



Нсрач

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

**ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ
З ДИСЦИПЛІНИ**

**«СУЧАСНІ ПІДХОДИ ДО СТВОРЕННЯ ФІТОПРЕПАРАТІВ»
ДЛЯ ЗДОБУВАЧІВ ВИЩОЇ ОСВІТИ РІВНЯ PhD**

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА ХІМІЇ ПРИРОДНИХ СПОЛУК**



**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ
З ДИСЦИПЛІНИ
«СУЧАСНІ ПІДХОДИ ДО СТВОРЕННЯ ФІТОПРЕПАРАТІВ»
ДЛЯ ЗДОБУВАЧІВ ВИЩОЇ ОСВІТИ РІВНЯ PhD**

Харків
НФаУ
2019

УДК 378:615.32 (072)

*Рекомендовано ЦМР Національного фармацевтичного університету
(протокол № ____ від _____ 2019 р.).*

Рецензент: В.М. Ковальов – доктор фарм. наук, професор кафедри фармакогнозії

Методичні рекомендації для самостійної роботи з дисципліни «Сучасні підходи до створення фітопрепаратів» для здобувачів вищої освіти рівня Phd / Кисличенко В. С., Хворост О.П. – Х. : Вид-во НФаУ, 2019. - 33 с.

У методичних рекомендаціях структуровано представлено матеріал з дисципліни «Сучасні підходи до створення фітопрепаратів» для здобувачів вищої освіти рівня Phd». Видання містить програмні питання дисципліни, що винесено на самостійну роботу. Наведено інформаційний матеріал та список літературних джерел по кожній темі, що винесено для самостійного опрацювання. Опанування матеріалу методичних рекомендацій допоможе здобувачеві вищої освіти якісно підготуватись до успішної здачі підсумкового модульного контролю.

Методичні рекомендації призначені для здобувачів вищої освіти рівня Phd вищих фармацевтичних навчальних закладів та фармацевтичних факультетів вищих медичних навчальних закладів МОЗ України спеціальності Фармація.

УДК 378:615.32 (072)

©Кисличенко В. С., Хворост О. П.
©НФаУ, 2019

ВСТУП

Однією із актуальних задач сучасної фармації є пошук нових джерел лікарської рослинної сировини та створення нових ефективних лікарських засобів на її основі. Фітопрепарати широко застосовуються в медицині із-за низки переваг перед синтетичними аналогами: незначна кількість побічних ефектів, економічна доступність. У лікуванні і профілактиці багатьох захворювань до 75 % асортименту належить рослинним препаратам.

Фармацевтична промисловість продовжує розширяти асортимент фітопрепаратів, використовуючи нові джерела лікарської рослинної сировини (ЛРС). Тому до ДФУ 2.0 постійно вводяться нові монографії на ЛРС. Це відбувається через осучаснення підходів до створення фітопрепаратів, появи препаратів нового покоління для лікування патологій, для впливу на які раніше фітопрепарати не використовували. На сьогодні на ринок ЛРС виходять нові, раніше не застосовані в Україні види сировини, наприклад, корені астрагалу монгольського. Тому необхідно знати загальні підходи до створення фармакопейних монографій на різні види ЛРС. Насамперед, необхідна глибока оцінка, систематизація й моніторинг методик, що стосуються ЛРС та фітопрепаратів та викладені у ДФУ 2.0.

Вивчення дисципліни «Сучасні підходи до створення фітопрепаратів» у системі підготовки здобувачів вищої освіти рівня PhD викликане необхідністю знань сучасних підходів до створення фітопрепаратів, методик ідентифікацій А, В, С різних видів ЛРС, а також методик визначення кількісного вмісту основних груп БАР в ЛРС.

Методичні рекомендації допоможуть здобувачам вищої освіти рівня PhD детально вивчити теоретичний матеріал, в рамках тем, що винесено програмою для самостійного вивчення. Сформулювати, систематизувати та узагальнити знання цілісного уявлення про сучасний стан виробництва фітопрепаратів, опанувати вміння визначати за діагностичними морфологічними та анатомічними ознаками основні групи ЛРС (корені та кореневища, бульби, листя, траву, квітки, плоди та насіння), засвоїти навички виконання якісної ідентифікації сировини та методик визначення кількісного вмісту основних груп БАР згідно вимог ДФУ 2.0.

ТЕМАТИЧНИЙ ПЛАН САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТІВ

МОДУЛЬ 1

№ з/п	Назва теми	Обсяг у годинах		
		Фphd(4,0д)	Фphd (4,0в)	Фphd (4,0з)
1.	Сучасне становище виробництва фітопрепаратів. Стандартизація. Нормативна документація на ЛРС. Вимоги до фітозасобів в Україні та різних країнах світу.	4,0	5,0	6,0
2.	Сучасні підходи, обґрунтування та вибір критеріїв ідентифікацій А-С ЛРС підземних органів	4,0	5,0	6,0
3.	Сучасні підходи, обґрунтування та вибір критеріїв ідентифікацій А-С ЛРС трави	4,0	5,0	6,0
4.	Сучасні підходи, обґрунтування та вибір критеріїв ідентифікацій А-С ЛРС генеративних органів	4,0	5,0	6,0
5.	Контроль змістового модулю 1.	7,0	7,0	8,0
6.	Сучасні підходи, обґрунтування та вибір критеріїв стандартизації - - кількісного визначення за допомогою титриметричних методів БАР в ЛРС та ФП за вимогами ДФУ.	4,0	6,0	7,0
7.	Сучасні підходи, обґрунтування та вибір критеріїв стандартизації - - кількісного визначення за допомогою спектрофотометричних методик БАР в ЛРС та ФП за вимогами ДФУ.	4,0	6,0	7,0
8.	Сучасні підходи, обґрунтування та вибір критеріїв стандартизації - кількісного визначення за допомогою хроматографічних методів БАР в ЛРС та ФП за вимогами ДФУ.	4,0	6,0	7,0
9.	Контроль змістового модулю 2	7,0	7,0	8,0
10.	Підсумковий контроль засвоєння практичних навичок модуля .	8,0	7,0	10,0
	Усього годин	50	60	71

Завдання для самостійної роботи

1. Ознайомитися за даними навчальної та додаткової літератури специфіку понять ідентифікацій А, В та С ЛРС та ФП. Номенклатуру методик кількісного визначення.
2. Ознайомитися з нормативними матеріалами, що стосуються ЛРС та ФП (монографії ДФУ, Накази МОЗ, , ТУ У, ДСтУ тощо).
3. Розв'язати ситуаційні завдання щодо ідентифікації А-С сировини, розробки проекту монографії на ЛРС, обґрунтування складу оригінального сучасного ФП.
4. Переглянути демонстраційні матеріали: зразки хроматограм, зразки ЛРС, зразки ФП.

ТЕМА 1. СУЧАСНЕ СТАНОВИЩЕ ВИРОБНИЦТВА ФІТОПРЕПАРАТІВ. СТАНДАРТИЗАЦІЯ. НОРМАТИВНА ДОКУМЕНТАЦІЯ НА ЛРС. ВИМОГИ ДО ФІТОЗАСОБІВ В УКРАЇНІ ТА РІЗНИХ КРАЇНАХ СВІТУ

Мета: Ознайомитись з основами макро- та мікроскопічного аналізу, перспективними рослинами для створення фітопрепаратів на їх основі.

ПЛАН САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

1. Види сировини. Основи макро-та мікроскопічного аналізу.
2. Вітчизняні препарати з ЛРС рослин флори України
3. Пріоритетні види лікарських та харчових рослин, які потребують першочергової уваги щодо збору і аналізу ресурсної кадастрової інформації.

ІНФОРМАЦІЙНИЙ МАТЕРІАЛ

.1. Види сировини. Основи макро-та мікроскопічного аналізу.

Макроскопічний аналіз зводиться до вивчення зовнішнього вигляду лікарської рослинної сировини, визначення розмірів окремих частин, органолептичних показників (кольору, запаху), морфологічних діагностичних ознак. Розміри сировини визначаються за допомогою вимірювальної лінійки: для великих об'єктів (понад 3 см) - 3-5 вимірювань, для дрібних - 10-20 вимірів. Дрібні насіння і плоди вимірюють на міліметровому папері і розраховують середнє значення. Визначають колір сировини поверхні на зламі або в розрізі при денному освітленні. Запах визначають при розтиранні між пальцями на зламі або при розтиранні в ступці. Морфологічні діагностичні ознаки визначають для всіх видів сировини. Висушені і зім'яті частини сировини попередньо розм'якшують у вологій камері або шляхом занурення на кілька хвилин у гарячу воду, після чого розкладають на скляній пластинці, ретельно розправляючи. Розглядають неозброєним оком або за допомогою лупи (10 ×).

Листя (Folia) - лікарська сировина, що представляє собою висушене або свіже листя або окремі листочки складного листя. Діагностичними ознаками є: тип листя (прості або складні), форма і розміри листкової пластинки і черешка, характер краю, жилкування, опушеність.

Квітки (Flores) - лікарська сировина, що представляє собою висушені окремі квітки або суцвіття, а також їх частини. Діагностичними ознаками є: тип суцвіття, опушеність, форма і розміри квітки, будова оцвітчини (число, форма і характер зрощення чашолистків і пелюсток), число і будова тичинок і маточок, характер зав'язі і квітколожа.

- лікарська сировина, що представляє собою висушені або свіжі надземні частини трав'янистих рослин (стебла з листям і квітками, частково з бутонами і незрілими плодами).

Діагностичні ознаки для листя і квіток вказані вище. Для стебел: тип розгалуження, форма поперечного перерізу, розміри (довжина і діаметр біля основи), характер поверхні, опушеність, листорозміщення.

Плоди (Fructus) - висушені або свіжі прості або складні плоди

(*Супліддя*) і їх частини. Діагностичними ознаками є: консистенція навколоплідника (перикарпия), характер поверхні, розміри (довжина, товщина, діаметр плоду), розміщення відходів частин квітки та ін.

Насіння (Semina) - цільні насіння або окремі сім'ядолі. Досліджуються сухими. Діагностичні ознаки: форма, розміри (довжина, товщина, діаметр), характер поверхні, колір, запах, форма, розміри і розташування зародка, наявність і форма рубчика або семяшва.

Кора (Cortices) - лікарська сировина, що представляє собою зовнішню частина стовбурів, гілок і коренів дерев і чагарників, розташовану до периферії від камбію. Діагностичні ознаки: розміри і форма шматків, особливості зовнішньої і внутрішньої поверхні і зламу.

Корені, кореневища, цибулини, бульби, бульбоцибулини (Radices, Rhizomata, Bulbi, Tubera, Bulbotubera) - висушені або свіжі підземні органи багаторічних рослин, очищені або відмиті від землі, звільнені від залишків стебел і листя. Діагностичні ознаки: форма, особливості зовнішньої поверхні і зламу, розмір, колір поверхні і на свіжому зламі, запах.

Збори (species) - суміш декількох видів подрібненого (рідше цілого) лікарської рослинної сировини, іноді з додаванням солей, ефірних масел. Сировина, що використовується для приготування зборів, повинно відповідати вимогам нормативної документації на кожний вид сировини. Аналіз залежить від морфологічної групи досліджуваного об'єкта, а також від стану сировини - цілого або подрібненого. Розмір лікарської рослинної сировини вказують в приватних статтях. Загальні вимоги до подрібненого лікарській рослинній сировині, в тому числі значення і допустимі норми при ситового аналізу, описані в загальній статті «Збори», якщо не вказано інше в приватних фармакопейних статтях. Ступінь подрібнення вказують в дужках, наприклад, подрібнену сировину з частинками, що проходять крізь сито з розміром сторони отвору 5600 мкм, позначають як подрібнену сировину (5600).

Мікроскопічного аналізу.

Мікроскопічний аналіз залежить від морфологічної групи випробуваного сировини, а також від стану сировини - цілого або подрібненого.

