *водою Р* до позначки та перемішували. Відбирали 10,0 мл отриманого розчину та доводили до позначки в колбі місткістю 25,0 мл.

Хроматограма тестового зразка сиропу в запропонованих умовах наведена на рис. 4.13.

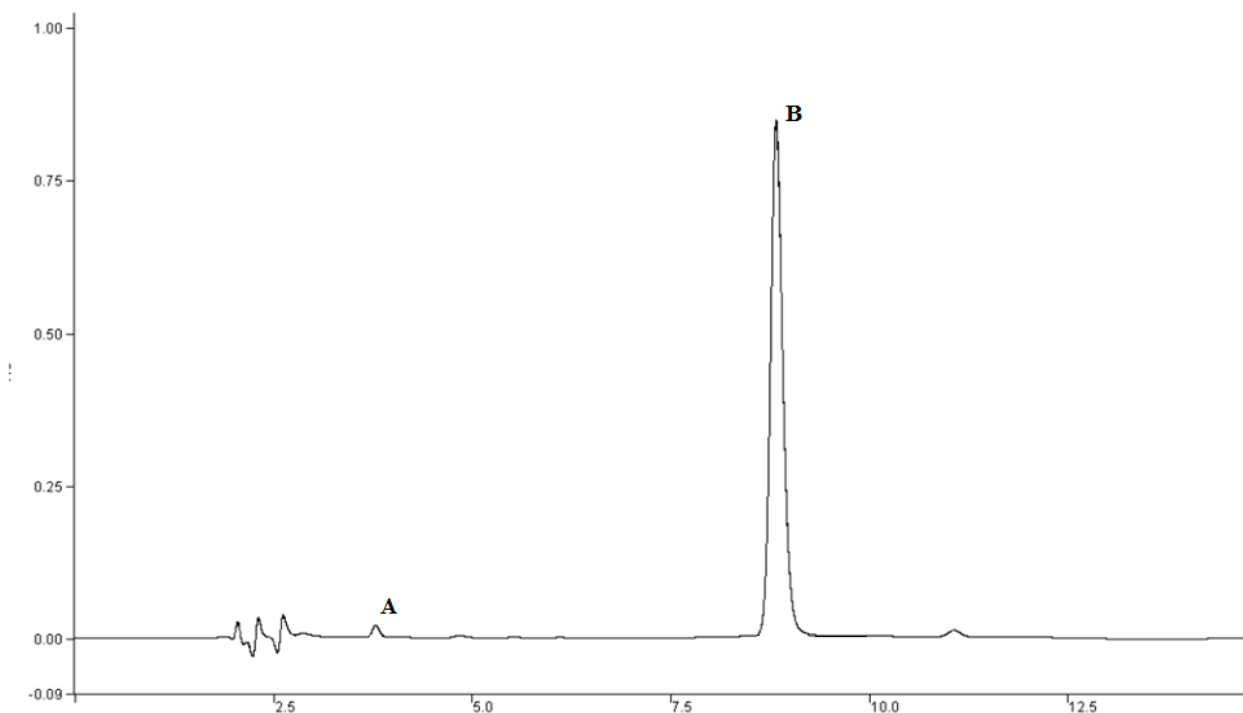


Рис. 4.13. Типова хроматограма випробовуваного розчину сиропу: А – сальбутамол сульфат, В – калію сорбат)

Показники придатності хроматографічної системи наведені в табл. 4.17.

Таблиці 4.17

Придатність хроматографічної системи для стандартного розчину сальбутамолу сульфату та калію сорбату

Критерій	Отримані результати		Вимоги
	Сальбутамол сульфат	Калій сорбат	
Кількість теоретичних тарілок (N)	8369	14971	Не менше 3000
Фактор асиметрії	1,16	1,19	В межах 0,8 – 1,5
RSD	0,64%	0,50%	Не більше 1,0%
Фактор розділення	21,0		Не менше 6,0

4.3.1.2 Валідація методики кількісного визначення сальбутамолу сульфату та калію сорбату

Розроблений метод був валідований відповідно до вимог ДФУ та настанови ІСН за лінійністю, точністю, специфічністю, стабільністю, межами виявлення та межами кількісного визначення.

Специфічність досліджували із застосуванням стандартного розчину сальбутамолу сульфату та калію сорбату, тестових розчинів, плацебо та бланк-розчину. Отримані результати показали відсутність впливу сиропної матриці на визначення досліджуваних піків речовин.

Дослідження *лінійності* проводилось на 9 модельних розчинах у діапазоні концентрацій від 80 до 120 % від номінального вмісту. Дані, одержані в ході дослідження лінійності, наведені в табл. 4.18. Також у таблиці наведені результати вивчення межі виявлення (МВ) та межі кількісного визначення (МКВ).

Таблиця 4.18

Показники лінійності, межі виявлення та межі кількісного визначення

Речовина	Калібрувальна крива	R^2 ($n=6$)	Концентрація (мкг/мл)	МВ (мкг/мл)	МКВ (мкг/мл)
Сальбутамол сульфат	$y=1,0117x-1,3073$	0,9997	16-24	0,42	1,28
Калію сорбат	$y=1,0079x-0,6512$	0,9997	64-96	0,017	0,053

Правильність визначали шляхом аналізу 9 модельних розчинів, у такому ж самому діапазоні концентрацій, що і *лінійність*. Розчини аналізували тричі на кожному рівні, відсоток визначення та RSD розраховували для кожної концентрації. RSD кожного рівня концентрацій був менше 0,51% для обох речовин, що підтверджує придатність методу. Аналітичні дані наведені в табл. 4.19.

Стабільність розчинів досліджували протягом 24 годин. Установлено, що розчини залишаються стабільними протягом цього часу, відхилення вмісту сальбутамолу сульфату та калію сорбату становили 0,44 та 0.26 % відповідно.

Таблиця 4.19

Параметри правильності розробленого методу

Концентрація (%)	Вимірний вміст (%)		RSD (%)		Знайдено (%)	
	Сальбутамол сульфат	Калію сорбат	Сальбутамол сульфат	Калію сорбат	Сальбутамол сульфат	Калію сорбат
80%	79,82	80,06	0,44	0,19	99,77	100,07
85%	84,38	84,9	0,23	0,34	99,27	99,88
90%	89,52	90,19	0,42	0,02	99,46	100,21
95%	94,78	95,05	0,26	0,71	99,77	100,05
100%	100,29	100,1	0,58	0,33	100,29	100,1
105%	105,06	105,07	0,22	0,46	100,05	100,07
110%	110,07	110,02	0,61	0,05	100,07	100,02
115%	114,99	115,8	0,57	0,66	100	100,69
120%	119,89	120,06	0,18	0,43	99,91	100,05
Середнє значення, Z , %					99,84	100,13
Відносне стандартне відхилення, S_z , %					0,32	0,23
Критичне значення для збіжності результатів, Δ_{AS} , %					1,6	
Відносний довірчий інтервал, Δ_z , % = $t(95\%,8) \cdot S_z$					0,16	0,13
Систематична похибка, δ , %					0,16	0,14
Критерій статистичної незначущості систематичної похибки, δ , %					$\leq 0,51$	

Прецизійність методу оцінювали протягом 2-х різних днів двома різними аналітиками. Дослідження проводили з використанням розчину, що мав концентрацію 100 % усіх досліджуваних компонентів, аналізували 6 разів. Відхилення вмісту для сальбутамолу сульфату та калію сорбату в перший день становило 0,53 та 0,61 % відповідно; на другий день – 1,15 та 0,98 % (табл. 4.20). За отриманими результатами, запропонований метод відповідає вимогам, оскільки критерії були менше 1,6 %.

Таблиця 4.20

Дані вивчення внутрішньолабораторної прецизійності

Речовина	Концентрація (мкг/мл)	Intra-day (n=6)			Inter-day (n=12)		
		Знайдено $\pm$ S.D.	RSD, %	Δ intra, %	Знайдено $\pm$ S.D.	RSD, %	Δ intra, %
Сальбутамолу сульфат	20	97,53 $\pm$ 0,56	0,61	0,53	96,56 $\pm$ 0,16	0,58	1,15
Калію сорбат	80	97,95 $\pm$ 0,48	0,43	0,61	97,70 $\pm$ 1,37	0,50	0,98

На підставі отриманих результатів було визначено, що методика відповідає встановленим вимогам і може бути використаною для кількісного дослідження сальбутамолу сульфату та калію сорбату.

4.3.1.3. Вивчення стабільності сиропу «Гедерин+»

Дослідження стабільності проводилось протягом 24-х місяців. Три різні серії сиропів від кашлю зберігали в пляшках із темного скла за температури $(25 \pm 2)^\circ \text{C}$ і вологістю повітря $(60 \pm 5)\%$ (табл. 4.21). Аналіз гедеракозиду С проводився з використанням ВЕРХ методу (розд. 2, п 2.4).

Таблиця 4.21

Дослідження стабільності для основних компонентів сиропу

Термін зберігання	Серія сиропу	Гедеракозид С (мкг/мл)	Сальбутамол сульфат (мкг/мл)	Калію сорбат (мкг/мл)
0 місяців	011	0,494 $\pm$ 0,022	0,483 $\pm$ 0,013	1,935 $\pm$ 0,096
	021	0,513 $\pm$ 0,019	0,471 $\pm$ 0,021	1,927 $\pm$ 0,095
	031	0,50 $\pm$ 0,023	0,475 $\pm$ 0,018	1,907 $\pm$ 0,094

Продовж. табл. 4.21

3 місяці	011	$0,496 \pm 0,017$	$0,481 \pm 0,021$	$1,933 \pm 0,092$
	021	$0,513 \pm 0,022$	$0,470 \pm 0,017$	$1,921 \pm 0,089$
	031	$0,501 \pm 0,024$	$0,473 \pm 0,021$	$1,903 \pm 0,093$
6 місяців	011	$0,487 \pm 0,021$	$0,480 \pm 0,018$	$1,922 \pm 0,094$
	021	$0,516 \pm 0,023$	$0,470 \pm 0,020$	$1,915 \pm 0,093$
	031	$0,500 \pm 0,019$	$0,473 \pm 0,021$	$1,899 \pm 0,091$
9 місяців	011	$0,487 \pm 0,021$	$0,481 \pm 0,08$	$1,907 \pm 0,092$
	021	$0,509 \pm 0,023$	$0,470 \pm 0,019$	$1,909 \pm 0,092$
	031	$0,498 \pm 0,020$	$0,470 \pm 0,023$	$1,894 \pm 0,090$
12 місяців	011	$0,486 \pm 0,015$	$0,480 \pm 0,021$	$1,888 \pm 0,089$
	021	$0,504 \pm 0,016$	$0,469 \pm 0,021$	$1,904 \pm 0,093$
	031	$0,497 \pm 0,022$	$0,469 \pm 0,019$	$1,882 \pm 0,091$
15 місяців	011	$0,484 \pm 0,014$	$0,479 \pm 0,017$	$1,886 \pm 0,091$
	021	$0,495 \pm 0,012$	$0,469 \pm 0,021$	$1,885 \pm 0,087$
	031	$0,488 \pm 0,020$	$0,469 \pm 0,022$	$1,878 \pm 0,085$
18 місяців	011	$0,485 \pm 0,021$	$0,477 \pm 0,021$	$1,877 \pm 0,086$
	021	$0,496 \pm 0,016$	$0,469 \pm 0,020$	$1,882 \pm 0,083$
	031	$0,483 \pm 0,018$	$0,469 \pm 0,019$	$1,869 \pm 0,081$
21 місяців	011	$0,484 \pm 0,023$	$0,476 \pm 0,019$	$1,858 \pm 0,083$
	021	$0,489 \pm 0,021$	$0,469 \pm 0,021$	$1,867 \pm 0,083$
	031	$0,483 \pm 0,016$	$0,469 \pm 0,020$	$1,851 \pm 0,084$
24 місяців	011	$0,487 \pm 0,023$	$0,479 \pm 0,022$	$1,845 \pm 0,082$
	021	$0,488 \pm 0,021$	$0,467 \pm 0,021$	$1,849 \pm 0,081$
	031	$0,482 \pm 0,021$	$0,468 \pm 0,020$	$1,840 \pm 0,083$

Дослідження стабільності показали, що вміст усіх компонентів був на задовільному рівні – не менше 95 % від зазначеного. Найбільші втрати були для калію сорбату – в середньому 4,1 % (відносно вихідного вмісту). Проте деградація калію сорбату в рідких лікарських формах не є критичною.

Результати узгоджуються з попередніми дослідженнями калію сорбату [36]. На відміну від калію сорбату гедеракозид С та сальбутамолу сульфату показали меншу ступінь деградації 3,37 та 1,05 % відповідно. Результати тривалих досліджень стабільності показали відсутність значної зміни кількості всіх компонентів та взаємодії між компонентами. Тому запропоновану комбінацію можна використовувати протягом 24-х місяців.

4.3.2 Визначення вмісту домішок сальбутамолу сульфату

Оскільки до складу аналізованого сиропу входить сальбутамолу сульфат, необхідне вивчення вмісту його домішок. Ці вимоги пояснюються тим, що під час синтезу АФІ використовуються різні компоненти, проміжні продукти та реагенти, що можуть потрапити у ЛЗ та викликати небажаний побічний ефект. Тому контроль домішок у синтетичній речовині та її препаратах відіграє важливу роль у забезпеченні пацієнтів безпечними ЛЗ [39, 114]. Спосіб визначення домішок, наведений в ЄФ, й літературні джерела пропонують використання ВЕРХ методу для кількісного визначення домішок сальбутамолу сульфату з УФ-детектором [27, 55, 111, 125]. Також можуть бути використані ВЕРХ метод із мас-детектором [181] та ГХ-МС [175]. Проте жодне із джерел не описує метод для аналізу домішок сальбутамолу сульфату в поєднанні з рослинним екстрактом, що ускладнює проведення аналізу. Більше того, жодна з раніше проведених робіт не визначала у тривалій перспективі стабільність ЛЗ, до складу яких входить сальбутамол сульфат.

4.3.2.1 Розробка методу визначення домішок сальбутамолу сульфату

Можливі домішки сальбутамолу дуже схожі на нього за фізико-хімічними властивостями, що ускладнює проведення аналізу [88]. Для досягнення відповідної роздільної здатності серед усіх компонентів були протестовані різні умови хроматографування.

Зокрема, було вивчено вплив сорбентів різних стаціонарних фаз (C8 та C18), а також розмір їх часток (3 та 5 мкм). Стаціонарна фаза C18 із розміром часток 5 мкм була визнана найбільш придатною для поділу компонентів досліджуваної комбінації. Також були досліджені дві різні солі в різних концентраціях – ацетат амонію (5 – 25 ммоль) та натрію дигідрофосфат (5 – 50 ммоль) з різними значеннями рН 3,0 – 6,0 як можливі компоненти рухомої фази. Проте розділення деяких домішок з іншими компонентами комбінації залишалося незадовільним. Солі були замінені на триетиламін або трифтороцтову кислоту. За результатами експерименту найбільшу роздільну здатність серед інших рухомих фаз показав водний розчин із триетиламіном, доведеним оцтовою кислотою до рН 5,5.

Метанол Р та *ацетонітрил Р* були обрані як компоненти рухомої фази В. Чистий *метанол Р* давав погану базову лінію та неприйнятну форму досліджуваних піків. Тому для поліпшення результату був використаний *ацетонітрил Р*. Оптимальне співвідношення було встановлено як 50:50 (об/об).

Хроматографічний аналіз було здійснено як описано в методиці 12 (розд. 2, п 2.4). Приготування розчинів виконували таким чином:

Розчин порівняння. Усі речовини були розчинені у воді так, щоб отримати наступні концентрації: сальбутамол сульфат – 400 мкг/мл, калію сорбат – 2 мг/мл і по 1,8 мкг/мл для кожної домішки сальбутамолу D, F та G.

Випробовуваний розчин. 15,0 мл сиропу переносили у мірну колбу місткістю 20,0 мл та доводили до мітки *водою Р*, після чого його ретельно перемішували.

4.3.2.2 Валідація розробленого методу визначення домішок сальбутамолу сульфату

Розроблений метод було валідовано відповідно до ДФУ.

Специфічність. Дослідження підтвердили відсутність впливу на визначення основних речовин у сиропі. Ідентифікація компонентів

проводилася шляхом порівняння часу утримування піків із тестового розчину та часу утримування піків із розчину порівняння.

Межа виявлення. Дослідження чутливості проводили шляхом аналізу приготованого розчину з концентрацією сальбутамолу сульфату (36 нг/мл), що становило 0,01 % від його кількості в досліджуваному розчині. Отримане співвідношення сигнал/шум для основного піка було більше 3/1, отже, метод може вважатися чутливим.

Робасність. Дослідження робасності проводилось при зміні температури колонки (30 – 40 °C), швидкості потоку (0,9 – 1,1 мл / хв) та рН мобільної фази А (5,0 – 6,0) (табл. 4.22, рис. 4.14). Отримані результати показали, що основний вплив на систему має рН мобільної фази, оскільки за високих значень рН не спостерігалось поділу між піками сальбутамолу сульфату та допоміжних речовин.

Таблиця 4.22

Вивчення робасності методики для визначення домішок сальбутамолу сульфату

Зміни	Параметри	Сальбута- мол сульфат	Доміш- ка D	Калію сорбат	Доміш- ка G	Доміш- ка F
1	2	3	4	5	6	7
0.9 мл/хв	Час утримування	11,03 хв	14,43 хв	15,05 хв	15,59 хв	19,49 хв
	Розділення	–	13,694	2,596	2,2	17,603
	Кількість теоретичних тарілок (КТТ)	26018	66838	55667	73383	133671
	Фактор асиметрії	1,595	0,849	0,881	1,055	1,257
1.1 мл/хв	Час утримування	9,95 хв	13,16 хв	13,58 хв	14,42 хв	18,49 хв
	Розділення	–	14,552	1,948	3,559	20,556
	КТТ	27507	68813	51471	63125	196818
	Фактор асиметрії	1,493	1,272	0,98	1,560	1,301
30 C	Час утримування	10,85 хв	14,33 хв	14,60 хв	15,26 хв	19,43 хв
	Розділення	–	17,437	1,372	2,674	18,386
	КТТ	30670	143687	54499	62339	138268
	Фактор асиметрії	1,486	0,727	0,958	1,109	1,332

Продовж. табл. 4.22

1	2	3	4	5	6	7
40 C	Час утримування	10,05 хв	13,18 хв	13,89 хв	14,68 хв	18,53 хв
	Розділення		13,488	3,177	3,976	25,42
	КТТ	26344	59661	54474	143619	236692
	Фактор асиметрії	1,493	1,437	0,963	0,966	1,418
pH 6.0	Час утримування	11,18 хв	—	11,54 хв	—	—
	Розділення	—	—	1,578	—	—
	КТТ	42542	—	39994	—	—
	Фактор асиметрії	1,351	—	1,140	—	—
pH 5.0	Час утримування	10,56 хв	13,69 хв	13,97 хв	16,16 хв	17,44 хв
	Розділення	—	11,307	0,903	7,721	2,162
	КТТ	35157	27997	35222	57158	5879
	Фактор асиметрії	1,491	—	0,907	—	—

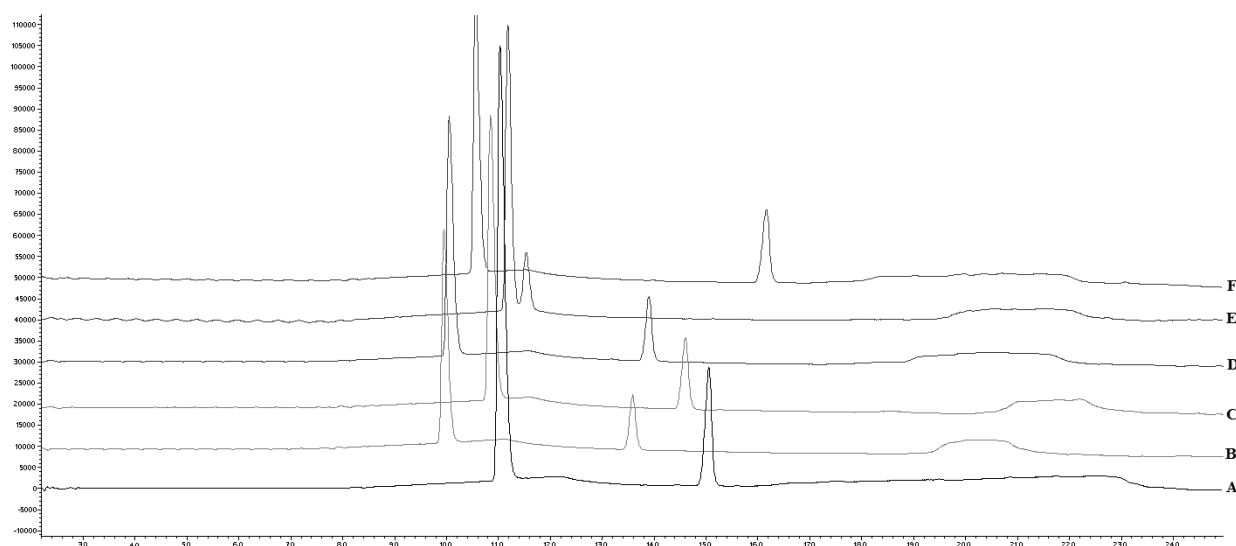


Рис. 4.14. Хроматограми вивчення робастності: А – 0,9 мл/хв, В – 1,1 мл/хв, С – 30°C, D – 40°C, Е – 6,0 рН, F – 5,0рН

Вивчення деградації. Для підтвердження специфічності та визначення профілю можливих домішок проводили деградацію субстанції сальбутамолу сульфату у стресових умовах. Було зроблено чотири різні деградації: лужна, кислотна, температурна та пероксидна. За дослідженням деградації було визначено, що жодні інші компоненти та потенційні продукти деградації і домішки не впливали на результати визначення. Результати наведені в табл. 4.23 та рис. 4.15.

Таблиця 4.23

Результати проведеної деградації для субстанції сальбутамолу
сульфату

	0.1 M NaOH	0.1 M HCl	3 % H ₂ O ₂	Температура (100°)
Невизначена домішка (НД) 1 (14,47 хв)	-	0,18%	-	-
НД 2 (9,69 хв)	-	-	1,91%	-
НД 3 (10,44 хв)	-	-	1,49%	-
НД 4 (13,59 хв)	-	-	0,26%	-
НД 5 (13,72 хв)	-	-	0,27%	-
НД 6 (15,99 хв)	-	-	0,86%	-
НД 7 (16,82 хв)	-	-	0,95%	-
Домішка D (13,43 хв)	1,59%	-	0,24%	2,66%
Домішка G (15,55 хв)	3,15%	-	0,78%	-
Домішка F (18,35 хв)	-	-	-	-
Сума домішок	4,74%	0,18%	6,79%	2,66%

Як видно з результатів, сальбутамол сульфат не був стійким до впливу температури, лужного гідролізу та окиснення. Вплив перекису був найбільшим, при цьому детектувалася найбільша кількість неідентифікованих домішок. З іншого боку, найбільша кількість домішок D і G була знайдена після обробки розчину лугом.

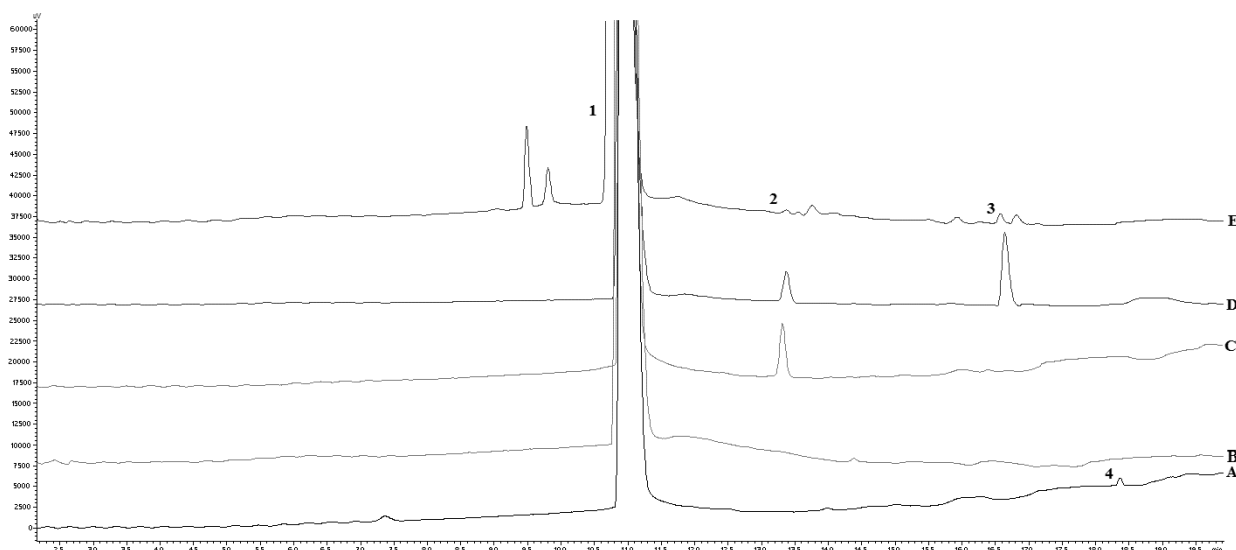


Рис. 4.15. Хроматограми дослідження деградації: А – субстанція сальбутамолу сульфату, В – в умовах кислотної деградації, С – в умовах температурної деградації, D – в умовах лужної деградації, Е – в умовах пероксидної деградації; 1 – сальбутамол сульфат, 2 – домішка D, 3 – домішка G, 4 – домішка F

4.3.2.3 Визначення супутніх домішок сальбутамолу сульфату в сиропі «Гедерин+» під час дослідження стабільності

Тривалі дослідження стабільності проводили протягом 24-х місяців, одержані результати наведені в табл. 4.24 та на рис. 4.16. Умови зберігання сиропу такі самі як зазначено в розділі 4, п. 4.3.1.3.