ЛИСТЯ, ТРАВИ, КВІТКИ.

Цільна і подрібнена сировина. При дослідженні цільної сировини беруть шматочки пластинки листя з краєм і жилкою; у трав беруть лист, іноді також шматочок стебла і квітка, у квіток - чашечку і віночок. при дослідженні різаного сировини беруть кілька різних шматочків.

Просвітлення можна проводити двома способами.

I. Кілька шматочків сировини поміщають в колбу або пробірку, додають розчин 25 г / л натрію гідроксиду Р і кип'ятять протягом 1-2 хв. Потім вміст виливають в чашку Петрі (або порцелянову), рідину зливають і сировину

ретельно промивають водою Р. З води шматочки сировини виймають скальпелем або лопаткою і поміщають на предметне скло в краплю розчину хлоралгідрату Р1 або розчину гліцерину Р.

II. Шматочки кип'ятять в розчині хлоралгідрату Р1, розведеного водою Р (1: 1, об / об), протягом 5-10 хв (до просвітління). просвітлений шматочок сировини поміщають на предметне скло в краплю розчину хлоралгідрату Р1 або гліцерину Р, поділяють скальпелем або препарувальною голкою на дві частини, одну з них обережно перевертають. Об'єкт накривають покривним склом, злегка підігрівають до видалення бульбашок повітря і, після охолодження, розглядають лист з обох сторін під мікроскопом спочатку при малому, потім при великому збільшенні. При приготуванні мікропрепаратів з товстого листа їх попередньо роздавлюють скальпелем.

Для дослідження стебел їх відрізки кип'ятять в розчині 50 г / л натрію гідроксиду Р, ретельно промивають водою Р, знімають епідерміс скальпелем або препарувальною голкою і розглядають його з поверхні; з інших тканин готують препарат, роздавлюючи об'єкт скальпелем на предметному склі в розчині хлоралгідрату Р1 або розчині гліцерину Р. При необхідності приготування поперечних зрізів листа і стебел їх кип'ятять в розчині хлоралгідрату Р1 протягом 10 хв і роблять зрізи, затискаючи шматочки листа в пробку або серцевину бузини. Готові зрізи поміщають в воду Р і далі використовують для приготування мікропрепаратів, розглядаючи їх в розчині хлоралгідрату Р1.

Дослідження при додатковому подрібненні. Для мікроскопічного випробування лікарську рослину сировину додатково подрібнюють (355) (2.9.12), якщо в приватній статті не вказано інше. Найбільш широко використовуваним середовищем для укладення в нього додатково подрібненої сировини є розчин хлоралгідрату Р.

Однак в цьому реактиві не завжди добре видно деякі елементи, в такому випадку можуть бути використані інші середовища, наприклад, 50% (об / об) розчин гліцерину Р, що дозволяє виявити зерна крохмалю. При необхідності в приватній статті може бути зазначено використання специфічних реактивів, наприклад, реактиву молочної кислоти Р (використання якого дозволяє виявляти різні діагностичні ознаки), розчину рутенію червоного Р (дозволяє побачити присутність слизу в клітинах), або гліцерину Р (в якому видно крохмаль і інулін) та інших.

Використання розчину хлоралгідрату. 2-3 краплі розчину хлоралгідрата Р поміщають на предметне скло. Невелику кількість порошку суспендують в розчині і накривають покривним склом. Препарат дуже акуратно нагрівають на плитці або на газовій мікрогорелке до кипіння і кип'ятять протягом нетривалого часу, при необхідності за допомогою піпетки додають реактив, охолоджують і переглядають під мікроскопом.

Нагрівання повторюють до тих пір, поки крохмальні зерна і водорозчинний вміст клітин не стане невидимим. Переглядають отриманий препарат під мікроскопом. Таму як хлоралгідрат схильний до кристалізації у вигляді довгих ниток, для запобігання цьому після нагрівання видаляють покривне

скло, до препарату додають 1 краплю 10% (об / об) суміші розчину хлоралгідрату Р і гліцерину Р, накривають чистим покривним склом і переглядають під мікроскопом. Використання 50% (об / об) розчину гліцерину. 2 краплі 50% (об / об) розчину гліцерину Р поміщають на предметне скло. Невелику кількість порошку суспендують в розчині і накривають покривним склом. Дивляться під мікроскопом.

ПЛОДИ, НАСІННЯ. Готують препарати шкірки насіння і оплодня з поверхні або поперечні зрізи.

Препарати поверхні шкірки і орлодня. 2-3 насінини або плоду кип'ятять в пробірці в розчині 50 г / л натрію гідроксиду Р протягом 2-3 хв і ретельно промивають водою Р. Об'єкт поміщають на предметне скло, препарувальною голкою відокремлюють шкірку насіння або тканини навколоплідника і розглядають їх у розчині хлоралгідрату Р1 або розчині гліцерину Р.

Зрізи. Для приготування зрізів сухі плоди і насіння попередньо розм'якшують, помістивши їх на добу у вологу камеру (вологою камерою служить ексікатор з водою, в яку додано декілька крапель хлороформу) або водяною парою протягом 15-30 хв або більше в залежності від твердості об'єкта. Дрібні плоди і насіння запаюють в парафіновий блок розміром близько 0,5 см × 0,5 см × 1,5 см. Кінчиком нагрітої препарувальної голки розплавляють парафін і в утворену ямку швидко занурюють об'єкт. Поверхня об'єкта повинна бути сухою. Зрізи об'єкта роблять разом з парафіном; зрізи вибирають з парафіну препарувальною голкою, змоченою рідиною, і готують мікропрепарати в розчині гліцерину Р або розчині хлоралгідрату Р1. Діагностичні ознаки: форма і будова клітин екзокарпія (епідермісу), наявність і будова трихом, розташування і форма механічних елементів в мезокарпія, число і розташування ефіро-олійних каналів, провідних пучків, наявність кристалічних включень. Дослідження при додатковому подрібненні. Препарат готують так само, як зазначено в розділі «Листя, трави, квітки».

КОРА. Цільна і подрібнена сировина. Готують поперечні або поздовжні зрізи кори. Шматочки кори розміром близько 2-3 см × 0,5-1 см кип'ятять в колбі або пробірці з водою Р протягом 5 хв. розм'якшені шматки вирівнюють скальпелем так, щоб вони мали строго поперечний або подовжній перетин. Роблять зрізи і готують мікропрепарати в розчині хлоралгідрата Р1 або розчині гліцерину Р. При необхідності готують препарати у відповідних реактивах для виявлення різних структур або речовин. Діагностичні ознаки: товщина, забарвлення і характер пробки, наявність коленхіми, товщина первинної і вторинної кори, ширина серцевинних променів, особливості розташування і кількість луб'яних волокон, кам'янистих клітин, клітин з ефірною олією, включення кристалів оксалату кальцію, молочні судини. Зіскрібок кори або дрібні шматочки кип'ятять протягом 3-5 хв в розчині 50 г / л натрію гідроксиду Р, промивають водою Р і готують мікропрепарати, роздавлюючи об'єкт скальпелем в розчині гліцерину Р або розчині хлоралгідрату Р1. Дослідження при додатковому подрібненні. Препарат готують так само, як зазначено в розділі «Листя, трави, квітки».

КОРЕНІ, КОРНЕВИЩА, БУЛЬБИ, ЦИБУЛИНИ, БУЛЬБОЦИБУЛИНИ. Цільна сировина. Готують поперечні і поздовжні зрізи. Невеликі шматки підземних органів поміщають в холодну воду Р і витримують близько доби, потім поміщають в суміш спирт Р - гліцерин Р (1: 1, об / об) на 3 добу. Розмочені об'єкти вирівнюють скальпелем так, щоб вони мали строго поперечний або поздовжній перетин. Роблять зрізи і готують мікропрепарати в розчині хлоралгідрату Р1 або розчині гліцерину Р і розглядають діагностичні ознаки спочатку при малому, потім при великому збільшенні. Діагностичні ознаки: особливості будови епідерми або перідерми, розташування і будова механічних, провідних, секреторних тканин, кристали оксалату кальцію, запасні речовини.

Подрібнена сировина. Шматочки підземних органів кип'ятять протягом 3-5 хв в розчині 50 г / л натрію гідроксиду Р, ретельно промивають водою Р і готують мікропрепарати, роздавлюючи шматочки в розчині гліцерину Р або розчині хлоралгідрату Р1. Дослідження при додатковому подрібненні. Препарат готують так само, як зазначено в розділі «Листя, трави, квітки».

МІКРОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ. Мікрохімічний аналіз може проводитися одночасно з мікроскопічним аналізом.

Крохмаль. Готують два препарати - в розчині Люголя Р і в воді Р; від йоду крохмальні зерна забарвлюються в синій колір. У воді визначають їх форму, будову. Також для ідентифікації зерен крохмалю проводять випробування в поляризованому світлі (між перехресними призми Ніколя) - на зернах виявляється чорний хрестик.

Жирна і ефірна олія. Для виявлення жирного і ефірного олії готують препарат в розчині Судану III Р і підігривають; краплі жирної або ефірної олії забарвлюються в оранжево-рожевий колір. Для виявлення слизу готують препарат порошку в розчині чорної туші Р і негайно розглядають під мікроскопом (мале збільшення); слиз помітна у вигляді безбарвних мас на чорному тлі. Або поміщають 2 краплі розчину рутенію червоного Р на предметне скло, невелику кількість порошку суспендують в рідині і накривають покривним склом, через 1 хв дають краплі води дистильованої Р між предметним і покривним стеклами; слиз забарвлюється у фіолетово-червоний колір.

Здерев'янілі (лігніфіцірованние) елементи. Невелика кількість порошку поміщають на предметне скло, додають 1-2 краплі 10% (об / об) спиртового розчину флороглюцінола Р, перемішують і витримують до майже повного випаровування розчинника, додають 1-2 краплі кислоти хлористоводневої Р, накривають препарат покривним склом і негайно переглядають під мікроскопом; червоне забарвлення вказує на присутність лігніну. Для забарвлення здерев'янілих елементів можна використовувати також розчин 10 г / л сафраніну Р. Зрізи поміщають в розчин 10 г / л сафраніну Р в спирті (50% об / об) Р на 30 хв (в закритому бюксі або на годинниковому склі), промивають спочатку спиртом (50% об / об) Р, потім підкисленим спиртом (на 100 мл 96% спирту Р додають 2 краплі соляної кислоти Р) і укладають на предметному склі в гліцерин Р; здерев'янілі оболонки

фарбуються в червоний колір.

Дубильні речовини. Наявність дубильних речовин встановлюють, завдаючи 1 краплю розчину 10 г / л заліза (III) амонію сульфату Р або розчину 30 г / л заліза (III) хлориду Р на внутрішню поверхню сухої кори; з'являється чорносінее або чорно-зелене забарвлення.

Наявність похідних антрацену визначають, завдаючи 1-2 краплі розчину 50 г / л натрію гідроксиду Р на внутрішню поверхню кори (червоне забарвлення) або проводячи мікросублімацію описаним нижче способом. На предметне скло ставлять трубку діаметром 1,5 см і заввишки 2 см. Всередину скляної трубки поміщають невелику кількість порошку (або зіскрібка) випробуваного зразка, зверху накривають іншим предметним склом, ставлять на азбестову сітку, закріплену в штативі, і підігрівують. Полум'я пальника слід тримати від предметного скла на відстані 5-7 см. На поверхню скла, яке служить для уловлювання сублімату, поміщають шматочки фільтрувального паперу і змочують час від часу холодною водою.

Через деякий час на нижньому боці скла з'являється наліт. Під мікроскопом в субліматів видно тонкі жовті голочки, які в ультрафіолетовому світлі (люмінесцентний мікроскоп) мають яскраве жовте або оранжево-червоне свічення. У розчині 50 г / л калію гідроксиду Р в 96% спирті Р сублімат розчиняється з появою червоного забарвлення.