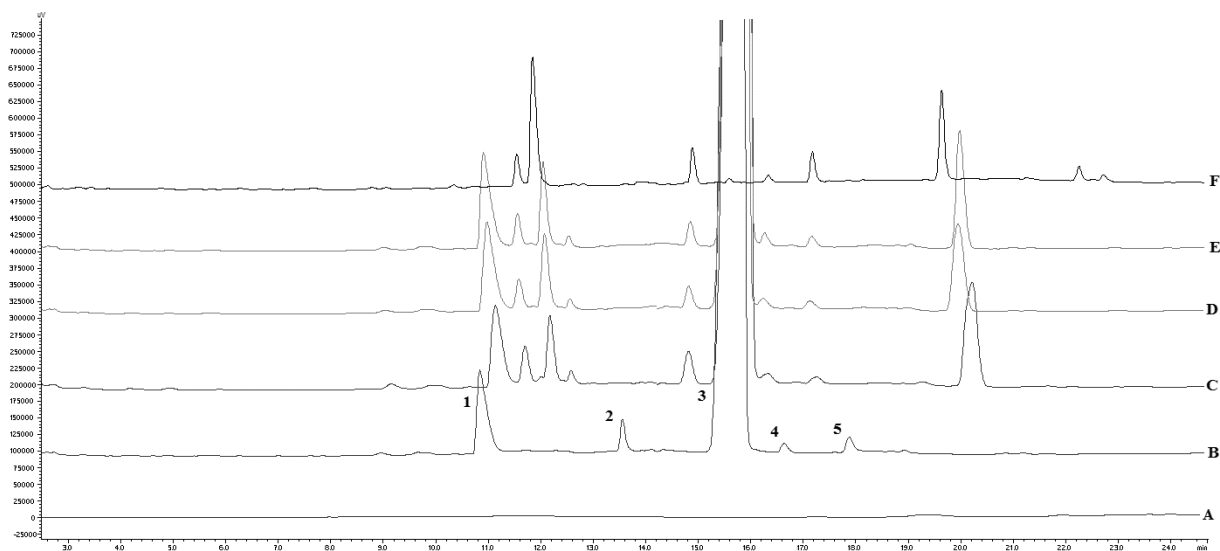


Рис. 4.16. Типові хроматограми аналізованих зразків та розчину порівняння: А – бланк, В – розчин порівняння, С – 011 серія сиропу, D – 021 серія сиропу, E – 031 серія сиропу; F – плацебо, що містить екстракт листя плюща, 1 – сальбутамолу сульфат, 2 – домішка D, 3 – калію сорбат, 4 – домішка G, 5 – домішка F

Отримані результати свідчать про те, що сироп містить лише домішку F та деякі неідентифіковані домішки, їх концентрація не перевищує встановлені ліміти і не збільшується суттєво в процесі зберігання. Інші домішки в процесі зберігання не утворюються, тому сироп можна вважати стабільним протягом 24 місяців зберігання.

Таблиця 4.24.

Результати визначення супутніх домішок сальбутамолу сульфату в сиропі «Гедерин+»

Термін зберігання	Серія сиропу	Домішка D (%)	Домішка G (%)	Домішка F (%)	Сума домішок (%)
0 місяців	011	н/в	н/в	0,039	0,052
	021	н/в	н/в	0,043	0,061
	031	н/в	н/в	0,041	0,055
3 місяці	011	н/в	н/в	0,04	0,057
	021	н/в	н/в	0,042	0,063
	031	н/в	н/в	0,041	0,057
6 місяців	011	н/в	н/в	0,04	0,058
	021	н/в	н/в	0,042	0,065
	031	н/в	н/в	0,042	0,06
9 місяців	011	н/в	н/в	0,04	0,06
	021	н/в	н/в	0,043	0,066
	031	н/в	н/в	0,042	0,062
12 місяців	011	н/в	н/в	0,04	0,067
	021	н/в	н/в	0,043	0,067
	031	н/в	н/в	0,041	0,065
15 місяців	011	н/в	н/в	0,04	0,067
	021	н/в	н/в	0,044	0,069
	031	н/в	н/в	0,041	0,067
18 місяців	011	н/в	н/в	0,04	0,069
	021	н/в	н/в	0,043	0,069
	031	н/в	н/в	0,041	0,07
21 місяців	011	н/в	н/в	0,04	0,07
	021	н/в	н/в	0,043	0,072
	031	н/в	н/в	0,041	0,073
24 місяців	011	н/в	н/в	0,04	0,073
	021	н/в	н/в	0,043	0,075
	031	н/в	н/в	0,041	0,075

Висновки до розділу 4

1. Було проведено дослідження хімічного складу препаратів листя плюща звичайного і визначено 20 різних компонентів, які належали до фенольних кислот, флавоноїдів і тритерпенових сапонінів. На підставі отриманих даних, для проведення стандартизації цієї групи ЛЗ запропоновано такі речовин-маркерів: гедеракозид С, хлорогенова кислота та гіперозид. Гедеракозид мав найвищі показники та мав середні концентрації поміж препаратів листя плюща ($7529,42 \pm 393$) мкг. Хлорогенова кислота була домінуючою речовиною серед усіх фенольних кислот, найбільший її вміст було знайдено в таблетках «Проспан» з концентрацією ($1177,73 \pm 29,57$) мкг. Гіперозид в середньому був в межах від ($294,25 \pm 27,54$) до ($540,55 \pm 13,89$) мкг.

2. Відповідно до отриманих результатів кількісного вмісту речовин була проведена порівняльна характеристика препаратів *H. helix*. Усі значення знаходилися в діапазоні 0,973-0,999, що демонструє високий ступінь кореляції між зразками. Це пояснюється тим, що загальний профіль речовин є в усіх зразках незалежно від виробників та лікарських форм. Це свідчить про високу схожість між ЛЗ, а також між їх терапевтичним ефектами.

3. Для проведення контролю якості нових препаратів – капсул «Гедерин» та сиропу «Гедерин+» – було розроблено нові ВЕРХ, УВЕРХ та ВЕТШХ методи. Для визначення найбільш прийнятного, їх оцінювали за аналітичною точністю, вартістю застосування та впливу на навколишнє середовище. Серед усіх зазначених методів найбільш багатообіцяючим виявився УВЕРХ, оскільки він був дешевшим за ВЕРХ метод у 1,44 рази, а також більш екологічним, ніж ВЕТШХ і з високою аналітичною точністю.

4. Стабільність багатокомпонентного препарату сироп «Гедерин+» вивчалася протягом 24 місяців. Сталість кількісного вмісту речовин перевіряли з використання розроблених ВЕРХ. Найбільші втрати були для калію сорбату – в середньому 4,1 % (відносно вихідного вмісту). З іншого боку

гедеракозид С та сальбутамолу сульфат мали менший ступінь деградації – 3,37 та 1,05 %, відповідно. Також проведено визначення профілю та вмісту домішок сальбутамолу сульфату. Тільки домішка F була присутня в препараті, проте її рівень не збільшувався протягом 24 місяців. Тому можна зробити висновок, що багатокомпонентний сироп «Гедерин+» залишається стабільним протягом 24 місяців.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі викладено вирішення наукової задачі, що полягала у розробці та оцінці методів контролю якості лікарських засобів, вивченні хімічного складу і стандартизації вихідної рослинної сировини, дослідженні антиоксидантної активності компонентів досліджуваних об'єктів.

1. У результаті проведеного аналізу встановлено, що препаратам плюща належить найбільша частка серед рослинних відхаркувальних лікарських засобів. Вони представлені різноманітними лікарськими формами, серед яких найбільшу частку мають сиропи (52,39 %), зустрічаються капсули (14,29 %), краплі (9,52 %), розчини від кашлю (9,52 %), таблетки (9,52 %) та пастилки (4,76 %). Для підтвердження якості цих препаратів сучасні вимоги регламентують проведення кількісного визначення гедеракозиду С.

2. Двадцять одну серію листя плюща звичайного було використано для дослідження складу компонентів. Під час дослідження були виявлені різні групи речовин: тритерпенові сапоніни, флавоноїди, фенольні кислоти та амінокислоти. Серед усіх знайдених компонентів найбільший вміст мав гедеракозид С. Його концентрація коливалася від 3807,7 (м. Сіракузи. Італія) до 79737,3 мкг/г (м. Варшава. Польща). Також високі концентрації мали хлорогенова та 3,5-дикофеїлхінна кислоти, їх кількість значно варіювалась від $(325,796 \pm 10,062)$ мкг/г до $(8630,058 \pm 12,517)$ мкг/г і від $(450,013 \pm 21,562)$ мкг/г до $(23866,566 \pm 863,267)$ мкг/г відповідно. Гіперозид переважав серед інших флавоноїдів знайдених у листі плюща, його концентрації були в межах від $(45 \pm 1,2)$ мкг/г до $(4750,9 \pm 7,6)$ мкг/г. Із вивченого складу компонентів для стандартизації як додаткові речовини-маркери можна також використовувати хлорогенову кислоту та гіперозид. Вміст цих речовин був високим у кожному з вивчених зразків, крім того, їх фармакологічні властивості вигідно доповнюють терапевтичний ефект тритерпенових сапонінів.

3. За допомогою кореляційного аналізу були встановлені параметри навколишнього середовища, які найбільше впливають на накопичення

речовин в *H. helix*. А саме, накопичення тритерпенових сапонінів статистично достовірно (помірно негативно) залежало від тривалості сонячного світла, типу ґрунту та типу клімату. Оптимальні показники для накопичення тритерпенових сапонінів наступні — кількість сонячних годин 1600-1800 на рік, ґрунт лувізол та помірно вологий клімат (тип Dfb за класифікацією Кеппена). Подібні закономірності виявлено і для флавоноїдів за винятком того, що оптимальним типом ґрунту виявився альбувезол. На накопичення фенольних кислот серед усіх факторів впливав лише тип ґрунту, найбільший вміст БАР цієї групи виявлено у зразках рослин, що зростали на ґрунті лувізол. Загальний вміст амінокислот залежав здебільшого від клімату та кількості сонячних годин.

4. Для проведення більш швидкого вхідного контролю сировини листя плюща на виробництві були розроблені ВЕРХ та УВЕРХ методи. Порівняно з ВЕРХ методом, який пропонується ДФУ, час аналізу зменшився до 20 хв для ВЕРХ і 10 хв для УВЕРХ. Обидва методи були валідовані за такими параметрами, як лінійність, правильність, специфічність, внутрішньолабораторна прецизійність, робасність; також були виміряні межі виявлення та кількісного визначення.

5. Визначення додаткових речовин-маркерів препаратів плюща звичайного було проведено на різних ЛФ: сиропях, капсулах, таблетках та краплях. Серед усього профілю визначених речовин можна виділити гедеракозид С, хлорогенову кислоту та гіперозид. Гедеракозид мав найвищі показники та мав середні концентрації поміж препаратів листя плюща — $7529,42 \pm 393$, мкг. Хлорогенова кислота була домінуючою речовиною серед усіх фенольних кислот, найбільший її вміст було знайдено в таблетках «Проспан» з концентрацією $1177,73 \pm 29,57$ мкг. Гіперозид в середньому був в межах від $(294,25 \pm 27,54)$ до $(540,55 \pm 13,89)$ мкг. Оскільки ці компоненти співпадають для лікарських засобів та рослинної сировини плюща звичайного, це полегшує процес стандартизації, тобто є можливість використовувати одну методику для проведення аналізу.

6. Антиоксидантна активність компонентів була вивчена з використанням *in vitro* ВЕРХ/ABTS методу, за допомогою якого в рослинній сировині вдалося знайти від 85 до 97 % речовин антиоксидантів. Хлорогенова кислота та 3,5-дікофеїлхінова кислота відповідали за 80 % загальної активності. Інші речовини розташувалися у такому порядку: неохлорогенова кислота > гіперозид > 3,4-дікофеїлхінова кислота. Для препаратів результати трохи відрізнялись. Так, неохлорогенова кислота, хлорогенова кислота та гіперозид виявляли антиоксидантну активність у кожному зразку. Крім того, 3,4-дікофеїлхінова та 4,5-дікофеїлхінова кислоти виявляли значну активність, проте вони були знайдені лише в капсулах та краплях від кашлю. Тому хлорогенову кислоту можна рекомендувати як основний маркер, який забезпечує антиоксидантний ефект препаратів листя плюща звичайного.

7. Розроблені три різні хроматографічні методи (ВЕРХ, УВЕРХ та ВЕТШХ) для кількісного визначення гедеракозиду С у капсулах «Гедерин» та сиропі «Гедерин+». Оскільки до складу сиропу «Гедерин+», крім рослинного екстракту входять синтетичні речовини (сальбутамол сульфат та калію сорбат), було розроблено ВЕРХ методи для їхньої кількісної оцінки та визначення рівня домішок сальбутамолу сульфату. Всі розроблені методи були валідовані, що підтверджує можливість їхнього застосування для контролю якості капсул «Гедерин» та сиропу «Гедерин+». Стабільність сиропу «Гедерин+» вивчалась протягом 24 місяців, для доведення відсутності взаємодії між компонентами. Найбільші втрати були детектовані для калію сорбату, його вміст зменшився на 4,1 %. Інші компоненти виявили більшу стійкість (зменшення вмісту гедеракозиду С – 3,37 % та сальбутамолу сульфату – 1,05%). Визначення рівня домішок сальбутамолу сульфату встановило, що жодна домішка не перевищувала встановленого рівня (більше 0,1% для неспецифічної та більше 0,3 % для домішок D, G, F). Тому можна зробити висновок, що багатокомпонентний сироп «Гедерин+» залишається стабільним протягом 24 місяців.

8. Запропоновані основні параметри, за якими можна проводити оцінку методів контролю якості лікарських засобів для визначення пріоритетів їх застосування, на прикладі розроблених методів для кількісного визначення гедеракозиду С у капсулах «Гедерин» та сиропі «Гедерин+». До них можна віднести аналітичну точність, собівартість проведення аналізу та відсутність негативного впливу на навколишнє середовище та здоров'я працівників. За результатами дослідження кожен метод має необхідну точність для використання в аналізі. За собівартістю застосування методи розташовувалися у наступному порядку: 6,75 (ВЕРХ) > 4,77 (УВЕРХ) > 2,96 (ВЕТШХ) євро/зразок. Нижча вартість ВЕТШХ методу обумовлена можливістю проведення аналізу для декількох зразків одночасно. За екологічністю методи ВЕРХ та УВЕРХ мали рівні показники в середньому 81 за екошкалою, в той час як ВЕТШХ – 57, що вказує на значну перевагу перших двох методів за даним показником.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. База даних нормативно-директивних документів Міністерства охорони здоров'я України. URL: <http://mozdocs.kiev.ua/> (дата звернення: 06.08.2020).
2. Безрук І. В., Гриненко В. В., Георгіянц В. А., Іванаускас Л. Визначення впливу кліматичних умов на вміст біологічно активних речовин в листі плюща. *PLANTA+. досягнення та перспективи* : матеріали міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої пам'яті доктора хімічних наук, професора Ніни Павлівни Максютіної (до 95-річчя від дня народження), м. Київ, 20-21 лютого 2020 р. 2020. С.59-60.
3. Безрук І. В., Матерієнко А. С., Вракін В. О., Георгіянц В. А. Валідація спектрофотометричної методики визначення тетрацикліну гідрохлориду в складі екстемпоральної мазі. *Всеукраїнський медичний журнал молодих вчених ХИСТ*. 2017. № 19. С. 493.
4. Біоекологічні особливості плюща звичайного *Hedera helix* L. та його форм в умовах Заходу України : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. с.-г. наук : спец. 06.03.01 «Лісові культури, селекція, насінництво» / Горбенко Н. Є.// – Львів – 2001 р. – 17 с.
5. Державна Фармакопея України : в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків : Держав-не підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. Т. 3. 732 с.
6. Державна Фармакопея України : в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків : Держав-не підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. Т. 1. 1128 с.
7. Зузук Б. М., Куцик Р. В., Зузук Л. И. Плющ вьющийся. *Hedera helix* L. (Аналитический обзор). *Провизор*. 2003. № 11. С. 26-30.

8. Зупанец І. А., Бездетко Н. В., Безуглая Н. П. Зайченко А. В. Фармацевтическая опека больных с простудными заболеваниями. Кашель. *Клінічна фармація*. 2001. № 4 (5). С. 8-13.
9. Компендіум. Лікарські засоби. Режим доступу: <https://compendium.com.ua/uk/atc/>. (дата звернення 19.08.2020).
10. Мазнев Н. И. Лекарственные растения: 15000 наименований лекарственных растений, сборов и рецептов. Описания, свойства, применение, противопоказания. М.: ООО ИКТУ «Лада», ООО НД «РИПОЛ классик», ООО Издательство «ДОМ. XXI век», 2006. 1056 с.
11. Лікарські рослини. Енциклопедичний довідник / А. М. Гродзінський. Київ: Олімп 1992. 544 с.
12. Луценко Ю. О., Черпак О. М., Дармограй Р. Є. Анатомічна будова листя плюща звичайного. *Фармацевтичний журнал*. 2010. № 4. С. 106–111.
13. Луценко Ю. О., Дармограй Р. Є., Сімонов М. Р. Дослідження амінокислотного складу листя плюща звичайного. *Запорозький медичний журнал*. 2010. № 3 (12). С. 110-112.
14. Паламар А. О., Богдан Н. С., Горошко О. М., Василичук О. Я. Плющ звичайний: ботанічна характеристика, хімічний склад, фармакологічні властивості та перспективи застосування (огляд літератури). *Південноукраїнський медичний науковий журнал*. 2017. №. 43 С. 64–67.
15. Пруд А. М., Шостак Л. Г. Дослідження структури ринку лікарських засобів, що виявляють відхаркувальну дію. *Молодий вчений*. 2019. № 3 (2). С. 268–270.
16. Режим доступу: <https://bank.gov.ua/markets/exchangerate-chart?cn%5B%5D=EUR&startDate=07.10.2018&endDate=14.10.2019> (дата звернення 13.09.2019).
17. Ковальов В. М., Павлій О. І., Ісакова Т. І. Фармакогнозія. Харків: «Прапор» НФАУ, 2000. 704 с.
18. «ICH harmonised tripartite guideline Q2(R1). Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1),» in Proceedings of the International

Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland, 2005.

19. A. Gałuszka, Z.M. Migaszewski, P. Konieczka, J. Namieśnik Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2012. № 37. P. 61-72.

20. Agrell J., Oleszek W., Stochmal A., Olsen M., Anderson P. Herbivore-induced responses in alfalfa (*Medicago sativa*). *J Chem Ecol.* 2003. № 29. P. 303–320.

21. Al-Snafi A.E. Pharmacological and therapeutic activities of *Hedera helix*-A review. *IOSR Journal Of Pharmacy.* 2018. № 8. P. 41-53.

22. Aly F. A., EL-Enany N., Elmansi H., Nabil A. A. Validated Reversed-Phase HPLC Method for Simultaneous Determination of the antihistaminic Cetirizine and Beta2-adrenergic agonist Salbutamol in their Co-formulated Tablets. *SM Anal Bioanal Technique.* 2017. № 2 (2). P. 10-11.

23. Andrzejowski P., Carroll W. Salbutamol in paediatrics: pharmacology, prescribing and controversies. *Archives of Disease in Childhood - Education and Practice.* 2016. № 101. P. 194-197.

24. Anwar-Hossain M., Hoque M.A., Burritt D.J., Fujita M. Proline Protects Plants Against Abiotic Oxidative Stress: Biochemical and Molecular Mechanisms, in: Oxidative Damage to Plants. *Antioxidant Networks and Signaling.* Elsevier Inc. 2014. № 39. P. 477–522. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00016-2>.

25. Assessment report on *Hedera helix* L., folium EMA/HMPC/325715/2017.

26. Bardgett R. D. Plant-soil interactions in a changing world. *F1000 Biol Rep.* 2011. № 3. P. 1-16.

27. Beaulieu N., Cyr T.D., Lovering E.G. Liquid chromatographic methods for the determination of albuterol (salbutamol), albuterol sulphate and related compounds in drug raw materials, tablets and inhalers. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1990. № 8. P. 583-589.

28. Bedir E., Kırmızıpekmez H., Sticher O., Çalış İ.. Triterpene saponins from the fruits of *Hedera helix*. *Phytochemistry*. 2000. № 53. P. 905–909. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00503-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00503-8).
29. Bezruk I., Georgiyants V., Ivanauskas L. Comparison of components profile in herbal raw material, extract and pharmaceuticals of *hedera helix*. *Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science»*. 2020. № 4 (26). P. 36-39.
30. Bezruk I., Kotvitska A., Korzh I., Materiienko A., Gubar S., Budanova L., Ivanauskas L., Vyshnevsky I., Georgiyants V. Combined Approach to the Choice of Chromatographic Methods for Routine Determination of Hederacoside C in Ivy Leaf Extracts, Capsules, and Syrup. *Sci. Pharm.* 2020. № 88 (24) <https://doi.org/10.3390/scipharm88020024>
31. Bezruk I., Marksa M., Georgiyants V., Ivanauskas L., Raudone L. Phytogeographical profiling of ivy leaf (*Hedera helix* L.). *Industrial Crops and Products*. 2020. № 154, 10.1016/j.indcrop.2020.112713.
32. Bezruk I., Vrakin V., Savchenko L., Materiienko A., Georgiyants V. Development and validation of tetracycline hydrochloride assay procedure by spectrophotometry in compounded ointment. *Scripta Scientifica Pharmaceutica*. 2017. № 4(1). P. 33-38. doi:<http://dx.doi.org/10.14748/ssp.v4i1.2117>.
33. Biopharmazeutische Charakterisierung von Efeublattertrockenextrakten durch in vivo und in vitro Studien / Schmidt O // Dissertation. Heidelberg:Ruprecht-Karls-Universiat. (2003).
34. Botterweck A., Verhagen H., Goldbohm R., Kleinjans J., Brandt P.V.D. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands Cohort Study. *Food Chem. Toxicol.* 2000. № 38. P 599–605.
35. Brazier N. C., Levine M. A. Drug-herb interaction among commonly used conventional medicines: a compendium for health care professionals. *Am. J. Ther.* 2003. № 10. P. 163–169.
36. Byrne J., Velasco-Torrijosb T., Reinhardt R. Development and validation of a novel stability-indicating HPLC method for the simultaneous assay

of betamethasone-17-valerate, fusidic acid, potassium sorbate, methylparaben and propylparaben in a topical cream preparation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2014. № 5. P. 111–117.

37. Calculation of production cost of products (works, services) // Balance. 2013. № 20 (1267). P. 8-9.

38. Carratù B., Boniglia C., Giammarioli S., Mosca M., Sanzini E. Free amino acids in botanicals and botanical preparations. *J. Food Sci.* 2008. № 73. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00767.x>.

39. Churiand S. K., Lokhande M. V. Identification and Impurity Profiling of Process Related Impurities In DTPEE, *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. 2017. № 4(9). P. 617-623.

40. Cicco N., Lanorte M.T., Paraggio M., Viggiano M., Lattanzio V. A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal*. 2009. № 91(1). P. 107-110.

41. Copaja S.V., Blackburn C., Carmona R. Variation of saponin contents in *Quillaja saponaria* Molina. *Wood Sci Technol*. 2003. № 37. P. 103–110.

42. Costa A. C. O., Perfeito L. S., Tavares M. F. M., Micke, G. A. Determination of sorbate and benzoate in beverage samples by capillary electrophoresis—Optimization of the method with inspection of ionic mobilities. *J. Chromatogr A*. 2008. № 1204. P. 123–127.

43. Crespin F., Elias R., Morice C., Ollivier E., Balansard G., Faure R. Identification of 3-O- β -D-glucopyranosyl hederagenin from the leaves of *Hedera helix*. *Fitoterapia LXVI*. 1995. № 5. P. 477.