Для виявлення інуліну на предметне скло поміщають близько 0,1 г порошку зразка, 1-2 краплі розчину β-нафтолу Р1 (або розчину резорцина Р або розчину тимолу Р) і 1 краплю кислоти сірчаної Р; з'являється червонувато-фіолетове забарвлення (від резорцину - оранжево-червоне). Про наявність інуліну можна робити висновки лише за відсутності крохмалю.

Використання реактиву молочної кислоти. Поміщають 2-3 краплі реактиву молочної кислоти Р на предметне скло, невелику кількість порошку суспендують в рідині, накривають покривним склом, препарат дуже акуратно нагрівають на плитці або на газовій мікрогорелці до кипіння і кип'ятять протягом нетривалого часу, при необхідності за допомогою піпетки додають реактив, охолоджують і переглядають під мікроскопом. Лігніфіковані структури фарбуються в яскраво-жовтий колір; структури, що містять целюлозу, залишаються безбарвними. Зерна крохмалю фарбуються в більш-менш насичений фіолетовий колір; деякі секрети (наприклад, ефірні олії, смоли) фарбуються в помаранчевий колір; пробка забарвлюється в червоний колір.

Метод люмінесцентної мікроскопії застосовується (де це доцільно) для визначення автентичності лікарської рослинної сировини. Перевагою методу є можливість його застосування для вивчення сухого рослинного матеріалу, з якого готують товсті зрізи або препарати порошку, і розглядають їх в падаючому світлі при освітленні препарату зверху через opak-ілюмінатор або об'єктив. Люмінесцентна мікроскопія виконується за допомогою люмінесцентних мікроскопів, оснащених спеціальними люмінесцентними освітлювачами.

Приготування мікропрепаратів. Для приготування мікропрепаратів використовують суху лікарську рослинну сировину або її порошок. Попереднє розм'якшення сировини виключається, так як це призводить до вимивання речовин з клітин; допускається лише нетривале розм'якшення у вологій камері.

Листя. Готують зазвичай препарати з порошку листя, які розглядають без включас рідини. Найбільш яскрава люмінесценція характерна для здерев'янілих елементів - судин жилки, механічних волокон, а також кутикули і кутинізованих оболонок різних епідермальних утворень (волосків, залозок і ін.). У епідермальних клітинах часто містяться флавоноїди, що зумовлюють коричневу, жовту або зеленувато-жовту люмінесценцію. Клітини мезофілу містять різні включення - жовті, блакитні, зеленувато-жовті, коричневі - в залежності від їх хімічного складу. Хлорофіл в висушеному рослинному матеріалі не люмінесціює. Кристали оксалату кальцію також не володіють люмінесценцією. При необхідності приготування зрізу листя попередньо розм'якшують у вологій камері і за допомогою бритви роблять товстий зріз (2-3 мм), який закріплюють на предметному склі пластиліном. Більш тонкі зрізи поміщають у рідину і накривають покривним склом. Як рідину використовують воду Р, гліцерин Р, розчин 50 г / л полівінілового спирту Р, нефлуоресцюючу вазелінову олію Р.

Трави. При аналізі трав готують мікропрепарати листя. При необхідності приготування препарату стебла його розм'якшують у вологій камері і готують зрізи. Товсті зрізи (2-3 мм) закріплюють на предметному склі за допомогою пластиліну і розглядають без рідини, тонкі поміщають в підходящу рідину і накривають покривним склом.

Найбільш яскраву люмінесценцію мають здерев'янілі елементи провідних пучків - судини і механічні волокна, склеренхімні клітини, що зустрічаються в корі і серцевині стебла. У клітинах епідермісу і кори часто зустрічаються флавоноїди; у деяких видів сировини в клітинах обкладки навколо провідних пучків містяться алкалоїди, які флуоресціюють різноманітним світлом: синім, блакитним, зеленим, зеленувато-жовтим, золотисто-жовтим, помаранчево-червоним в залежності від складу.

Квітки. Найчастіше готують препарати з порошку квіток або окремих частин квітки (суцвіття), які розглядають зазвичай без рідини. У квітках часто містяться флавоноїди, каротиноїди та інші речовини, що володіють флуоресценцією. Чітко видно пилкові зерна, мають жовте, зеленувато-жовте або блакитне світіння.

Плоди. Готують зазвичай поперечні зрізи плоду після попереднього розм'якшення у вологій камері і розглядають у рідину або без неї в залежності від товщини зрізу. Для плодів характерна люмінесценція тканин навколоплідника (екзокарпія, механічних клітин мезокарпія, провідних пучків). Чітко видно секреторні канали: яскраво світиться їх вміст; клітини вистеляючого шару зазвичай мають жовтувато-коричневу люмінесценцію. У вмісті каналів нерідко видно яскраво люмінесцюючі кристалічні включення, найчастіше жовтого або жовто-зеленого кольору.

Насіння. Готують зазвичай поперечні зрізи насіння після попереднього розм'якшення у вологій камері і розглядають їх у рідині або без неї в залежності від товщини зрізу. Звертають увагу на характер люмінесценції насіннєвої шкірки, в якій чітко виділяються склеренхімні шари. Клітини епідермісу, що містять слиз, зазвичай мають синьо-блакитне світіння. Ендосперм і тканини зародка, багаті жирною олією, характеризуються блакитною люмінесценцією.

Кора. Кору попередньо розм'якшують у вологій камері, готують товсті поперечні зрізи (до 3-5 мм), які закріплюють на предметному склі пластиліном, і розглядають без рідини; тонкі зрізи укладають в рідину. Для деяких видів сировини характерна люмінесценція коркового шару кори: оболонки клітин пробки світяться інтенсивно-синім, їх вміст - темно-червоним (антоціани). Яскраве і різноманітне світіння мають механічні елементи (луб'яні волокна і кам'янисті клітини): блакитне, зеленувато-блакитне, жовтувато-зелене. Люмінесценція паренхіми кори залежить від хімічного складу. Антраценпохідні обумовлюють яскраве помаранчеве або червонувато-оранжеве світіння. Дубильні речовини мають властивість «гасити» люмінесценцію, тому тканини, що містять дубильні речовини, темно-коричневого, майже чорного, кольору. Препарат, приготований з порошку кори або зіскрібка, розглядають без рідини. У ньому найбільш яскраво видно механічні елементи.

Корені, кореневища, цибулини, бульби, бульбоцибулини. Готують поперечні зрізи, розпили, препарати порошку або зіскрібка. Зрізи готують з матеріалу, попередньо розм'якшеного у вологій камері, розпили (з товстих коренів і кореневищ) - з сухого матеріалу за допомогою тонкої пилки або фрези. За допомогою бритви з поверхні розпили знімають тонкий шар для видалення шару клітин, вкритих пилом. Товсті зрізи і розпили (до 3-5 мм) закріплюють на предметному склі пластиліном і розглядають без рідини. Шар пробки у підземних органів зазвичай тьмянний, майже чорний. Яскраво люмінесциують деревина (біля коріння і кореневищ) і провідні пучки, а також склеренхімні елементи. Їх світіння дуже різноманітне: від буровато-зеленого, жовто-зеленого до світло-блакитного і інтенсивно-синього в залежності від виду сировини. Ще більш різноманітна люмінесценція паренхімних тканин і різних секреторних утворень (вмістилищ, каналів, ходів, молочних судин, різних ідіобластів), що визначається їх хімічним складом. У секреторних утвореннях зустрічаються кристалічні включення кумаринів, алкалоїдів, флавоноїдів, що володіють яскравою люмінесценцією. У препаратах порошку видно окремі судини, групи механічних волокон, кам'янисті клітини, окремі секреторні освіти і їх обривки, яскраво люмінесцируючі клітини паренхіми, що містять ті чи інші речовини.

Препарати в люмінесцентному мікроскопі розглядають в ультрафіолетовому світлі, спостерігаючи первинну (власну) люмінесценцію.

2. Лікарські рослини України у вітчизняних фітопрепаратах

Згідно даних Державного реєстру лікарських засобів України, за останні 5 років в Україні внесено близько тисячі фітопрепаратів з сировини лікарських

рослин чи за участю біологічно активних сполук з рослин. З них 533 - препарати вітчизняного виробництва, 460 - зарубіжного (імпортовані). До складу цих препаратів входить сировина чи діючі речовини з сировини майже 130 видів лікарських рослин. Серед них більше 70 видів є дикорослі в Україні, хоча частина з них вирощується на сировину, або імпортується для забезпечення підвищеного попиту.

Переробка лікарської рослинної сировини та виробництво фітопрепаратів зосереджені переважно в Києві та області, Харкові, Луганську та Житомирі (табл. 9). Важливими центрами виробництва фітофармацевтичної продукції також є АТ «Галичфарм» (Львів); Полтавська обл.), ТОВ «Сумифітофармація» (Суми), ПАТ «Біолік» (Ладизин, Вінницька обл), ТОВ «Фітолік» (Івано-Франківськ), ВАТ «Тернопільська фармацевтична фабрика» та ТОВ «Тернофарм» (Тернопіль), ПАТ «Ліки Кіровоградщини» (Кіровоград), ТОВ виробнича фірма «Сарепта» (Донецьк), ПАТ «Фітофарм» (Артемівськ, Донецька обл.), ТОВ «Аветра» (Ужгород), ПАТ «Вітаміни» (Умань) та ін.

Серед дикорослих лікарських рослин України для виробництва фітопрепаратів найбільшим попитом користується сировина валеріани лікарської (*Valeriana officinalis*), яка входить до складу 35 препаратів. В Україні мало використовують сировину валеріани з природного середовища, оскільки вона має обмежені природні ресурси. Ряд господарств вирощують валеріану на сировину. До лікарських рослин, які мають значні ресурси в Україні і їх активні інгредієнти входять до багатьох фітопрепаратів належать: глід (ряд видів) (входить до 26 фітопрепаратів); собача кропива п'ятилопатева (відповідно - 22), звіробій звичайний (19); бузина чорна, деревій звичайний та шипшина (по 16); хвощ польовий (14); кропива дводомна (12); подорожник великий (11). Для забезпечення стабільної сировинної бази ряд видів дикорослих лікарських рослин, природні ресурси яких обмежені, вирощують у спеціалізованих господарствах в Україні (ромашка лікарська, собача кропива п'ятилопатева, алтея лікарська) та імпортують сировину з інших країн. Для фітопрепаратів також широко використовується культивована сировина хмелю (20 фітопрепаратів) та солодки голої (17). Солодка гола в Україні занесена до Червоної книги, вирощування обмежене, тому попит на її сировину задовольняється переважно за рахунок імпорту з країн Середньої Азії.

Сировина лепехи звичайної (аїру) використовується в Україні лише з природного середовища для виробництва 14 фітопрепаратів (Лепехи кореневища; Фітодент, Бронхофіт, Гастрофіт, Детоксифіт, Імунофіт, Простатофіт, Гінекофіт; Бальзам «Вігор»; Вікалін; Вікаїр; Фітомікс-12; Аллотон; Стомат-фіто), оскільки створити умови для її культивування складно. Ресурси аїру потерпають від осушення заплавлі річок у рівнинних поліських та лісостепових районах України, тому у більшості областей заготівля кореневищ аїру заборонена. Існує необхідність пошуку альтернативних джерел сировини. На фармацевтичному ринку України зареєстровано по 7-9 фітопрепаратів, до яких входить сировина чи діючі

речовини з буркуну лікарського (*Mellilotus officinalis*), материнки звичайної (*Origanum vulgare*), перстачу прямостоячого (*Potentilla erecta*), полину гіркого (*Artemisia absinthium*), софори японської (*Styphnolobium japonicum*), споришу (*Polygonum aviculare*), чебрецю повзучого (*Thymus serpyllum*) та чистотілу великого (*Chelidonium majus*) (додаток, табл. 6). Це перспективні сировинні види, які мають великі природні ресурси в Україні. До видів лікарських рослин, сировина яких користується невеликим попитом, але вони мають значний ресурсний потенціал належать: грицики звичайні (*Capsella bursa-pastoris* - 4 фітопрепарати), дуб звичайний (*Quercus robur* - 4), золотарник канадський (*Solidago canadensis* - 4), конвалія (*Convallaria majalis* - 5), крушина ламка (*Frangula alnus* - 5), кульбаба лікарська (*Taraxacum officinale* - 6), підбіл звичайний (*Tussilago farfara* - 4), чорниця (*Vaccinium myrtillus* - 3) та ін. На фармацевтичному ринку України активно з'являються нові фітопрепарати з лікарських рослин, сировина яких до сих пір не використовувалась чи обмежено використовувалась в офіційній медицині, це такі препарати як Протефлазід, Флавозід, Імунофлазід, Протфенолозід за участю активних сполук щучки дернистої (*Deschampsia caespitosa*) та куничника наземного (*Calamagrostis epigeios*), Трібестан з якірців сланких (*Tribulus terrestris*); Тазалок, до складу якого входять гадючник шестипелюстковий (*Filipendula vulgaris*), підмаренник справжній (*Galium verum*), льоник звичайний (*Linaria vulgaris*) та ін. Для виробництва фітопрепаратів традиційно використовується (*Calendula officinalis*), корені петрушки кучерявої (*Petroselinum crispus*), свіжі корені селери (*Apium graveolens*), плоди розторопші (*Silybum magianum*), стовпчики з приймочками кукурудзи (*Zea mays*), насіння льону (*Linum usitatissimum*), плоди коріандру (*Coriandrum sativum*), листя гінкго дволопатевого (*Ginkgo biloba*), корені ехінацеї пурпурної (*Echinacea purpurea*), листки меліси (*Melissa officinalis*), кореневищ і коренів марени красильної (*Rubia tinctorum*) та ін. В мінімальних кількостях використовується сировина багатьох лікарських рослин для виробництва гомеопатичних засобів: арніки гірської (*Arnica montana*), барбарису (*Berberis*), болиголовця плямистого (*Conium*), пізньоцвіту осіщюш (*Colchicum*), переступня білого (*Bryonia alba*), аконіту (*Aconitum* spp.) та рододендронів (*Rhododendron* spp.).

3. Пріоритетні види лікарських та харчових рослин, які потребують першочергової уваги щодо збору і аналізу ресурсної кадастрової інформації

1. Аїр, лепеха звичайна (*Acorns calamus*)
2. Алтея лікарська (*Althaea officinalis*)
3. Арніка гірська (*Arnica montana*)
4. Астрагал шерстистоквітковий (*Astragalus dasyanthus*)
5. Багно звичайне (*Ledum palustre*)
6. Барвінок малий (*Vinca minor*)
7. Береза повисла (*Betula pendula*)
8. Бобівник трилистий (*Menyanthes trifoliata*)
9. Брусниця (*Vaccinium vitis-idaea*)
10. Бузина чорна (*Sambucus nigra*)
11. Буркун лікарський (*Melilotus officinalis*)
12. Валеріана лікарська (*Valeriana officinalis*)
13. Вільха клейка (чорна) (*Alnus glutinosa*)
14. Вовчуг польовий (*Ononis arvensis*)
15. Гірчак перцевий (водяний перець) 16. (*Persicaria hydropiper—Polygonum hydropiper*)
17. Гірчак плямистий (г. почечуйний) (*Persicaria maculosa=Polygonum persicaria*)
- 18.

Глечики жовті (*Nuphar lutea*) 19. Глід гладенький (*Crataegus fallacina*) 20. та інші сировинні види глоду 21. Горицвіт весняний (*Adonis vernalis*) 22. Торобнна звичайна (*Sorbus aucuparia*) 23. Грицики звичайні (*Capsella bursa-pastoris*) 24. Деревій звичайний (*Achillea millefolium*) 25. Парило звичайне (*Agrimonia eupatoria*) 26. Жостір проносний (*Rhamnus cathartica*) 27. Журавлина болотна (*Oxycoccus palustris*) 28. Звіробій звичайний (*Hypericum perforatum*) 29.: Золототисячник гарний (*Centaureum pulchellum*) 30. Калина звичайна (*Viburnum opulus*) 31. Конвалія звичайна (*Convallaria majalis*). 32. Кривавик дводомний (*Urtica dioica*) 33. Крушина ламка (*Frangula alnus*) 34. Латаття біле (*Nymphaea alba*) 35. Липа серцелиста (*Tilia cordata*) 36. Малина (*Rubus idaeus*) 37. Материнка звичайна (*Origanum vulgare*) 38. Мати-й-мачуха звичайна (*Tussilago farfara*) 39. Мучниця звичайна (*Arctostaphylos uva-ursi*) 40. Оман високий (*Inula helenium*) 41. Перстач прямостоячий, калган (*Potentilla erecta*) 42. Пижмо звичайне (*Tanacetum vulgare*) 43. Плаун булавовидний (*Lycopodium clavatum*) 44. Плаун колючий (*Lycopodium annotinum*) 45. Полин гіркий (*Artemisia absinthium*) 46. Ракові шийки лікарські, зміїовик (гірчак зміїний) (*Bistorta officinalis* = *Polygonum bistorta*) 47. Родовик лікарський (*Sanguisorba officinalis*) 48. Рододендрон жовтий (*Rhododendron luteum*) 49. Ромашка лікарська (*Matricaria recutita*) 50. Синюха голуба (*Polemonium caeruleum*) 51. Собача кропива волосиста (с.к. п'ятилопатева) (*Leonurus villosus* = *L. quinquelobatus*) 52. Очиток великий (*Sedum maximum*) 53. Очиток їдкий (*Sedum acre*) 54. Суниці лісові (*Fragaria vesca*) 55. Сухоцвіт багновий (*Gnaphalium uliginosum*) 56. Солодка гола (*Glycyrrhiza glabra*) 57. Цмин пісковий (*Helichrysum arenarium*) 58. Чебрець повзучий (*Thymus serpyllum*) та інші сировинні види чебрецю 59. Чемериця Лобелієва (*Veratrum lobelianum*) 60. Череда трироздільна (*Bidens tripartita*) 61. Чистотіл великий (*Chelidonium majus*) 62. Чорниця (*Vaccinium myrtillus*) 63. Шипшина травнева (*Rosa majalis*) та інші сировинні види шипшини.

ТЕМИ 2-4. СУЧАСНІ ПІДХОДИ, ОБҐРУНТУВАННЯ ТА ВИБІР КРИТЕРІЇВ ІДЕНТИФІКАЦІЙ А-С ЛРС: ПІДЗЕМНИХ ОРГАНІВ, ТРАВИ, ГЕНЕРАТИВНИХ ОРГАНІВ

Мета: Ознайомитись з критеріями ідентифікації С монографій ДФУ 2.0 різних видів ЛРС

ПЛАН САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

1. Ідентифікація сировини, що стандартизують за наявністю флавоноїдних сполук та фенолкарбонових кислот
2. Ідентифікація сировини, що стандартизують за наявністю сесквітерпенових сполук
3. Ідентифікація сировини, що стандартизують за наявністю глікозидів терпеноїдів
4. Ідентифікація сировини, що містить гідроксиантраценові похідні.

ІНФОРМАЦІЙНИЙ МАТЕРІАЛ

За матеріалами Методичних рекомендацій «Фармакопейні вимоги до методик контролю якості ЛРС / Котов А.Г., Гарна С.В., Котова Е.Е., Колесніков О.В., Васильєва О.А., Бондарева Л.В., Бурд Н.Б., Дроздова О.О., Міщенко В.А.- Х.: 2016.

1. Ідентифікація сировини, що стандартизують за наявністю флавоноїдних сполук та фенолкарбонових кислот

Ідентифікацію сировини, що стандартизують за наявністю флавоноїдних сполук та фенолкарбонових кислот, проводять з використанням стандартних речовин: гіперозиду, рутину, кверцетину, кофейної та хлорогенової кислот у різних комбінаціях (рідко у комбінацій' з іншими флавоноїдами, специфічними для конкретної ЛРС). При цьому найчастіше використовуються три варіанта хроматографічних умов.

Перший варіант-. Рухома фаза: мурашина кислота безводна- оцтова кислота льодяна-вода-етилацетат у співвідношенні (11:11:27:100), виявлення - обприскування розчинами аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти в метанолі/етилацетаті та макроголу в метанолі/етилацетаті, перегляд при 365 нм.

Використовується в наступних монографіях: «Алтеї листя», «Алтеї трава», «Артишоку листя», «Бобівника трилистого листя» (національна частина), «Зірчастий аніс», «Сафлору квітки», «Фіалка триколірна (квітучі надземні частини)».

Майже таке ж співвідношення даної рухомої фази (7.5:7.5:17.5:67.5) використовується у монографіях «Гінкго листя», «М'яточник чорний», «Плакун», «Хвоща стебла». Враховуючи коефіцієнт перерахунку одного співвідношення на інше ($11/7.5=1.4667$, $27/1.4667=18.4$, $100/1.4667=68$), одержуємо співвідношення компонентів рухомої фази (7.5:7.5:18:68), яке відповідно до вимог ДФУ 2.2.46 «Методи хроматографічного розділення» щодо коректування умов хроматографування є придатним по відношенню до (7.5:7.5:17.5:67.5). Таким чином, дані умови хроматографування використовується при проведенні ідентифікації в 11 монографіях ДФУ на різні види ЛРС.

Та сама рухома фаза тільки в співвідношенні (7:7:14:72) описана в монографії ДФУ «Спориш», а також в монографіях ДАС, де застосовується для ідентифікації більше 10 видів сировини (наприклад, примули квіток, мучниці листя, малини листя, суниці листя, вероніки трави, чорниці листя, гречки трави та ін.)

Приклад: методика ідентифікації ЛРС, що містить флавоноїдні сполуки та фенолкарбонові кислоти (1-ий варіант).

Монографія ДФУ «Фіалка триколірна (квітучі надземні частини).

Випробовуваний розчин. 2.0 г здрібненої на порошок сировини (355)

(2.9.12) нагрівають у водяній бані при температурі 65°C протягом 5 хв., часто перемішуючи, з 10 мл етанолу (70 %, об/об) Р, охолоджують і фільтрують.

Розчин порівняння. 2.5 мг рутину Р, 2.5 мг гіперозиду Р та 1.0 мг кофейної кислоти Р розчиняють у метанолі Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

Пластика: ТШХ пластика із шаром силікагелю Р.

Рухома фаза: мурашина кислота безводна Р - оцтова кислота Р - вода Р - етилацетат Р (11:11:27:100).

Об'єм проб. 10 мкл, смугами.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 12 см від лінії старту.

Висушування: при температурі (100-105) С.

Виявлення: обприскують розчином 10 г/л дифенілборної кислоти аміноетилового ефіру Р і 50 г/л макрогелю 400 Р у метанолі Р, пластикку висушують на повітрі протягом 30 хв.; переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

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

Другий варіант: Рухома фаза: мурашина кислота безводна - вода - метилетилкетон - етилацетат у співвідношенні (10:10:30:50), виявлення: обприскування розчинами аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти в метанолі/етилацетаті та макрогелю в метанолі/етилацетаті та перегляд при 365 нм.

Використовується в наступних монографіях ДФУ: «Арніки квітки», «Берези листя», «Бузини квітки», «Глоду листя та квітки», «Глоду плоди», «Дивини квітки», «Ехінацеї пурпурової трава», «Золотушник», «Золотушник європейський», «Липи квітки», «Пасифлора», а також в монографії ДАС, де використовується для ідентифікації сировини грициків трави.