44. Cwientzek U., Ottillinger B., Arenberger P. Acute bronchitis therapy with ivy leaves extracts in a two-arm study . A double-blind , randomised study vs . an other ivy leaves extract. *Phytomedicine*. 2011. № 18. P. 1105–1109. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.06.014>.

45. Czygan F.C. *Hedera helix* L. *Der Efeu Zeitschr Phytother*. 1990. № 11. P. 133-138.

46. Delmas F., Di Giorgio C., Elias R., Gasquet M., Azas N., Mshvildadze V., Dekanosidze G., Kemertelidze E., Timon-David P. Antileishmanial activity of three saponins isolated from ivy, α -hederin, β -hederin, and hederacolchiside A1, as compared to their action on mammalian cells cultured in vitro. *Planta Med.* 2000. № 66. P. 343–347.
47. Demirci B., Goppel M., Demici F. HPLC profiling and quantification of active principles in leaves of *Hedera helix* L. *Pharmazie* 2004. № 10. P. 770–774.
48. Deng Y., Zhao Y., Padilla-Zakour O., Yang G., Polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of leaf and bark extracts of *Solidago canadensis* L. *Ind. Crops Prod.* 2015. № 74. P. 803–809. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.06.014>.
49. Djordjevic S. M. From Medicinal Plant Raw Material to Herbal Remedies, in: Aromatic and Medicinal Plants. *Back to Nature. InTech.* 2017. <https://doi.org/10.5772/66618>.
50. Dorman H., Peltoketo A., Hiltunen R., Tikkanen M. Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chem.* 2003. № 83. P. 255–262.
51. dos Santos M. D., Almeida M. C., Lopes N. P., de Souza G. E. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid, *Biol Pharm Bull.* 2006. № 29 2236e40.
52. Edoga H. O., Okwu D. E., Mbaebie B. O. Phytochemicals constituents of some Nigerian medicinal plants. *Afr. J. Biotechnol.* 2005. № 4 (7). P. 685-688.
53. Engin A. B., Bukan N., Kurukahvecioglu O., Memis L., Engin A. Effect of butylated hydroxytoluene (E321) pretreatment versus l-arginine on liver injury after sub-lethal dose of endotoxin administration. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2011. № 32. P. 457–464.
54. Ernst E. Possible interactions between synthetic and herbal medicinal products. Part 1: a systematic review of the indirect evidence. *Perfusion.* 2000. № 13. P. 2200–2211.

55. Erram S. V., Fanska C. B., Asif M. Determination of albuterol sulfate and its related substances in albuterol sulfate inhalation solution, 0.5% by RP-HPLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006. № 40. P. 864-874.
56. European Parliament and Council Directive No. 95/2/EC on food additives other than colours and sweeteners, 2005.
57. European Pharmacopoeia 10, 2019. Srasbourg.
58. Fazio S., Pouso J., Dolinsky D., Fernandez A., Hernandez M. Tolerance, safety and efficacy of *Hedera helix* L. extract in inflammatory bronchial diseases under clinical practice conditions : A prospective , open , multicentre postmarketing study in 9657 patients. *Phytomedicine*. 2009. № 16. P. 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2006.05.003>.
59. Felix F. S., Quintino M. S. M., Carvalho A. Z., Coelho L. H. G., do Lago C. L., Angnes L. Determination of salbutamol in syrups by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection (CE-C4D). *J Pharm and BiomAnal.* 2006. № 40. P. 1288-1292.
60. Fugh-Berman A., Ernst E. Herb-drug interactions: review and assessment of report reliability. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2001. № 52. P. 587–595.
61. Gafner F., Reynolds G.W., Rodriguez E. The diacetylene 11, 12-dehydrofalcarinol from *Hedera helix*. *Phytochemistry* 1989. № 28(4). P. 1256-1257.
62. Gepdiremen A., Mshvildadze V., Süleyman H., Elias R. Acute and chronic anti-inflammatory effects of *Hedera colchica* in rats. *J Ethnopharmacol.* 2004. № 94. P. 191–195.
63. Glaeske G., Schicktanz C. V., Janhsen K. “GEK Pharmaceutical report,” GEK Statutory health insurance, 2008, German.
64. Gleeson P. A., Jermyn M. A. Alteration in the composition of β -lectins caused by chemical and enzymic attack. *Austral J Plant Physiol.* 1979. № 6 (1). P. 25-38.
65. Glushchenko A., Bezruk I., Bevz. N., Ivanauskas L., Georgiyants V. Development of the procedure of quantitative determination of the biological active substances in the extract of a *Bupleurum aureum* in the composition of a combined

dosage form. *Scientific Journal "ScienceRice: Pharmaceutical Science"*. 2019. № 1 (17). P. 11-16.

66. Golawska S., Leszczynski B., Oleszek W. Effect of low and high-saponin lines of alfalfa on pea aphid. *J Insect Physiol.* 2006. № 52. P. 737–743.

67. Goyal A., Pandiya C. K. Validation of analytical methods – strategies & singficance. *International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences.* 2015. № 4 (3). P. 1489-1497.

68. Greunke C., Hage-Hülsmann A., Sorkalla T., Keksel N., Felix H. Pulmonary Pharmacology & Therapeutics A systematic study on the influence of the main ingredients of an ivy leaves dry extract on the b2 -adrenergic responsiveness of human airway smooth muscle cells. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2015. №. 31. P. 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2014.09.002>.

69. Grosbois M. Biosynthèse des acides gras au cours du développement du fruit et de la graine du lierre. *Phytochemistry* 1971. № 10 (6). P. 1261-1273.

70. Guardia T., Rotelli A.E., Juarez A.O., Pelzer L.E., Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Ill Farm.* 2001. № 56 (683) e7.

71. Guideline on Quality of Herbal Medicinal Products/Traditional Herbal Medicinal Products, London, (2011) <https://www.ema.europa.eu/qualityherbal-medicinal-productstraditional-herbal-medicinal-products>.

72. Guo D. A. Quality marker concept inspires the quality research of Traditional Chinese Medicines. *Chin. Herbal Med.* 2017. № 9. P. 1-2. [https://doi.org/10.1016/S1674-6384\(17\)60069-8](https://doi.org/10.1016/S1674-6384(17)60069-8).

73. Hadi H. Developed spectrophotometric determination of salbutamol sulfate in pharmaceutical samples by coupling with O-nitroaniline. *Iraqi J Sci.* 2008. № 49. P. 12-17.

74. Hamidu L., Ahmad A. R., Najib A. Qualitative and quantitative test of total flavonoid buni fruit (*Antidesma bunius* (L.) Spreng) with UV-Vis spectrophotometry method. *Pharmacogn J.* 2018. № 10. P. 60–63.

75. Hildebrandt T. M., Nunes Nesi A., Araújo W. L., Braun H.P. Amino Acid Catabolism in Plants. *Mol. Plant.* 2015. № 8. P. 1563–1579. <https://doi.org/10.1016/J.MOLP.2015.09.005>.
76. Hill A. M., Barber M. J., Gotham D. Estimated costs of production and potential prices for the WHO Essential Medicines List. *BMJ global health.* 2018. № 3(1), e000571. doi:10.1136/bmjgh-2017-000571.
77. Hodisan T., Culea M., Cimpoiu C., Cot A. Separation, identification and quantitative determination of free amino acids from plant extractes. *J Pharmac Biomed Anal* 1998. № 18 (3). P. 319-323.
78. Hofmann D., Hecker M., Volp A. Efficacy of dry extract of ivy leaves in children with bronchial asthma a review of randomized controlled trials. *Phytomedicine.* 2003. № 10. P. 213–220.
79. Holzinger F., Chenot J. F. Systematic review of clinical trials assessing the effectiveness of ivy leaf (*Hedera helix*) for acute upper respiratory tract infections. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2011. № 27. P. 1-9.
80. Horvath I. T., Anastas P. T. Innovations and Green Chemistry. *Chem. Rev.* 2007. № 107. P. 2169–2173.
81. Horz K. H., Reichling J. *Hedera*. In: HagerROM, Springer Verlag, Heidelberg. 2003.
82. <https://www.spss-tutorials.com/spearman-rank-correlation/>.
83. Izzo A. A., Ernst E. Interactions between herbal medicines and prescribed drugs: a systematic review. *Drugs.* 2001. № 61. P. 2163– 2175.
84. Jakobs D., Hage-Hülsmann F., Prenner L., Kolb C., Weiser D., Haberlein H. Downregulation of b1-adrenergic receptors in rat C6 glioblastoma cells by hyperforin and hyperoside from St. John's wort. *J Pharm Pharmacol.* 2013. № 65 (907). e15.
85. Jeong S. H., Kim B. Y., Kang H. G., Ku H. O., Cho J. H. Effects of butylated hydroxyanisole on the development and functions of the reproductive system in rats. *Toxicology.* 2005. № 208. P. 49–62.

86. Junio H. A., Sy-Cordero A. A., Ettetfagh K. A., Burns J. T., Micko K. T., Graf T. N., Richter S. J., Cannon R. E., Oberlies N. H., Cech N. B. Synergy-directed fractionation of botanical medicines: A case study with goldenseal (*Hydrastis canadensis*). *J. Nat. Prod.* 2011. № 74 (459). P. 1621–1629. <https://doi.org/10.1021/np200336g>.
87. Karadag A., Ozcelik B., Saner S. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Anal. Methods*. 2009. № 2. P. 41–60.
88. Kasawar G. B., Farooqui M. Development and validation of a stability indicating RP-HPLC method for the simultaneous determination of related substances of albuterol sulfate and ipratropium bromide in nasal solution. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2010. № 52. P. 19-29.
89. Kazłowska K., Hsu T., Hou C. C., Yang W. C., Tsai G. J. Anti-inflammatory properties of phenolic compounds and crude extract from *Porphyra dentata*, *J Ethnopharmacol.* 2010. № 128 (123) e30.
90. Khdair A., Mohammad M. K., Tawaha K., Al-Hamarsheh E., Al-khatib H. S., Al-khalidi B., Bustanji Y., Najjar S., Hudaib M. A validated RP HPLC-PAD method for the determination of hederacoside C in ivy-thyme cough syrup. *Int. J. Anal. Chem.* 2010. № 20 (10), 478143.
91. Kim H. R., Lee D. M., Lee S. H., Seong A.R., Gin D.W., Hwang J. A. Chlorogenic acid suppresses pulmonary eosinophilia, IgE production, and Th2-type cytokine production in ovalbumin-induced allergic asthma: activation of STAT-6 and JNK is inhibited by chlorogenic acid, *Int Immunopharmacol.* 2010. №10. 1242e8.
92. Kim N., Shin Y. J., Park S. Simultaneous Determination of Six Compounds in *Hedera helix* L. Using UPLC-ESI-MS/MS. *Chromatographia*. 2017. № 80. P. 1025–1033. <https://doi.org/10.1007/s10337-017-3317-z>.
93. Kirchoff M. M. Promoting Green Engineering through Green Chemistry. *Environ. Sci. Technol.* 2003. № 37. P. 5349–5353.

94. Kottek M., Grieser J., Beck C., Rudolf B., Rubel F., World Map of the Köppen-Geiger climate classification updated 15. 2006. 259–263. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2006/0130>.
95. Kurin E., Atanasov A. G., Donath O., Heiss E. H., Dirsch V.M., Nagy M.. Synergy study of the inhibitory potential of red wine polyphenols on vascular smooth muscle cell proliferation. *P 470 lanta Med.* 2012. № 78. 772–778. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1298440>.
96. Lautie J. P., Stankovic V., Sinoquet G. *Analysis.* 2000. № 28. P. 155–158.
97. Lee G. J., Lee J. H. Park S., Kwon W., Lim J., Lee S. Lee J. Assessment of chemical equivalence in herbal materials using chromatographic fingerprints by combination of three similarity indices and three-dimensional kernel density estimation. *Anal. Chim. Acta.* 2018. № 1037. P. 220-229. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.02.044>.
98. Levon V. F., Klymenko S. V., Tesliuk M. G.. Phenolic compounds as one of the biochemical indicators of frost resistance of the genus *Cynoxylon* L. representatives in the conditions of forest-steppe of Ukraine. *Introduction of plants.* 2016. № 3. P. 110–113.
99. Li L., Tsao R., Yang R., Liu C., Zhu H., Young J.C. Polyphenolic profiles and antioxidant activities of heartnut (*Juglans ailanthifolia* Var. *cordiformis*) and Persian walnut (*Juglans regia* L.). *J. Agric. Food Chem.* 2006. № 54. P. 8033-8040.
100. Li Y., Shen Y., Chang-liang Y., De-an G. Quality assessment of herbal medicines based on chemical fingerprints combined with chemometrics approach: A review, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2020. № 185 113215 <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113215>.
101. Li Y., Wu T., Zhu J., Wan L., Yu Q., Li X., Cheng Z., Guo C., Combinative method using HPLC fingerprint and quantitative analyses for quality consistency evaluation of an herbal medicinal preparation produced by different manufacturers, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010. № 52. P. 597–602.