Приклад: методики ідентифікації ЛРС, що містить флавоноїдні сполуки та фенолкарбонові кислот (2-ий варіант).

Монографія ДФУ «Глоду листя та квітки»

Випробовуваний розчин. До 1.0 г здрібноної на порошок сировини (355) додають 10 мл метанолу Р, нагрівають у водяній бані при температурі 65°C зі зворотним холодильником протягом 5 хв., охолоджують і фільтрують.

Розчин порівняння. 1.0 мг хлорогенової кислоти Р і 2.5 мг гіперозиду Р розчиняють у 10 мл метанолу Р.

Пластика: ТШХ пластика із шаром силікагелю Р.

Рухома фаза: мурашина кислота безводна Р - вода Р - метилетилкетон Р - етилацетат Р (10:10:30:50).

Об'єм проб: 20 мкл, смугами.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 15 см від лінії старту.

Висушування: при температурі (100-105)°С.

Виявлення: обприскують розчином 10 г/л дифенілборної кислоти аміноетилового ефіру Р у метанолі Р. Потім пластикку обприскують розчином 50 г/л макрогелю 400 Р у метанолі Р, сушать на повітрі протягом 30 хв. і переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

Результати: нижче наведено послідовність зон на хроматограмах розчину

порівняння та випробовуваного розчину. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть виявлятися також інші флуоресціюючі зони.

Третій варіант: Рухома фаза: мурашина кислота безводна - вода - етилацетат у співвідношенні (10:10:80), виявлення: обприскування розчинами аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти в метанолі/етилацетаті та макроголу в метанолі/етилацетаті та перегляд при 365 нм.

Використовується в наступних монографіях ДФУ: «Гречки трава», «Кульбаби лікарської корені», «Кульбаби лікарської трава з коренями», «Нагідок квітки», «Парило», «Ясеня листя», а також в монографіях ДАС, де використовується для ідентифікації більш як 10 видів сировини (наприклад сушениці квіток, омели, меліси листя, розторопші трави та плодів, мальви листя, підмаренника трави, чорної смородини листя та ін.).

Ті ж самі умови визначення, тільки з дещо іншими співвідношеннями компонентів рухомої фази використовуються ще в декількох монографіях ДФУ:

- у співвідношенні (6:9:90) у монографії ДФУ «Звіробій»
- у співвідношенні (8:8:84) у монографії ДФУ «Приворотень»
- у співвідношенні (6:6:88) у монографіях ДАС «Волоського горіху листя» та «Троянди пелюстки»
- у співвідношенні (8:12:80) у монографіях ДАС «Перстачу гусячого трава» та «Ожини листя».

Приклад: методика ідентифікації ЛРС, що містить флавоноїдні сполуки та фенолкарбонові кислот (3-ій варіант).

Монографія ДФУ «Гречки трава»

Випробовуваний розчин. До 0.5 г здрібненої на порошок сировини (355) додають 5.0 мл метанолу Р, нагрівають у водяній бані зі зворотним холодильником при температурі 60°C протягом 10 хв., охолоджують і фільтрують.

Розчин порівняння. 10 мг гіперозиду Р і 10 мг рутину Р розчиняють у 10 мл метанолу Р.

Пластинка: ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р ((5-40) мкм) (або ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р (2-10) мкм)).

Рухома фаза: мурашина кислота безводна Р - вода Р- етилацетат Р (10:10:80).

Об'єм проб: 20 мкл (або 5 мкл), смугами 15 мм (або 8 мм).

Відстань, що має пройти рухома фаза: 10 см (або 6 см) від лінії старту.

Висушування: при температурі (100-105)°С.

Виявлення: обробляють розчином 10 г/л дифенілборної кислоти аміноетилового ефіру Р у метанолі Р, потім обробляють розчином 50 г/л макроголу 400 Р у метанолі Р, висушують на повітрі протягом 30 хв., переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

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

Таким чином, спостерігається достатньо вузький спектр використовуваних умов хроматографування для ідентифікації флавоноїдів та фенолкарбонових

кислот у дуже великій кількості ЛРС (більш 55 видів). Для кожних з умов регламентовано положення зон-свідків, які також є уніфікованими, що в результаті дозволяє контролювати придатність хроматографічної системи у всіх випадках. Крім того, зазначені рухомі фази є уніфікованими не тільки для ідентифікації вказаних БАР, а також і для інших класів речовин (наприклад, іридоїдів, похідних орто-дигідроксикоричної кислоти, тощо) в різних видах ЛРС.

2. Ідентифікація сировини, що стандартизують за наявністю сесквітерпенових сполук

Ідентифікацію сировини, що містить ефірну олію, яку стандартизують за наявністю сесквітерпенових сполук, часто проводять в наступних хроматографічних умовах: рухома фаза: етилацетат-толуол у співвідношенні (5:95), виявлення: обприскування розчином анісового альдегіду та перегляд при денному світлі після нагріву при 100-105°C.

Використовується в наступних монографіях ДФУ: «Деревій», «Коріандр», «Лаванди квітки», «М'яти перцевої листя», «Розмарину листя», «Ромашки квітки», «Шавлії листя», «Шавлії лікарської листя N», «Шавлії трилопатевої листя», «Яловець», а також в монографіях ДАС, де використовується для ідентифікації женьшеню китайського, фенхелю гіркого, а та ж сама рухома фаза в співвідношенні (3:97) - для ідентифікації лепехи коренів. В якості речовин свідків при цьому часто використовується цинеол у варіації із іншими речовинами (тимол, борнеол, ліналол, гвайазулен та ін.).

Приклад: методика ідентифікації ЛРС, що містить сесквітерпенові сполуки.

Монографія ДФУ «Розмарину листя»:

Випробовуваний розчин. 20 мкл олії, одержаної при кількісному визначенні, розчиняють у 1 мл гексану Р.

Розчин порівняння. 5 мг борнеолу Р, 5 мг борнілацетату Р і 10 мкл цинеолу Р розчиняють в 1 мл гексану Р.

Пластика: ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р.

Рухома фаза: етилацетат Р - толуол Р (5:95).

Об'єм проб: 10 мкл, смугами.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 15 см від лінії старту.

Висушування: на повітрі.

Виявлення: обробляють анісового альдегіду розчином Р, нагрівають при температурі (100-105)°C протягом 10 хв і переглядають при денному світлі.

Результати: нижче наведено послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину.

3. Ідентифікація сировини, що стандартизують за наявністю глікозидів терпеноїдів

Ще один приклад - використання відомої в фітохімічному аналізі рухомої фази бутанол - оцтова кислота льодяна - вода (так звана фаза БУВ) для ідентифікації глікозидів терпеноїдів в різних видах ЛРС. У співвідношенні вказаних компонентів (66:17:17) використовується при проведенні ідентифікації в наступних монографіях ДАС: примули корені, пирію повзучого корені, женьшеню корені, плюща листя та будри трава. У всіх

випадках в якості речовин-свідків використовується есцин у варіації з іншими речовинами (арбутин, метаніловий жовтий та ін.), проявлення проводиться обприскуванням розчином анісового альдегіду (або спиртового розчину сірчаної кислоти). Ті ж самі умови визначення, тільки з іншим співвідношенням компонентів рухомої фази, а саме (50:40:10) використовується в монографіях ДФУ «Китяток корені» та «Первоцвіту корені».

Приклад: методика ідентифікації ЛРС, що містить сесквітерпенові сполуки. Монографія ДФУ «Китяток корені»:

Випробовуваний розчин. До 1.0 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) додають 10 мл етанолу (70 %, об/об) Р, кип'ятять зі зворотним холодильником протягом 15 хв., фільтрують і охолоджують.

Розчин порівняння. 10 мг есцину Р розчиняють в етанолі (70 %, об/об) Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

Пластинка: ТШХ пластинка із шаром силікагелю G Р.

Рухома фаза: верхній шар суміші оцтова кислота льодяна Р - вода Р - бутанол Р (10:40:50).

Об'єм проб: 10 мкл випробовуваного розчину та 10 мкл і 40 мкл розчину порівняння, смугами 20 x 3 мм.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 12 см від лінії старту.

Висушування: при (100-105) С.

Виявлення А: обприскують анісового альдегіду розчином Р, використовуючи 10 мл на пластинку площею 200 мм², нагрівають при температурі (100-105)°С до появи червоних зон, відповідних сапонозидам на хроматограмі випробовуваного розчину.

Результати А: на хроматограмі випробовуваного розчину у нижній і середній частинах з'являються (3-5) червоних зон на рівні сіро-фіолетових зон, відповідних есцину на хроматограмі розчину порівняння.

4. Ідентифікація сировини, що містить гідроксиантраценові похідні

В ЄФ/ДФУ в 6 монографіях використовуються ТШХ методики визначення гідроксиантраценових похідних. Методики відрізняються, але слід відмітити, що в монографіях «Касії вузьколистий плоди», «Касії гостролистий плоди», «Касії листя» використовується повністю уніфікована для цих об'єктів ТШХ-методика. Це стосується приготування випробовуваного розчину; використання розчину порівняння ФСЗ касії екстракту, рухомої фази (оцтова кислота льодяна Р - вода Р - етилацетат Р

- пропанол Р (1:30:40:40), тощо. Тобто методика розрахована на ідентифікацію сенозидів.

Для ідентифікації антронів в монографіях «Каскара», «Крушини кора» (ДФУ), «Алое барбадоське», «Алое капське» (ЄФ) також використовується загальна уніфікована ТШХ-методика. Це і використання у якості розчину порівняння барбалоїну Р, і однакова рухома фаза (вода Р—метанол Р — етилацетат Р (13:17:100), і розчини для проявлення хроматограм. Так, розчин 100 г/л калію гідроксиду Р у метанолі Р використовується в усіх монографіях, а розчин нітротетразолієвого синього Р у метанолі Р тільки у

монографіях «Каскара», «Крушини кора».

- Різниця методик тільки в цілях дослідження - це або ідентифікація, або ідентифікація сумісно із визначенням інших видів сировини.

- *Приклад:* методика ідентифікації ЛРС, що містить гідроксиантраценові похідні.

- Монографія ДФУ «Касії листя»:

- С. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

- *Випробовуваний розчин.* До 0.5 г здрібненої на порошок сировини (180) (2.9.12) додають 5 мл суміші рівних об'ємів 96 % спирту Р і води Р, нагрівають до кипіння, центрифугують і використовують надосадову рідину.

- *Розчин порівняння.* 10 мг ФСЗ сени екстракту розчиняють в 1 мл суміші рівних об'ємів 96 % спирту Р і води Р (залишається невелика кількість нерозчинених частинок).

- *Пластика:* ТШХ пластика із шаром силікагелю G Р.

- *Рухома фаза:* кислота оцтова льодяна Р - вода Р - етилацетат Р - пропанол Р (1:30:40:40).

- *Об'єм проби, що наноситься:* 10 мкл, смугами, 20 ммх.2 мм.

- *Відстань, що має пройти рухома фаза:* 10 см від лінії старту.

- *Висушування:* на повітрі.

- *Виявлення:* пластинку обприскують розчином 20 % (об/об) кислоти азотної Р і нагрівають при температурі 120°C протягом 10 хв., охолоджують і обприскують розчином 50 г/л калію гідроксиду Р у спирті (50 % об/об) до виявлення зон.

- *Результати:* на хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися основні зони (сенозиди В, А, D і С у порядку зростання значень R_f) на рівні основних зон на хроматограмі розчину порівняння, відповідні їм за розміром і забарвленням. Між зонами, що відповідають сенозидам D і С, може виявлятися червона зона, відповідна реїн-8-глюкозиду.

ТЕМИ 6-8. СУЧАСНІ ПІДХОДИ, ОБҐРУНТУВАННЯ ТА ВИБІР КРИТЕРІЇВ СТАНДАРТИЗАЦІЇ - КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЗА ДОПОМОГОЮ ТИТРИМЕТРИЧНИХ, СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИХ ТА ХРОМАТОГРАФІЧНИХ МЕТОДІВ БАР В ЛРС ТА ФП ЗА ВИМОГАМИ ДФУ 2.0

Мета: Ознайомитись з підходами до обрання методів та методик кількісного визначення БАР в ЛРС та ФП.

ПЛАН САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

1. Сучасні підходи, обґрунтування та вибір критеріїв стандартизації - - кількісного визначення за допомогою титриметричних методів БАР в ЛРС та ФП за вимогами ДФУ 2.0.

2. Сучасні підходи, обґрунтування та вибір критеріїв стандартизації - - кількісного визначення за допомогою спектрофотометричних методів БАР в ЛРС та ФП за вимогами ДФУ 2.0.
3. Сучасні підходи, обґрунтування та вибір критеріїв стандартизації - - кількісного визначення за допомогою хроматографічних методів БАР в ЛРС та ФП за вимогами ДФУ 2.0.

ІНФОРМАЦІЙНИЙ МАТЕРІАЛ

За матеріалами Методичних рекомендацій «Фармакопейні вимоги до методик контролю якості ЛРС / Котов А.Г., Гарна С.В., Котова Е.Е., Колесніков О.В., Васильєва О.А., Бондарева Л.В., Бурд Н.Б., Дроздова О.О., Міщенко В.А.- Х.: 2016.

Перша група методик:

У 18 монографіях як єдиний кількісний показник оцінюється вміст ефірної олії методом перегонки з водяною парою. Взагалі вміст ефірної олії визначається у 35 монографіях (в деяких також додатково визначаються інші БАР сировини різними методами);

- в 11 монографіях - в сировині регламентується показник набухання;
- у 8 монографіях - вміст екстрактних речовин та показник гіркоти;
- у 7 монографіях використовується метод титрування, з них у 4 - для визначення суми алкалоїдів.

Таким чином, у 44 монографіях (що складають біля 30% від загального числа) в ЛРС для кількісного визначення використовуються не інструментальні методи і тільки в 5 монографіях із загальної кількості відсутній будь-який кількісний показник.

Друга група методик:

У 45 монографіях, що складають біля 30% від загального числа методик, (майже всі вони містяться в ЄФ-частині монографії) для кількісної оцінки БАР в рослинній сировині використовуються хроматографічні методики, 38 із них - методики з використанням вискоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) і 7 — методики з використанням газової хроматографії (ГХ).

Безумовно, дані методики є високоселективними, дозволяють об'єктивно оцінювати вміст активних компонента/компонентів сировини, проте на даному етапі є недостатньо доступними для вітчизняних фармацевтичних підприємств.

Третя група методик:

Методики цієї групи сьогодні є найбільш актуальними. У 55 монографіях (що складає біля 37%) використовуються спектрофотометричні (СФ) методики визначення кількісного вмісту суми компонентів лікарської рослинної сировини, причому у 36 монографіях в методиках при розрахунку використовується метод питомого показника поглинання (МППП), що вирішує проблему, пов'язану з необхідністю використання дорогих стандартів.

Аналіз підходів ЄФ до стандартизації ЛРС при використанні СФ-методу для кількісного визначення БАР показав, що ЄФ використовує як попереднє виділення визначуваного класу сполук сировини, так і подальше проведення реакції виділених речовин із специфічним для них реактивом, що приводить до отримання забарвлених розчинів, які визначають СФ-методом за певної аналітичної довжини хвилі.

В результаті апробації СФ-методик ЄФ для більш 20 видів ЛРС було відмічено, що навіть при використанні МППП, максимума поглинання спектрів випробовуваних розчинів сировини ні в одному випадку не відрізняються (± 2 нм) від довжини хвилі, для якої в методиці дано значення ППП того або іншого стандарту, на який проводиться перерахунок вмісту БАР. Таким чином, СФ-методики ЄФ є специфічними, навіть при використанні МППП.

Даний підхід використаний при розробці 12 альтернативних національних СФ-методик монографій «Буркуну трава», «Глоду плоди», «Деревію трава», «Ехінацеї пурпурової корені», «Звіробій», «Кропиви листя», «Материнки трава», «Мучниці листя», «Нирковий чай», «Подорожника великого листя», «Розторопші плоди», «Ромашки квітки».

УНІФІКОВАНІ СФ-МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ

У ЄФ/ДФУ для близьких класів БАР у різних видах ЛРС при їх кількісному аналізі СФ-методом використовуються уніфіковані методики, що наводяться далі.

Флавоноїди

В ЄФ/ДФУ у 18 монографіях для визначення даного класу БАР у ЛРС використовуються дві спектрофотометричні методики.

агліконів флавонолів та їх глікозидів

Приклад: методика кількісного визначення флавоноїдів у перерахунку на гіперозид. Монографія ДФУ «Берези листя»:

Вихідний розчин. 0.200 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) поміщають у круглодонну колбу місткістю 100 мл, додають 1 мл розчину 5 г/л гексаметилентетраміну Р, 20 мл ацетону Р і 2 мл хлористоводневої кислоти Р1, кип'ятять зі зворотним холодильником протягом 30 хв. і фільтрують крізь тампон із вати у колбу місткістю 100 мл. Тампон із вати додають до залишку у круглодонну колбу та екстрагують 2 порціями, по 20 мл кожна, ацетону Р, кожний раз проводячи кип'ятіння зі зворотним холодильником протягом 10 хв., охолоджують до кімнатної температури, фільтрують кожний екстракт крізь тампон із вати у колбу. Одержані охолоджені об'єднані ацетонові екстракти фільтрують крізь паперовий фільтр у мірну колбу, доводять об'єм розчину ацетоном Р до 100 мл, обполіскуючи колбу та паперовий фільтр. 20.0 мл одержаного розчину поміщають у ділильну лійку, додають 20 мл води Р і екстрагують суміш із 15 мл, а потім із 3 порціями, по 10 мл кожна, етилацетату Р. Одержані етилацетатні витяги об'єднують у ділильній лійці, промивають 2 порціями, по 50 мл кожна, води Р, фільтрують над 10 г натрію сульфату безводного Р у мірну колбу місткістю 50 мл і доводять об'єм розчину етилацетатом Р до 50.0

мл.

Випробовуваний розчин. До 10.0 мл вихідного розчину додають 1 мл алюмінію хлориду реактиву Р і доводять розчином 5 % (об/об) оцтової кислоти льодяної Р у метанолі Р до об'єму 25.0 мл.

Компенсаційний розчин. 10.0 мл вихідного розчину доводять розчином 5 % (об/об) оцтової кислоти льодяної Р у метанолі Р до об'єму 25.0 мл.

Вимірюють оптичну густину (2.2.25) випробовуваного розчину через 30 хв. у порівнянні із компенсаційним розчином за довжини хвилі 425 нм.

Вміст флавоноїдів, у перерахунку на гіперозид, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{A \times 1.25}{m}$$

де: A - оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 425 нм, m - маса наважки випробовуваної сировини, у грамах.

Використовують питомий показник поглинання гіперозиду, що дорівнює 500.

1.1.1. Друга методика заснована на спектрофотометричному визначенні глікозидів флавоноїдів (як флавонолів, так і флавонів) після реакції із сумішшю борна - щавлева кислота в середовищі мурашина - оцтова кислот. Структурні формули найбільш відомих флавонів представлені на рис.2.

5-оксифлавоноли і 5-оксифлавоноли, тобто ті, що мають ОН-групу, яка знаходиться в орто-положенні до карбоксильної групи, з борною кислотою за наявності щавлевої кислоти утворюють комплекс яскраво-жовтого кольору.

При використанні даної методики обчислення вмісту флавоноїдів проводять у перерахунку на ППП гіперозиду за довжини хвилі 410 нм (монографії «Глоду листя та квітки» та «Глоду листя та квітки» національна), на ППП вітексина за довжини хвилі 628 нм (монографія «Пасифлора»), на ППП віолантина за довжини хвилі 405 нм (монографія «Фіалка триколірна»), або з використанням стандарту лютеоліна/лютеолін-7-глюкозида за довжини хвилі 410 нм (національні монографії «Материнки трава» та «Ромашки квітки»).

Таким чином, при виборі стандарту, в перерахунку на який визначають вміст флавоноїдів, враховують як присутність даної речовини в досліджуваній сировині, так і відповідність максимумів поглинання спектрів випробовуваного розчину і розчину вибраного стандарту.

Приклади: методики кількісного визначення флавоноїдів у перерахунку на гіперозид/лютеолін-7-глюкозид.

Монографія ДФУ «Глоду листя та квітки»:

Вихідний розчин. 0.400 г здрібненої на порошок сировини (250) (2.9.12) поміщають у колбу місткістю 200 мл, додають 40 мл етанолу (60 %, об/об) Р, нагрівають у водяній бані при температурі 60°C протягом 10 хв., обережно струшуючи, охолоджують і фільтрують крізь тампон із вати у мірну колбу місткістю 100 мл. Поміщають тампон із вати із залишком сировини у ту саму колбу місткістю 200 мл, додають 40 мл етанолу (60 %, об/об) Р, знову

нагрівають у водяній бані при температурі 60°C протягом 10 хв., обережно струшуючи, охолоджують і фільтрують у мірну колбу місткістю 100 мл. Колбу місткістю 200 мл і фільтр обполіскують додатковою кількістю етанолу (60 %, об/об) Р, переносять у ту саму мірну колбу місткістю 100 мл, доводять об'єм суміші етанолом (60 %, об/об) Р до 100 мл і фільтрують.

Випробовуваний розчин. 5.0 мл вихідного розчину поміщають у круглодонну колбу та упарюють насухо під зниженим тиском. Одержаний залишок за допомогою 8 мл суміші метанол Р - оцтова кислота безводна Р (10:100) переносять у мірну колбу місткістю 25 мл. Обполіскують круглодонну колбу 3 мл суміші метанол Р - оцтова кислота безводна Р (10:100) і одержаний розчин поміщають у ту саму мірну колбу місткістю 25 мл. До одержаного розчину додають 10.0 мл розчину, що містить 25.0 г/л борної кислоти Р, 20.0 г/л щавлевої кислоти Р у мурашиній кислоті безводній Р, і доводять об'єм розчину оцтовою кислотою безводною Р до 25.0 мл.

Компенсаційний розчин. 5.0 мл вихідного розчину поміщають у круглодонну колбу та упарюють насухо під зниженим тиском. Одержаний залишок за допомогою 8 мл суміші метанол Р - оцтова кислота безводна Р (10:100) переносять у мірну колбу місткістю 25 мл. Обполіскують круглодонну колбу 3 мл суміші метанол Р - оцтова кислота безводна Р (10:100) і одержаний розчин поміщають у ту саму мірну колбу місткістю 25 мл. До одержаного розчину додають 10.0 мл мурашиної кислоти безводної Р і доводять об'єм розчину оцтовою кислотою безводною Р до 25.0 мл.

Оптичну густину (2.2.25) випробовуваного розчину вимірюють через 30 хв. після приготування за довжини хвилі 410 нм.

Вміст суми флавоноїдів, у перерахунку на гіперозид, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{A \times 1.235}{m}$$

де: A - оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 410 нм;

m - маса наважки випробовуваної сировини, у грамах.

Використовують питомий показник поглинання гіперозиду за довжини хвилі 410 нм, що дорівнює 405.

Монографія ДФУ «Ромашки квітки »:

Вихідний розчин 1. 0.250 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) поміщають у колбу місткістю 200 мл, додають 40 мл етанолу (60 %, об/об) Р, нагрівають у водяній бані при температурі 60°C протягом 10 хв., обережно струшуючи, охолоджують і фільтрують крізь тампон із вати у мірну колбу місткістю 100 мл. Поміщають тампон із вати із залишком сировини у ту саму колбу місткістю 200 мл, додають 40 мл етанолу (60 %, об/об) Р, знову нагрівають у водяній бані при температурі 60°C протягом 10 хв., обережно струшуючи, охолоджують і фільтрують у ту саму мірну колбу місткістю 100 мл. Колбу місткістю 200 мл і фільтр обполіскують етанолом (60 %, об/об) Р, промивну рідину переносять у ту саму мірну колбу місткістю 100 мл, доводять об'єм суміші етанолом (60 %, об/об) Р до 100 мл і фільтрують.