102. Ling D. S., Xie H. Y., He Y. Z., Gan W. E., Gao Y. Determination of preservatives by integrative coupling method of headspace liquid-phase microextraction and capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A*. 2010. № 1217. P. 7807–7811.
103. Liu W., Liu J., Yin D., Zhao X. 2015. Influence of ecological factors on the production of active substances in the anti-cancer plant *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle); 10(4): e0122981.
104. Liu W., Yin D., Li N., Hou X., Wang D., Li D., Liu J. Influence of environmental factors on the active substance production and antioxidant activity in *Potentilla fruticosa* L. and its quality assessment. *Scientific Reports*. 2016. № 6. Article number: 28591.
105. Lourenço S. C., Moldão-Martins M., Alves V.D. Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. *Molecules*. 2019. № 24. 4132.
106. Lozano V. A., Camina J. M., Boeris M. S. Simultaneous determination of sorbic and benzoic acids in commercial juices using the PLS-2 multivariate calibration method and validation by high-performance liquid chromatography. *Talanta*. 2007. № 73. P. 282–286.
107. Lutsenko Y., Bylka W., Matławska I., Darmohray R. *Hedera helix* as a medicinal plant. *Herba Pol.* 2010. № 56.
108. Machran G. H., Hilal S. H., el-Alfy T. S.. The isolation and characterisation of emetine alkaloid from *Hedera helix*. *Planta Med.* 1975. № 27(2). P. 127-32.
109. Mahran G. H., Hilal S. H., El-Alfy T. S. Nature of the linkage in the isolated glycosides of *Hedera helix* linne growing in Egypt. Egyptian. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1974. № 15(2). P. 179-183.
110. Maithani M., Singh R. Development and Validation of a Stability-Indicating HPLC Method for the Simultaneous Determination of Salbutamol Sulphate and Theophylline in Pharmaceutical Dosage Forms. *J Anal and Bioanal Tech.* 2011. № 2. P. 1-5.

111. Malkki L., Tammilehto S. Optimization of the separation of salbutamol and its decomposition products by liquid chromatography with diode-array detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1993. № 11. P. 79-84.

112. Marksa M., Radušienė J., Jakštas V., Ivanauskas L., Marksienė R. Development of an HPLC post-column antioxidant assay for *Solidago canadensis* radical scavengers. *Nat. Prod. Res.* 2016. № 30. P. 536–543. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1027703>.

113. Marksa M., Zymone K., Ivanauskas L., Radušienė J., Pukalskas A., Raudone L. Antioxidant profiles of leaves and inflorescences of native, invasive and hybrid *Solidago* species. *Ind. Crops Prod.* 2020. № 145. 112123. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112123>.

114. Mauryaand C. P., Lokhande M. V. Impurity Profile and Validation of Pharmaceutical (API) Bulk Drug. *World Journal of Pharmaceutical Research.* 2017. № 6 (11). P. 878-887.

115. Mendel M., Chłopecka M., Dziekan N., Wiechetek M. The effect of the whole extract of common ivy (*Hedera helix*) leaves and selected active substances on the motoric activity of rat isolated stomach strips. *J. Ethnopharmacol.* 2011. № 134. P. 796–802. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.01.036>.

116. Metcalfe, D. J. *Hedera helix* L. *J. Ecol.* 2005. 93. P. 632-648.

117. Miao Y., Young S., Nanyoung K., Guijae Y., Seonju P., Seung-Hyun K. Determination of Saponins and Flavonoids in Ivy leaf extracts using HPLC-DAD. *Journal of chromatographic science.* 2015. № 53. P. 478-483. [10.1093/chromsci/bmu068](https://doi.org/10.1093/chromsci/bmu068).

118. Mohamed G. G, Khalil S. M., Zayed M. A., El-Shall M. A. 2, 6-Dichloroquinone chlorimide and 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane reagents for the spectrophotometric determination of salbutamol in pure and dosage form. *J Pharm and Biomed Anal.* 2002. № 28. P. 1127-1133.

119. Mykhailenko O., Gudžinskas Z., Kovalyov V. Ivanauskas L., Bezruk I., Georgiyants V. Effect of ecological factors on the accumulation of phenolic

compounds in Iris species from Latvia, Lithuania and Ukraine. *Phytochemical Analysis*. 2020. P. 1–19. <https://doi.org/10.1002/pca.2918>.

120. Naveed M., Hekazi V., Abbas M., Kamboh A.A., Khan G.J., Shumzaid M., Ahmad F., Babazadeh D., Fangfang X., Modarresi-Ghazani F., Wenhua L., Xiaohui Z. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomed. Pharmacother.* 2018. № 97. P. 67-74. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.064>.

121. Nowak P. M., Woźniakiewicz M., Gładysz M., Janus M., Kościelniak P. Improving repeatability of capillary electrophoresis-a critical comparison of ten different capillary inner surfaces and three criteria of peak identification. *Anal Bioanal Chem.* 2017. № 409(18). P. 4383–4393. doi:10.1007/s00216-017-0382-y.

122. Obodozie O. O. Pharmacokinetics and drug interactions of herbal medicines: a missing critical step in the phytomedicine/drug development process, Readings in Advanced Pharmacokinetics. *Theory, Methods, and Applications. InTech*. 2012 Available from: <https://doi.org/10.5772/33699>.

123. On Approval of Regulation (Standard) of Accounting 16 “Expenses”; The Ministry of Finance of Ukraine: Kyiv, Ukraine, 31 December 1999; 318p.

124. On approval of the Regulation (standard) of accounting. Available online: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0027-00> (дата доступу: 13.09.2019).

125. Ong H., Adam A., Perreault S., Marleau S., Bellemare M., Du Souich P. Beaulieu Analysis of albuterol in human plasma based on immunoaffinity chromatographic clean-up combined with high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J. Chromatogr.* 1989. № 497. P. 213-221.

126. Oroian M., Escriche I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Res. Int.* 2015. № 74. P 10–36.

127. Overview of the Current Scenario on Traditional Medicines, Chapter 1, International Conclave on Traditional Medicine, 16–17th November, New Delhi. 2006.

128. Özyürek M., Güçlü K., Tütem E., Başkan K.S., Erçağ E., Celik S.E., Baki S., Yıldız L., Karaman Ş., Apak R.. A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Analytical methods*. 2011. № 3(11). P.2439-2453
129. Pai P. N. S, Rao G. K. Murthy M. S., Agarwal A., Puranik S. Simultaneous Determination of Salbutamol Sulphate and Bromhexine Hydrochloride in Tablets by Reverse Phase Liquid Chromatography. *Indian j pharm sci*. 2009. № 71. P. 53-55.
130. Partha B. A Comparison study of hplc and hptlc: principles, instrumentations and applications. *ASIO Journal of Analytical Chemistry*. 2011. № 1. P. 20-28.
131. Pękal A., Pyrzynska K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal Methods*. 2014. № 7. P. 1776–1782.
132. Piacente S., Pizza C., Oleszek W. Saponins and phenolics of *Yucca schidigera* Roezl: chemistry and bioactivity. *Phytochem Rev*. 2005. № 4. P. 177–179.
133. Poliakoff M., Fitzpatrick J.M., Farren T.R., Anastas P.T. Green Chemistry: Science and Politics of Change. *Science*. 2002. № 297. P. 807–810.
134. Pouyanfar E., Hadian J., Akbarzade M., Hatami M., Kanani M.R., Ghorbanpour M.. Analysis of phytochemical and morphological variability in different wild-and agro-ecotypic populations of *Melissa officinalis* L. growing in northern habitats of Iran. *Ind. Crops Prod*. 2018. № 112. P. 262–273. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2017.12.008>.
135. Prenner L., Sieben A., Zeller K., Weiser D., Haberlein H. Reduction of high-affinity b2-adrenergic receptor binding by hyperforin and hyperoside on rat C6 glioblastoma cells measured by fluorescence correlation spectroscopy. *Biochemistry*. 2007. № 46 (510) 6e13.
136. Ramakrishna A., Ravishankar G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal Behav*. 2011. № 6. P. 1720-1731.

137. Ramaswamy B. R., Kim J. W., Isobe T., Chang K. H., Isobe T., Tanabe S. Determination of preservative and antimicrobial compounds in fish from Manila Bay, Philippines using ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and assessment of human dietary exposure. *J. Hazard. Mater.* 2011. № 192. P. 1739–1745.
138. Randhawa S., Bahna S. L. Hypersensitivity reactions to food additives. *Curr. Opin. AllergyClin. Immunol.* 2009. № 9. P. 278–283.
139. Rashed K. N. Z. Antioxidant activity of Hedera helix L. extracts and the main phytoconstituents. *Int J of Allied Med Sci and Clin Res* 2013; 1(2): 62-64.
140. Raudone L., Raudonis R., Liaudanskas M., Viskelis J., Pukalskas A., Janulis V. Phenolic profiles and contribution of individual compounds to antioxidant activity of apple powders. *J. Food Sci.* 2016. № 81. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13277>.
141. Raudonis R, Raudonė L, Janulis V, Viškelis P. Antiradikalinio ir redukcinio aktyvumo nustatymo metodai (apžvalga). *Sodininkystė ir daržininkystė*. 2012;31(3-4):15-35.
142. Raudonis R., Bumblauskiene L., Jakstas V., Pukalskas A., Janulis V. Optimization and validation of post-column assay for screening of radical scavengers in herbal raw materials and herbal preparations. *J. Chromatogr. A.* 2010. № 1217. P. 7690–7698. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.017>.
143. Raudonis R., Jakštas V., Burdulis D., Benetis R., Janulis V. Investigation of contribution of individual constituents to antioxidant activity in herbal drugs using post-column HPLC method. *Medicina (Kaunas)*. 2009. № 45 382. <https://doi.org/10.3390/medicina45050049>.
144. Raynie D., Driver J.L. Green assessment of chemical methods. *13th Green Chem. Eng. Conf.*, Washigton, DC, USA, 2009. P. 35-36.
145. Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 1996. № 20. P. 933-956.

146. Ristivojevic P., Trifkovic J., Vovk I., Milojkovic-Opsenica D. Comparative study of different approaches for multivariate image analysis in HPTLC fingerprinting of natural products such as plant resin. *Talanta*. 2017. № 162. P. 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.10.023>.
147. Robert A. Trees, shrubs, and woody vines of the Southwest. *Austin, TX: University of Texas Press*. 1960. 1104 p.
148. Saad B., Bari. F., Saleh M. I., Ahmad K., Talib M. Simultaneous determination of preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methylparaben, and propylparaben) in foodstuffs using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr A*. 2005. № 1073. P. 393–397.
149. Saad B., Sing Y.Y., Nawi M.A., Hashim N., Mohamedali A., Saleh M.I., Sulaiman S.F., Talib K., Ahmad K., Ali A.S.M. Determination of synthetic phenolic antioxidants in food items using reversed-phase HPLC. *Food Chem*. 2007. № 105. P. 389–394.
150. Saiah H., Allem R., El-Kebir F.Z. Antioxidant and antibacterial activities of six Algerian medicinal plants. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2016. № 8(1). P. 367-374.
151. Salamon I., Haba'n M., Baranec T., Haba'nova 'M., Knoll M. The occurrence of puncture vine (*Tribulus terrestris*) and its metabolic characteristics in Slovakia. *Biol Bratislava*. 2006. № 61. P.:25–30.
152. Satyanarayana S., Kumar K.E., Rajashekhar J., Thomas L., Rajanna S., Rajanna B. Influence of aqueous extract of fenugreek seed powder on pharmacodynamics and pharmacokinetics of gliclazide in rat and rabbits. *Therapy*. 2007. № 4. P. 457–463.
153. Selloum L., Bouriche H., Tigrine C., Boudoukha C. Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and neutrophils chemotaxis and degranulation. *Exp Toxic Pathol*. 2003. № 54 (313). e8.
154. Shah S., Bodhankar S. Herbal drugs can have beneficial effects in terms of reducing the dosage, side effects and duration of action of synthetic drugs. *Int J Diabetes Metab*. 2006. № 14. P. 104–105.

155. Shan J., Fu J., Zhao Z., Kong X., Huang H., Luo L. Chlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 cells through suppressing NF-KB and JNK/AP-1 activation. *Int Immunopharmacol.* 2009. № 9 (1042). e8.