Випробовуваний розчин. 5.0 мл вихідного розчину 1 поміщають у

круглодонну колбу та упарюють насухо під зниженим тиском. Одержаний залишок за допомогою 8 мл суміші метанол Р - оцтова кислота безводна Р (10:100) переносять у мірну колбу місткістю 25 мл. Круглодонну колбу обполіскують 3 мл суміші метанол Р - оцтова кислота безводна Р (10:100) і промивну рідину поміщають у ту саму мірну колбу місткістю 25 мл. До одержаного розчину додають 10.0 мл розчину, що містить 25.0 г/л борної кислоти Р, 20.0 г/л щавлевої кислоти Р у мурашиній кислоті безводній Р, і доводять об'єм розчину оцтовою кислотою безводною Р до 25.0 мл.

Компенсаційний розчин 1. 5.0 мл вихідного розчину 1 поміщають у круглодонну колбу та упарюють насухо під зниженим тиском. Одержаний залишок за допомогою 8 мл суміші метанол Р - оцтова кислота безводна Р (10:100) переносять у мірну колбу місткістю 25 мл. Обполіскують круглодонну колбу 3 мл суміші метанол Р - оцтова кислота безводна Р (10:100) і промивну рідину поміщають у ту саму мірну колбу місткістю 25 мл. До одержаного розчину додають 10.0 мл мурашиної кислоти безводної Р і доводять об'єм розчину оцтовою кислотою безводною Р до 25.0 мл.

Вихідний розчин 2. 0.015 г (точна наважка) ФСЗ ДФУ лютеолін 7-глюкозиду або 0.010 г (точна наважка) ФСЗ ДФУ лютеоліну поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняють у 70 мл метанолу Р, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки і перемішують.

Розчин порівняння. 1.0 мл вихідного розчину 2 переносять у мірну колбу місткістю 25 мл, додають 10.0 мл розчину, що містить 25.0 г/л борної кислоти

Р, 20.0 г/л щавлевої кислоти Р у мурашиній кислоті безводній Р, і доводять об'єм розчину оцтовою кислотою безводною Р до 25.0 мл.

Компенсаційний розчин 2. 1.0 мл вихідного розчину 2 переносять у мірну колбу місткістю 25 мл, додають 10.0 мл мурашиної кислоти безводної Р і доводять об'єм розчину оцтовою кислотою безводною Р до 25.0 мл

Оптичну густину (2.2.25) випробовуваного розчину вимірюють через 30 хв. після приготування за довжини хвилі 410 нм відносно компенсаційного розчину 1.

Паралельно вимірюють оптичну густину розчину порівняння відносно компенсаційного розчину 2.

Вміст суми флавоноїдів, у перерахунку на лютеолін 7-глюкозид і суху сировину, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{A_1 \times m_0 \times 20 \times P}{A_0 \times m \times (100 - W)}$$

де: A_1 - оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 410 нм,

A_0 - оптична густина розчину порівняння за довжини хвилі 410 нм, m_0 -

маса наважки *ФСЗ ДФУ лютеолін 7-глюкозиду*, у грамах, m - маса

наважки випробовуваної сировини, у грамах,

P - вміст лютеолін 7-глюкозиду у *ФСЗ ДФУ лютеолін 7-глюкозиду*, у відсотках,

W - втрата в масі при висушуванні сировини, у відсотках,

або за формулою:

$$\frac{A_1 \times m_0 \times 20 \times P \times 1.63}{A_0 \times m \times (100 - W)}$$

де: A_1 - оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 410 нм,
 A_0 - оптична густина розчину порівняння за довжини хвилі 410 нм, m_0 -
 маса наважки ФСЗ ДФУ лютеоліну, у грамах, m - маса наважки
 випробовуваної сировини, у грамах,

1.63 - коефіцієнт перерахунку лютеоліну на лютеолін-7-глюкозид,

P - вміст лютеоліну у ФСЗ ДФУ лютеоліну, у відсотках,

W - втрата в масі при висушуванні сировини, у відсотках.

Таніни.

В ЄФ/ДФУ в 12 монографіях на ЛРС використовується загальна СФ-методика визначення вмісту танінів, яка описана в розділі 2.8 ДФУ 2.0 «Методи фармакогнозії». Таніни визначають після адсорбції виділених із сировини поліфенолів порошком шкіри. В основі методики визначення поліфенолів лежить широко відома реакція з реактивом Фоліна (у модифікації реактив Фоліна-Чиокалтеу), який складається з солей фосфорновольфрамової і фосфорномолібденової кислот. Ці солі при взаємодії з фенолами і поліфенолами відновлюються з утворенням нижчих оксидів металів, комплекси яких забарвлені в синій колір. Інтенсивність забарвлення за довжини хвилі 760 нм дозволяє судити про кількість фенольних сполук сировини. Як стандарт використовується пірогалол, який є простішим поліфенолом (3-х атомний фенол).

Приклад: методики кількісного визначення танінів. Загальна стаття ДФУ 2.8.14 «Визначення танінів в лікарських рослинних засобах»:

Випробовуваний розчин. 1.000 г здрібненої на порошок сировини (355)

(2.9.12) поміщають у круглодонну колбу місткістю 250 мл, додають 150 мл води Р, нагрівають протягом 30 хв. на водяній бані, охолоджують під проточною водою та кількісно переносять у мірну колбу місткістю 250 мл.

Круглодонну колбу обполіскують водою Р, промивні води переносять у мірну колбу та доводять об'єм розчину водою Р до 250.0 мл. Дають осадити та рідину фільтрують крізь фільтрувальний папір діаметром 125 мм, відкидаючи перші 50 мл фільтрату.

5.0 мл одержаного фільтрату доводять водою Р до об'єму 25.0 мл. До 2.0 мл одержаного розчину додають 1.0 мл фосфорномолібденово-вольфрамового реактиву Р, 10.0 мл води Р, перемішуючи після кожного додавання, та доводять розчином 290 г/л натрію карбонату Р до об'єму 25.0 мл. Через 30 хв. вимірюють оптичну густина (2.2.25) розчину за довжини хвилі 760 нм (A_1), використовуючи як компенсаційну рідину воду Р.

Поліфеноли, що не адсорбуються шкірним порошком. До 10 мл фільтрату додають 0.10 г ФСЗ ДФУ шкірного порошку і енергійно струшують протягом 60 хв. Суміш фільтрують і доводять 5.0 мл фільтрату водою Р до об'єму 25.0 мл. До 2.0 мл одержаного розчину додають 1.0 мл фосфорномолібденово-вольфрамового реактиву Р, 10.0 мл води Р, перемішуючи після кожного додавання, та доводять розчином 290 г/л натрію карбонату Р до об'єму 25.0 мл. Через 30 хв. вимірюють оптичну густина

(2.2.25) розчину за довжини хвилі 760 нм (A_2), використовуючи як компенсаційну рідину воду Р.

Розчин порівняння. Безпосередньо перед випробуванням 0.050 г пірогалолу Р розчиняють у воді Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100.0 мл. 5.0 мл одержаного розчину доводять водою Р до об'єму 100.0 мл.

До 2.0 мл одержаного розчину додають 1.0 мл фосфорномолібденово-вольфрамового реактиву Р, 10.0 мл води Р, перемішуючи після кожного додавання, та доводять розчином 290 г/л натрію карбонату Р до об'єму 25.0 мл. Через 30 хв. вимірюють оптичну густину (2.2.25) розчину за довжини хвилі 760 нм (A_3), використовуючи як компенсаційну рідину воду Р.

Гідроксикоричні кислоти.

В ЄФ/ДФУ в 8 монографіях використовується загальна СФ-методика визначення вмісту суми гідроксикоричних кислот.

ЄФ використовує її для кількісного визначення даного класу БАР в монографіях «Ash leaf» («Ясена листя», вміст кислот розраховують в перерахунку на кислоту хлорогенову), «Black horehound» («М'яточник», вміст кислот розраховують в перерахунку на актеозид), «Ribwort plantain» («Подорожник ланцетолистий», вміст кислот розраховують в перерахунку на актеозид), «Rosemary leaf» («Розмарину листя», вміст кислот розраховують в перерахунку на кислоту розмаринову).

У всіх випадках використовується метод ППП.

Методика заснована на реакції комплексоутворення з розчином солей натрію молібдату і натрію нітриту, внаслідок чого в лужному середовищі утворюється рожево-оранжевий розчин, забарвлення якого залежить від співвідношення різних похідних кислоти коричнеї в конкретній сировині.

Довжина хвилі вимірювання залежить від максимуму поглинання комплексу стандартної речовини, в перерахунок на яку проводять обчислення кількісного вмісту.

Дана методика була використана при розробці національних методик для монографій «Подорожника великого листя», «Ехинацеї пурпурової корені» (з використанням стандарту цикорієвої кислоти), «Нирковий чай».

Приклади: методики кількісного визначення гідроксикоричних кислот.

Монографія ДФУ «Подорожник ланцетолистий»:

Вихідний розчин. 1.000 г здрібненої на порошок сировини (355) (2.9.12) поміщають у колбу, додають 90 мл етанолу (50 % об/об) Р, кип'ятять у водяній бані зі зворотним холодильником протягом 30 хв. Охолоджують і фільтрують у мірну колбу місткістю 100 мл. Колбу і фільтр промивають 10 мл етанолу (50 % об/об) Р. Одержаний фільтрат і промивну рідину об'єднують і доводять етанолом (50 % об/об) Р до об'єму 100.0 мл.

Випробовуваний розчин. У мірну колбу місткістю 10 мл поміщають, перемішуючи після кожного додавання, 1.0 мл вихідного розчину, 2 мл 0.5 М розчину кислоти хлористоводневої, 2 мл розчину, приготованого розведенням 10 г натрію нітриту Р і 10 г натрію молібдату Р у 100 мл води Р, і 2 мл розчину натрію гідроксиду розведеного Р. Одержаний розчин

доводять водою Р до об'єму 10.0 мл.

Відразу вимірюють оптичну густину (2.2.25) випробовуваного розчину за довжини хвилі 525 нм, використовуючи як компенсаційну рідину розчин, приготований таким чином: у мірну колбу місткістю 10 мл поміщають 1.0 мл вихідного розчину, 2 мл 0.5 М розчину кислоти хлористоводневої і 2 мл розчину натрію гідроксиду розведеного Р і доводять водою Р до об'єму 10.0 мл.

Вміст суми похідних орто-дигідроксикоричної кислоти, у перерахунку на актеозид, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{A \times 1000}{185 \times m},$$

де: *A* - оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 525 нм, *m* - маса наважки випробовуваної сировини, у грамах.

Використовують питомий показник поглинання актеозиду за довжини хвилі 525 нм, що дорівнює 185.

Монографія ДФУ «Нирковий чай» (національна частина):

Вихідний розчин. До 0.500 г здрібненої на порошок сировини (350)

(2.9.12) додають 80 мл етанолу (50 %, об/об) Р, нагрівають у водяній бані зі зворотним холодильником протягом 30 хв., охолоджують і фільтрують. Фільтр обполіскують 10 мл етанолу (50 %, об/об) Р, фільтрат і промивні води об'єднують у мірній колбі і доводять об'єм розчину етанолом (50%, об/об) Р до 100 мл.