156. Shanmugam G., Ramaswamy B. R., Radhakrishnan V., Tao H. GC–MS method for the determination of paraben preservatives in the human breast cancerous tissue. *Microchem. J.* 2010. № 96. P. 391–396.

157. Shawky E., Sohafy S., El S. M. Untargeted and targeted chemical profiling for efficacy-directed discrimination of *Hedera helix* L. subspecies using HPTLC- image analysis and HPTLC – MS. *Ind. Crop. Prod.* 2020. № 145 111980. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111980>.

158. Sieben A., Prenner L., Sorkalla T., Wolf A., Jakobs D., Runkel F., Häberlein H.. Alpha-hederin, but not hederacoside C and hederagenin from *Hedera helix*, affects the binding behavior, dynamics, and regulation of beta 2-adrenergic receptors. *Biochemistry.* 2009. № 48 (15). P. 3477-3482.

159. Sigma Aldrich Режим доступа: <https://www.sigmaaldrich.com/european-export.html> (дата звернення 13.09.2019).

160. Soil Atlas of Europe, European Soil Bureau Network European Commission, 2005. Режим доступа: <https://esdac.jrc.ec.europa.eu/content/soil-atlas-europe> (дата звернення 22.04.2020).

161. Stauss-Grabo M., Atiye S., Warnke A., Wedemeyer R.S., Donath F., Blume H.H. Observational study on the tolerability and safety of film-coated tablets containing ivy extract (Prospan® Cough 516 Tablets) in the treatment of colds accompanied by coughing. *Phytomedicine* 2011. № 18. P. 433–436. <https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2010.11.009>.

162. Stavretovic N. Biological characteristics of the species *Hedera helix* L. and its use in controlling erosion in shady places. *Archives of Biological Sciences.* 2007. № 59 (2). P. 139-143.

163. Stein O., Fosket E. Comparative developmental anatomy of shoots of juvenile and adult *Hedera helix*. *American Journal of Botany*. 1969. № 56(5). P. 546-551.
164. Szakiel A., Pączkowski C., Henry M. Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants. *Phytochem Rev.* 2011. № 10. P. 471–491 <https://doi.org/10.1007/s11101-010-9177-x>.
165. The handbook of natural flavonoids. Harborne J. B., Baxter H. Vols 1 and 2, Chichester, UK: John Wiley and Sons. 1999.
166. Tistaert C., Dejaegher B., Heyden Y. V. Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: A review, *Anal. Chim. Acta*. 2011. № 690. P. 148-161. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.02.023>.
167. Tobiszewski, Marć M., Gałuszka A., Namieśnik J. Green Chemistry Metrics with Special Reference to Green Analytical Chemistry. *Molecules*. 2015. № 20. 10928-10946; doi:10.3390/molecules200610928.
168. Trute A., Gross J., Mutschler E., Nahrstedt A. In Vitro Antispasmodic Compounds of the Dry Extract Obtained from *Hedera helix*. *Planta Med.* 1996. № 63. P. 125-129.
169. Trute A., Nahrstedt A. Identification and quantitative analysis of phenolic compounds from the dry extract of *Hedera helix*. *Planta Med.* 1997. № 63 (2). P. 177–179. <https://doi.org/10.1055/s-522 2006-957639>.
170. Uddin G., Rauf A., Qaisar M., Rehman T., Latif A., Ali M. Preliminary phytochemical screening and antimicrobial activity of *Hedera helix* L. Middle-East. *Journal of Scientific Research*. 2011. № 8 (1). P. 198-202.
171. Upadhyay R., Mohan Rao, L.J. An Outlook on Chlorogenic Acids—Occurrence, Chemistry, Technology, and Biological Activities. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2013. № 53. P. 968–984. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.576319>.
172. US FAD. Administration, Botanical Drug Development Guidance for Industry, Maryland, 2016. Режим доступу: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM458484.pdf> (дата звернення 06.08.2020).

173. Wagner H., Ulrich-Merzenich G. Synergy research : Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*. 2009. № 16. P. 97–110. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.12.018>.

174. Wang L., Zhang X., Wang Y., Wang W. Simultaneous determination of preservatives in soft drinks, yogurts and sauces by a novel solid-phase extraction element and thermal desorption-gas chromatography. *Anal. Chim. Acta*. 2006. № 577. P. 62–67.

175. Weisberger M., Patrick J.E., Powell M.L. Quantitative analysis of albuterol in human plasma by combined gas chromatography chemical ionization mass spectrometry. *Biomed. Mass Spectrom*. 1983. № 10. P. 556-558.

176. Wenzel R. P., Fowler A.A. Acute bronchitis. *N Engl J Med*. 2006. № 355 P. 2125–2130. doi: 10.1056/NEJMcp061493.

177. Xie B. G., Gong T., Tang M. H., Mi D. F., Zhang X., Liu J., Zhang Z.R. An approach based on HPLC-fingerprint and chmometrics to quality consistency evaluation of Liuwei Dihuang Pills produced by different manufacturers, *J. Pharm. Biomed. Anal*. 2008. № 48. P. 1261–1266.

178. Xiu-Qin L., Chao J., Yan-Yan S., Min-Li Y., Xiao-Gang C. Analysis of synthetic antioxidants and preservatives in edible vegetable oil by HPLC/TOF-MS. *Food Chem*. 2009. № 113. P. 692–700.

179. Yang D. Z., An Y. Q., Jiang X. L., Tang D. Q., Gao Y. Y., Zhao H. T., Wu X. W. Development of a novel method combining HPLC fingerprint and multi-ingredients quantitative analysis for quality evaluation of traditional Chinese medicine preparation, *Talanta*. 2011. № 85. P. 885-890.

180. Yu M., Liu. J., Li, L., Xu H., Xing Y., Zhao Y., Yu Z. Pharmacokinetic parameters of three active ingredients hederacoside C, hederacoside D, and α -hederin in *Hedera helix* in rats. *J. Sep. Sci*. 2016. № 39. P. 3292–3301.

181. Zhang J., Xu Y., Di X., Wu M. Quantitation of salbutamol in human urine by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci*. 2006. № 831. P. 328-332.

182. Zvikas V., Pukeleviciene V., Ivanauskas L., Razukas A., Jakstas V. Variety-based research on the phenolic content in the aerial parts of organically and conventionally grown buckwheat. *Food Chem.* 2016. № 15, P. 660-667. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.07.010.

ДОДАТКИ

Додаток А

Таблиця А1.

Екологічні та географічні характеристики місць збору листків плюща

Країна	Місце	Координати	Сонячний час (годин на рік)	Ґрунт	Тип клімату	Кількість опадів (мм)	Висота над рівнем моря (м)	Середня температура (°C)	Природне середовище
Литва	Науйої-Акмяне	56.3168° пн.ш., 22.9039° сх.д.	1600-1800	лувізол	Dfb	680	74	6,3	Край лісу
	Клайпеда	55.7033° пн.ш., 21.1443° сх.д.		альбелувізол		750	15	7,1	Край лісу
	Плунге	55.9108° пн.ш., 21.8454° сх.д.		альбелувізол		784	113	6,2	Край лісу
	Шілюте	55.3504° пн.ш., 21.4660° сх.д.		лувізол		773	7	6,9	Край лісу
	Пумпенай	55.9350° пн.ш., 24.3390°		лувізол		619	34	6,3	Край лісу

		сх.д.							
	Каунас	54.8985° пн.ш, 23.9036° сх.д.		лувізол		614	38	6,6	Край лісу
Україна	Київ	50.4501° пн.ш, 30.5234° сх.д.	2000-2500	чорнозем	Dfb	640	186	7,7	Сухий ліс
	Харків	49.9935° пн.ш, 36.2304° сх.д.		чорнозем		527	109	7,4	Сухий ліс
Угорщина	Буда-пешт	47.4979° пн.ш, 19.0402° сх.д.	2000-2500	кастано-зем	Cfb	564	156	11	Сухі луки з ізолюваними деревами
Чехія	Прага	50.0755° пн.ш, 14.4378° сх.д.	1200-1600	кальцисол	Cfb	486	204	9	Пагорби з ізолюваними деревами
	Брно	49.1951° пн.ш, 16.6068° сх.д.		кальцисол		518	208	9	Пагорби з ізолюваними деревами
Польща	Краків	50.0647° пн.ш,	1600-1800	лувізол	Dfb	678	217	9,9	Пустка (відкриті

		19.9450° сх.д.							степові луки)
	Варшава	52.2297° пн.ш, 21.0122° сх.д.		лувізол		501	112	9,7	Сухі луки
Греція	Афіни	37.9838° пн.ш, 23.7275° сх.д.	>2500	лептосол	Csa	518	302	8,2	Парк
	Дельфи	38.4824° пн.ш, 22.5010° сх.д.		лептосол	Dfa	567	632	7,7	Парк
	Метеора	39.7217° пн.ш, 21.6306° сх.д.	2000-2500	лувізол	Cfa	605	313	18,1	Пустка з ізолюваними деревами
Італія	Катанія	37.5079° пн.ш, 15.0830° сх.д.	>2500	акризол	Csa	503	27	14,6	Пустка з ізолюваними деревами
	Палермо	38.1157° пн.ш, 13.3615° сх.д.		акризол		623	186	13,5	Скелястий чагарник
	Сираку-	37.0755°		акризол		649	153	17,8	Пустка з

	зи	пн.ш, 15.2866° сх.д.							ізольованими деревами
Австрія	Відень	48.2082° пн.ш, 16.3738° сх.д.	1200-1600	акризол	Cfb	678	217	18,4	Пустка з ізольованими деревами
Словаччин а	Брати- слава	48.1486°пн.ш , 17.1077° сх.д.	1200-1600	Кастано- зем	Cfb	501	112	17,2	Пустка з ізольованими деревами

Додаток Б
Список публікацій здобувача

1. Bezruk I., Kotvitska A., Korzh I., Materiienko A., Gubar S., Budanova L., Ivanauskas L., Vyshnevsky I., Georgiyants V. Combined Approach to the Choice of Chromatographic Methods for Routine Determination of Hederacoside C in Ivy Leaf Extracts, Capsules, and Syrup. *Sci. Pharm.* 2020. № 88 (24) <https://doi.org/10.3390/scipharm88020024> (особистий внесок – підготовка зразків для аналітичних досліджень, участь у проведенні експериментальних досліджень, участь у написанні статті).
2. Bezruk I., Georgiyants V., Ivanauskas L. Comparison of components profile in herbal raw material, extract and pharmaceuticals of heder helix. *Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science»*. 2020. Vol. 4 (26). P. 36-39 (особистий внесок – участь у плануванні та проведенні експерименту, обробці та узагальненні результатів, участь у написанні статті).
3. Bezruk I. V., Grudko V. O., Georgiyants V. A., Ivanauskas L. Screening of the antioxidant activity of extracts from Heder helix leaves using the HPLC/ABTS method. *CLINICAL PHARMACY*. 2020. Vol. 24 (3). P. 47—52 (особистий внесок підготовка рослинної сировини для аналізу, проведення експериментальних досліджень, участь у написанні статті).
4. Ivan Bezruk, Mindaugas Marksa, Victoriya Georgiyants, Liudas Ivanauskas, Lina Raudone. Phytogeographical profiling of ivy leaf (Heder helix L.). *Industrial Crops and Products*. 154, 2020, 10.1016/j.indcrop.2020.112713.
5. Безрук І. В., Матерієнко А. С., Губарь С. М., Георгіянець В. А., Іванаускас Л. Спосіб визначення гедеракозиду С методом високоефективної рідинної хроматографії з попереднім застосуванням твердофазної екстракції в складі комбінованих лікарських форм: пат. України на корисну модель № u201905811 від 27.05.2019. (особистий внесок – участь у патентному пошуку, плануванні та проведенні експериментальних досліджень та оформленні матеріалів).

Продовж. Додатку Б
Апробація результатів дисертації

1. Bezruk I. Myhal A., Kushniruk V., Georgiyants V. Development of the HPLC method for related impurities determination of active pharmaceutical ingredients in the process of the industrial synthesis. Book of abstracts dedicated to the 80th anniversary of the museum of history of lithuanian medicine and pharmacy «The 8th International Conference on Pharmaceutical Sciences and Pharmacy Practice» December 15. – Kaunas, Lithuania, 2017. P. 46-47. (публікація тез).

2. Безрук І. В., Матерієнко А. С., Георгіянц В. А. Розробка методики кількісного визначення сальбутамолу сульфату методом високоефективної рідинної хроматографії. Всеукраїнський медичний журнал молодих вчених ХИСТ. – 2–6 квітня, 2018, Чернівці .Вип. 20. С. 416. (публікація тез, доповідь).