Випробовуваний розчин. 1.0 мл вихідного розчину поміщають у мірну колбу місткістю 10 мл, послідовно додають, перемішуючи після кожного додавання, 2 мл 0.5 М розчину хлористоводневої кислоти, 2 мл розчину, приготованого розчиненням 10 г натрію нітриту Р і 10 г натрію молібдату Р у 100 мл води Р, 2 мл натрію гідроксиду розчину розведеного Р, доводять об'єм розчину водою Р до 10.0 мл і перемішують.

Компенсаційний розчин. 1 мл вихідного розчину доводять водою Р до 10 мл.

Оптичну густину (2.2.25) випробовуваного розчину вимірюють відразу за довжини хвилі 505 нм.

Вміст суми похідних гідроксикоричних кислот, у перерахунку на розмаринову кислоту, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{A \times 2.5}{m}$$

де: *A* - оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 505 нм; *m* - маса наважки випробовуваної сировини, у грамах.

Використовують питомий показник поглинання розмаринової кислоти, що дорівнює 400.

Гідроксиантраценові похідні.

В ЄФ/ДФУ в 6 монографіях використовується загальна СФ-методика визначення вмісту суми гідроксиантраценових похідних. Дана методика використовується в монографіях «Касії вузьколистий плоди», «Касії гостролистий плоди». «Касії листя», де перерахунок проводять з

використанням ППП сенозида В, в монографії «Ревінь», де використовується ППП реїна, в монографії «Каскара» - ППП каскарозида А, в монографії «Крушини кора», де вміст суми глюкофрангулінів визначають з використанням ППП глюкофраніуліну А. У всіх монографіях аналітична довжина хвилі при СФ-вимірюванні - 515 нм.

Методика полягає в наступному: із сировини метанолом екстрагують антраценпохідні, аліквоту екстракту після підкислення збовтують з петролейним ефіром, для видалення можливих домішок агліконів. Далі нагрівають нейтралізований водний розчин з FeCl_3 , при цьому антрони і діантрони, які можуть бути присутніми в сировині окислюються до антрахінону, а подальший гідроліз з хлористоводневою кислотою розщеплює антраглікозиди на аглікони. Виділені аглікони екстрагують ефіром, аліквоту ефірної фази упарюють насухо, залишок розчиняють в метанольному розчині магнію ацетату, при цьому утворюються забарвлені хелатні сполуки, оптичну густину розчинів яких вимірюють за 515 нм у попередньо зважену круглодонну колбу із притертою скляною пробкою зважують 0.250 г здрібненої на порошок (180) (2.9.12) сировини. У колбу додають 25.0 мл розчину 70 % (об/об) метанолу Р; перемішують, зважують, нагрівають у водяній бані зі зворотним холодильником протягом 15 хв, охолоджують, зважують і доводять розчином 70 % (об/об) метанолу Р до вихідної маси та фільтрують. 5.0 мл одержаного фільтрату переносять у ділильну лійку, додають 50 мл води Р і 0.1 мл хлористоводневої кислоти Р, струшують із 5 порціями, по 20 мл кожна, петролейного ефіру Р, витримують до розшарування та переносять водний шар у мірну колбу об'ємом 100 мл. Ефірні шари об'єднують і промивають 2 порціями, по 15 мл кожна, води Р. Промивну рідину використовують для промивання ділильної лійки та додають до водного розчину у мірну колбу. Додають 5 мл розчину 50 г/л натрію карбонату Р, доводять об'єм розчину водою Р до 100.0 мл, шар петролейного ефіру відкидають. 40.0 мл водного розчину переносять у круглодонну колбу із притертою скляною пробкою місткістю 200 мл, додають 20 мл розчину 200 г/л заліза(III) хлориду Р і нагрівають зі зворотним холодильником у водяній бані з рівнем води вищим за рівень рідини у колбі протягом 20 хв. Додають 2 мл хлористоводневої кислоти Р і продовжують нагрівати протягом ще 20 хв. при енергійному струшуванні до розчинення осаду. Одержану суміш охолоджують, переносять у ділильну лійку та струшують із 3 порціями, по 25 мл кожна, ефіру Р, що попередньо використаний для промивання колби. Ефірні витяги об'єднують і промивають 2 порціями, по 15 мл кожна, води Р. Ефірний шар переносять у мірну колбу та доводять ефіром Р до об'єму 100.0 мл. 20.0 мл розчину обережно випарюють насухо та розчиняють залишок у 10.0 мл розчину 5.0 г/л магнію ацетату Р у метанолі Р.

Оптичну густину (2.2.25) випробовуваного розчину вимірюють за довжини хвилі 515 нм, використовуючи метанол Р як компенсаційну рідину.

Вміст глюкофраніулінів, у відсотках, у перерахунку на глюкофрангулін А, обчислюють за формулою:

$$\frac{A \times 3.06}{m}$$

m

де *A* - оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 515 нм, *m* - маса наважки сировини, у грамах.

Використовують питомий показник поглинання глюкофрангуліну *A*, що дорівнює 204.

Гідрохінону похідні.

У ДФУ в монографії «*Мучниці листя*» в національній частині використовується СФ-методика визначення гідрохінон-похідних у перерахунку на арбутин. Методика описана для даної сировини в монографії DAB 10 «BSrentraubenblatter». Арбутин є похідним гідрохінону, а саме гідрохінон-Р-D-глюкопіранозидом. Феноли в присутності окисників (в даному випадку калію фериціаніду) з реактивом амінопіразолоном (4-аміноантипірином) вступають в реакцію конденсації з утворенням р-хінонімінів), які кількісно визначають СФ- методом. Після відщеплення глюкози від молекули арбутину, гідрохінон вступає в зазначену реакцію з утворенням забарвленого комплексу, який визначають СФ-методом за довжини хвилі 455 нм. Разом із арбутином в дану реакцію вступають дубильні речовини, проте їх продукти реакції нерозчинні в хлороформі, яким проводять екстракцію забарвлених комплексів, тому продукти реакції дубильних речовин залишаються в водній фазі, а комплекс гідрохінону переходить в органічну фазу.

Дана методика рекомендується для кількісного визначення гідрохінону похідних в ЛІРС, в якій указані речовини представлені здебільшого арбутином (наприклад, для брусниці листя).

Приклад: методика кількісного визначення гідрохінону похідних.

Монографія ДФУ «*Мучниці листя*»:

Вихідний розчин. До 0.4 г здрібненої на порошок сировини (250) (2.9.12) додають 50 мл води Р і кип'ятять у водяній бані зі зворотним холодильником протягом 30 хв. Після охолодження суміш за допомогою 50 мл води Р кількісно переносять у мірну колбу місткістю 250 мл, доводять водою Р до позначки та перемішують. Витримують до осадження частинок і використовують надосадову рідину.

Випробовуваний розчин. 5.0 мл вихідного розчину поміщають у ділильну ліжку, додають 45 мл води Р, 1 мл розчину 2 % (м/об) амінопіразолону Р, 0.5 мл аміаку розчину розведеного Р2 та 1 мл розчину 8 % (м/об) калію фериціаніду Р, ретельно перемішуючи після кожного додавання. Витримують протягом 5 хв., одержаний водний шар струшують не менше як із 3 порціями, по 25 мл кожна, хлороформу Р, хлороформний шар кожний раз фільтрують крізь попередньо промитий хлороформом Р фільтр у мірну колбу місткістю 100 мл, доводять об'єм розчину хлороформом Р до позначки та перемішують.

Розчин порівняння. 0.015 г (точна наважка) ФСЗ ДФУ арбутину розчиняють у 50 мл води Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100 мл. 5.0 мл одержаного розчину поміщають у ділильну ліжку та далі

вчиняють як описано при приготуванні випробовуваного розчину, починаючи зі слів «...та додають 45 мл води Р...».

Вимірюють оптичну густину (2.2.25) випробовуваного розчину за довжини хвилі 455 нм, використовуючи як компенсаційну рідину хлороформ Р. Паралельно вимірюють оптичну густину розчину порівняння.

Вміст гідрохінон-похідних, у перерахунку на арбутин, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$\frac{A \times m_0 \times 2.5 \times P}{A_0 \times m}$$

де: А - оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 455 нм,

А₀ - оптична густина розчину порівняння за довжини хвилі 455 нм,

то - маса наважки ФСЗ ДФУ арбутину, у грамах,

Р - вміст арбутину безводного у ФСЗ ДФУ арбутину, у відсотках,

т - маса наважки сировини, у грамах.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Фармакогнозія: базовий підруч. для студ. вищ. фармац. навч. закл. (фармац. ф-тів) IV рівня акредитації / В.С. Кисличенко, І.О. Журавель, С.М. Марчишин та ін. ; за ред. В.С. Кисличенко. — Харків : НФаУ : Золоті сторінки, 2015. — 736 с.
2. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». — 1-е вид. — Доповнення 3. — Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2009. - 280 с
3. Державна Фармакопея України: 1-е видання. — Харків: видавнича група «РІРЕГ». Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», — 2001. — 531 с.
4. Ресурсознавство лікарських рослин / В.С. Кисличенко, Л.В. Ленчик, О.М. Новосел, В.Ю. Кузнецова, І.Г. Гур'єва, Н.Є. Бурда, С.І. Степанова, А.І. Попик, О.А. Кисличенко, Г.С. Тартинська, І.С. Бурлака, К.С. Мусієнко: навч. посіб. — Х. НФаУ «Золоті сторінки», 2015. — 136 с.
5. Мінарченко В.М. Ресурсознавство. Лікарські рослини. Навчальний посібник - К.: Фітосоціоцентр, 2015. - 215 с.
6. Мінарченко В.М. Атлас лікарських рослин України (хорологія, ресурси та охорона) / В.М. Мінарченко, І.А. Тимченко. — К.: Фітосоціоцентр, 2002. — 172 с.
7. Зузук Б. М. Ресурсознавство лікарських рослин / Б. М. Зузук, Л. Б. Зузук. — Вінниця: Нова Книга, 2009. — 144 с.
8. Ковальов В.М., Павлій О.І., Ісакова Т.І. Фармакогнозія з основами біохімії рослин / За ред. проф. В.М. Ковальова. — Харків: Прапор, вид-во НФАУ, 2000.-704 с.

9. Гулько Р.М. Словник лікарських рослин світової медицини. – Львів: Ліга-Прес, 2005. – 506 с.
The National Center for Biotechnology Information advances science and health - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
8. Конституція України - <http://ufpp.gov.ua/content/PDF/zakonodavstvo/konstitychiya.pdf>
9. Державний кадастр територій та об'єктів природно-заповідного фонду України – <http://pzf.menr.gov.ua/пзф-україни/території-та-об'єкти-пзф-україни.html>
10. Національні природні парки - http://www.poltavalk.com.ua/index.php?option=com_content&view=article&id=849:2010-10-13-10-44-38&catid=97&Itemid=138
11. Міністерство охорони навколишнього природного середовища та ядерної безпеки України - <http://regulation.gov.ua/catalogue/regulators/id191/npa/page-3>

Навчальне видання

**Кисличенко Вікторія Сергіївна
Хворост Ольга Павлівна**

**Методичні рекомендації до самостійної роботи з дисципліни «Сучасні
підходи до створення фітопрепаратів» для здобувачів вищої освіти рівня
Phd**

За редакцією проф. В.С. Кисличенко

Формат 60x84/16. Ум. друк. арк. 3,5. Тираж _____ пр. Зам. № _____.

Національний фармацевтичний університет
вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи серії ДК № 3420 від 11.03.2009.

Надруковано з готових оригінал-макетів у друкарні ФОП Азамаєв В.Р.

Єдиний державний реєстр юридичних осіб та фізичних осіб-підприємців.

Запис № 24800170000026884 від 25.11.1998 р.

Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи до державного реєстру видавців, виготівників
і розповсюджувачів видавничої продукції.

Серія ХК № 135 від 23.02.05 р.

м. Харків, вул. Познанська 6, к. 84, тел. **(057) 362-01-52**

e-mail:bookfabrik@rambler.ru