3. Безрук І. В., . Матерієнко А. С, Губарь С. М., Георгіянц В. А. Обґрунтування використання високоефективної рідинної хроматографії в провесно-аналітичній технології при виробництві субстанції сальбутамолу сульфату. Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 80-річчю з дня народження доктора фармацевтичних наук, професора О. М. Гайдукевича «Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій»(Харків, 12- 13 квітня 2018р.).НФаУ, 2018. С.318-319. (публікація тез).

4. Bezruk I. V., Materiienko A. S., Gubar S. N., Georgiyants V. A. The justification of approaches to related substances control in the pharmaceutical technology of active pharmacutical ingredients. Abstracts of XXV International Scientific and Practical Conference of young scientists and student «Topical issues of new drugs development»(Kharkiv, 18- 20 april 2018). NUPh, 2018. P.85-86. (публікація тез).

5. Bezruk I., Myhal A., Kushniruk V., Georgiyants V. Using of the HPLC method for quantitative determination of active pharmaceutical ingredients in the process of the industrial synthesis. Book of abstracts Chemistry Conference for

Young Scientists «ChemCys 2018» February 21-23, Blankenberge, Belgium, 2018. P.41. (публікація тез).

6. Bezruk I., Marksa M., Materienko A., Gubar S., Georgiyants V., Ivanauskas L. HPLC and HPTLC methods for the hederacoside C determination in leaves of *Hedera helix* L., dried extract and some dosage forms. Book of abstracts dedicated to the 100th anniversary of independent Lithuania's pharmacy «The 9th International Conference on Pharmaceutical Sciences and Pharmacy Practice» November 9. – Kaunas, Lithuania, 2018. P. 97 Безрук І. В., Матерієнко А. С., Губарь С. М., Георгіянц В. А. Розробка кількісного визначення гедеракозиду С в складі багатокомпонентного сиропу методом вискоєфективної рідинної хроматографії. Збірник всеукраїнської науково-практичної конференції «Актуальні питання сучасної медицини і фармації» (до 50-річчя заснування ЗДМУ (18-25 квітня 2018 р., 30 травня 2018 р. м. Запоріжжя). Запоріжжя, 2018. С. 143-144. (публікація тез).

7. Straigyte E., Bezruk I., Marksa M. Marksiene R. Evaluation of polyphenol compounds and antioxidant activity in ivy (*Hedera Helix* L.) leaves. Topical issues of new medicines development: матеріали XXVI Міжнародної науково-практичної конференції молодих учених та студентів (10-12 квіт. 2019 р., м. Харків). – Харків: НФаУ, 2019. С. 101-102. (публікація тез).

8. Bezruk I. V., Materiienko A. S., Gubar S. M., Georgiyants V. A. Development of assay method for simultaneous determination of salbutamol sulfate and potassium sorbate in dosage form. XIII науково-практична конференція з міжнародною участю управління якістю в фармації. – Харків: НФаУ, 2019. С. 15-16. (публікація тез).

9. Bezruk I. V., Marksa M., Materiienko A. S., Georgiyants V. A., Ivanauskas L. The investigation of antioxidant activity of *hedera helix* l. components using hplc post column abts method. Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 20-й річниці заснування Дня

фармацевтичного працівника України у 2 томах (19-20 вересня 2019 р., м. Харків). Харків, 2019. С. 309-311. (публікація тез).

10. Bezruk I. V., Georgiyants V. A., Ivanauskas L. Quality control of ivy leaf, its extracts and dosage forms in industrial manufacturing with usage hplc and hptlc methods. Матеріали Науково-практичної конференції «Сучасні проблеми фармакології, косметології та ароматології» (2019 р., м. Одеса). Одеса, 2019. С.26–30. (публікація тез).

11. Bezruk I., Marksa M., Georgiyants V., Ivanauskas L. Determination of amino acids profile in leaves of *Hedera helix* L. collected from different European countries using gas chromatography-massspectrometry (GC-MS). Book of abstracts 10th International Pharmaceutical Conference „Science and Practice 2019” November 15th. – Kaunas, Lithuania, 2019. P. 37 (публікація тез, постерна доповідь).

12. Безрук І. В., Гриненко В. В., Георгіянц В. А., Іванаускас Л. Визначення впливу кліматичних умов на вміст біологічно активних речовин в листі плюща. «PLANTA+. досягнення та перспективи» Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої пам'яті доктора хімічних наук, професора Ніни Павлівни Максютіної (до 95-річчя від дня народження) (20-21 лютого 2020 р., м. Київ). – Київ, 2020. С.59-60. (публікація тез, доповідь).

13. Безрук І., Котвіцька А., Корж Ю., Грудько В., Іванаускас Л., Георгіянц В. Порівняння аналітичних та економічних характеристик хроматографічних методик для аналізу препаратів, що містять екстракт плюща. Збірник матеріалів XIV науково-практичної конференції "Управління якістю в фармації" 22.05.2020 (22 травня 2020 р. м. Харків). Харків, 2020. С.12. (публікація тез).

14. Безрук І. В. Вишневський І. А., Губарь С. М., Штриголь С. Ю., Георгіянц В. А. фармакологічні та хроматографічні дослідження комбінації рослинного екстракту та селективного агоністу β_2 - адренорецепторів. Матеріали науково-практичної дистанційної конференції з міжнародною

участю «сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження», присвяченої 75-й річниці Університету та 20-й річниці створення фармацевтичного факультету (19-20 травня 2020 р. м. Івано-Франківськ). – Івано-Франківськ, 2020. С.147. (публікація тез).

15. Bezruk I., Kotvitska A., Korzh J., Ivanauskas L., Georgiyants V. Assessment and comparison of chromatographic procedures for hederacoside C determination in dosage form. Book of abstracts international distance conference contemporary pharmacy: issues, challenges and expectation May 8th. – Kaunas, Lithuania, 2020. P. 23. (публікація тез).

16. Безрук І. В., Матерієнко А. С., Губарь С. М., Георгіянц В. А. Розробка кількісного визначення гедеракозиду С в складі багатокомпонентного сиропу методом високоефективної рідинної хроматографії. Збірник всеукраїнської науково-практичної конференції «Актуальні питання сучасної медицини і фармації» (до 50-річчя заснування ЗДМУ (18-25 квітня 2018 р., 30 травня 2018 р. м. Запоріжжя). Запоріжжя, 2018. С. 143-144.

Додаток В
Акти впровадження

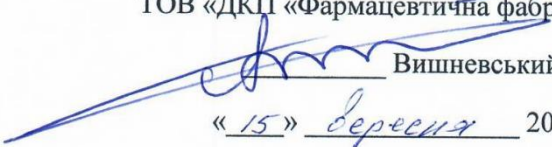
ТОВ «ДКП «Фармацевтична фабрика»
вул. Лермонтовська, 5, м. Житомир, 10014, Україна
Телефон: +38 0412 48-11-31



ЗАТВЕРДЖЕНО

Генеральний директор

ТОВ «ДКП «Фармацевтична фабрика»

 Вишневський І.А.

« 15 » березня 2020 р.

Акт впровадження

Проведено та впроваджено науково-дослідні роботи з розробки та валідації методів контролю якості для контролю якості лікарського засобу капсули “Гедерин+”. Розробниками від Національного фармацевтичного університету є аспірант Безрук Іван Володимирович, к.фарм.н. Губарь Світлана Миколаївна, д.фарм.н. Георгіянц Вікторія Акопівна.

Відповідальний

за впровадження

 Госада Г.Г.

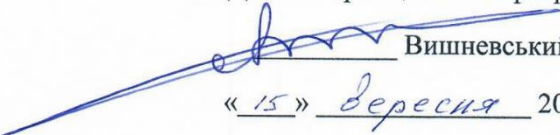
ТОВ «ДКП «Фармацевтична фабрика»
вул. Лермонтовська, 5, м. Житомир, 10014, Україна
Телефон: +38 0412 48-11-31



ЗАТВЕРДЖЕНО

Генеральний директор

ТОВ «ДКП «Фармацевтична фабрика»

 Вишневський І.А.

« 15 » вересня 2020 р.

Акт впровадження

Проведено та впроваджено науково-дослідні роботи з розробки та валідації методів контролю якості для контролю якості лікарського засобу сиропу “Гедерин+”. Розробниками від Національного фармацевтичного університету є аспірант Безрук Іван Володимирович, к.фарм.н. Губарь Світлана Миколаївна, д.фарм.н. Георгіянц Вікторія Акопівна.

Відповідальний

за впровадження



Госада С.І.В.



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи Львівського
національного медичного університету
ім. Данила Галицького, д. мед. н., професор

А. Й. Наконечний

2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** результати досліджень з розробки хроматографічних методів та критеріїв стандартизації листя плюща звичайного (*Hedera helix*).
2. **Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет, 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, кафедра фармацевтичної хімії, Безрук І.В., д.ф.н., професор Георгіянц В.А.
3. **Джерела інформації:**
 1. Bezruk, I.; Kotvitska, A.; Korzh, I.; Materiienko, A.; Gubar, S.; Budanova, L.; Ivanauskas, L.; Vyshnevsky, I.; Georgiyants, V. Combined Approach to the Choice of Chromatographic Methods for Routine Determination of Hederacoside C in Ivy Leaf Extracts, Capsules, and Syrup. Sci. Pharm. 2020. № 88 (24) <https://doi.org/10.3390/scipharm88020024>.
4. **Де впроваджено:** Кафедра фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії ЛНМУ імені Данила Галицького.
5. **Форма впровадження:** навчальний процес (лекційний курс) та наукові дослідження фармацевтичної, органічної та біоорганічної хімії.
6. **Ефективність впровадження:** поглиблення знань студентів з питань розробки хроматографічних методів аналізу, визначення параметрів оцінки цих методів.
7. **Термін впровадження:** 2020-2021 навчальний рік.

Відповідальний за впровадження

Завідувач кафедри фармацевтичної,
органічної і біоорганічної хімії

Львівського національного медичного
університету імені Данила Галицького,
д. фарм. н., професор

Р. Б. Лесик



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
Запорізького державного медичного університету

В. О. Туманський

«05» _____ х (_____ 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** результати досліджень з визначення хімічного складу для подальшої стандартизації продуктів плюща звичайного.
2. **Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет, 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, кафедра фармацевтичної хімії, Безрук І.В., д.ф.н., професор Георгіянц В.А.
3. **Джерела інформації:**
Bezruk I. V., Grudko V.O., Georgiyants V.A., Ivanauskas L. Screening of the antioxidant activity of extracts from Hedera helix leaves using the HPLC/ABTS method. Clinical pharmacy. 2020. Vol. 24 (3). P. 47—52 9.
4. **Де і коли впроваджено:** Кафедра фармацевтичної хімії Запорізького державного медичного університету. Протокол №3 від «12» жовтня 2020 р.
5. **Форма впровадження:** навчальний процес (лекційний курс) та наукові дослідження кафедри фармацевтичної хімії..
6. **Ефективність впровадження:** поглиблення знань студентів з питань компонентного складу та визначення маркерів для стандартизації рослинної сировини.
7. **Термін впровадження:** з 01.06.2020 р - 01.11.2020 р.

Відповідальний за впровадження:
Завідувач кафедри фармацевтичної
хімії, д. фарм. н., проф.

Л. І. Кучеренко

«Затверджую»
 Проректор з наукової роботи
 Тернопільського національного
 медичного університету
 імені І. Я. Горбачевського МОЗ України
 проф. І. М. Кліп



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** результати визначення речовин-маркерів в сировині, екстрактів та препаратів площа звичайного
2. **Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет, 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, кафедра фармацевтичної хімії, Безрук І.В., д.фарм.н., професор Георгіянець В.А.
3. **Джерела інформації:**
 1. Bezruk I., Georgiyants V., Ivanauskas L. Comparison of components profile in herbal raw material, extract and pharmaceuticals of heder helix. Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science». 2020. Vol. 4 (26). P. 36-39.
4. **Де впроваджено:** кафедра фармацевтичної хімії Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського.
5. **Форма впровадження:** науково-дослідна робота та навчальний процес.
6. **Ефективність впровадження:** результати проведених досліджень з визначення нових речовин-маркерів продуктів площа звичайного впроваджено у науково-дослідну роботу кафедри а також у навчальний процес з метою поглиблення знань студентів з питань стандартизації рослинної сировини, екстрактів та лікарських засобів на їх основі.
7. **Термін впровадження:** 2020-2021 навчальний рік.

Відповідальний за впровадження,
 завідувач кафедри фармацевтичної хімії

доц. Логойда Л.С.