

ФАРМАЦІЯ

DOI 10.31718/2077–1096.25.1.150

УДК 615.322.07:582.998.16

Головач А.Р.³, Ковальов С.В.¹, Ковальов В.М.²,
Дев'яткіна Н.М.¹, Карамішев Д.В.¹, Коршенко В.О.¹.

СТАНДАРТИЗАЦІЯ СИРОВИНИ ТОНКОЛУЧНИКА ОДНОРІЧНОГО

¹Полтавський державний медичний університет,²Львівський національний університет ветеринарної медицини і біотехнології ім. С. З. Гжицького,³Національний фармацевтичний університет, Харків

Лікарська рослинна сировина та препарати на їх основі використовуються у великій кількості відомими фармацевтичними виробниками та є значною частиною споживання лікарських засобів на світовому ринку. Стандартизація являє собою важливий механізм який використовують для забезпечення контролю якості препаратів рослинного походження. Термін «стандартизація» використовують для опису всіх заходів, що вживають в ході виробничого процесу і контролю якості, які сприяють виготовленню засобів з відтворюваною якістю. Встановлено, що для отримання якісних препаратів рослинного походження слід подбати про всі стадії виробництва, починаючи з належного вирощування та ідентифікації лікарських рослин, сезону та регіону їх збору і закінчуючи процесом екстракції та очищення рослинних препаратів. Рослинні препарати та готові лікарські рослинні засоби широко застосовуються протягом декількох тисячоліть. За останні десятиліття ріст виробництва препаратів з лікарської рослинної сировини та популяризація фітотерапії сприяли розширенню значної долі ринку лікарських засобів на рослинній основі. На сьогоднішній день сучасний світовий простір доля рослинних препаратів складає 70-95%. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), близько 80% світового населення використовує трави та інші традиційні лікарські засоби для реалізації їх потреб у первинній медико-санітарної допомоги.

Ключові слова: стандартизація, тонколучник однорічний, флавоноїди, гідроксикоричні кислоти, хроматографія.

Робота є фрагментом ініціативної НДР № 0124U000092 «Високо та низько інтенсивні фенотипи системної запальної відповіді: молекулярні механізми та нові медичні технології їх профілактики та корекції».

Вступ

У сучасній фармацевтичній галузі спостерігається тенденція до збільшення частки фітопрепаратів на світовому ринку лікарських засобів, що зумовлено певними перевагами рослинних лікарських засобів у порівнянні з синтетичними. Ефективністю і силою дії рослинні лікарські засоби поступаються синтетичним ЛЗ, але є більш економічно вигідними, їх можна тривало застосовувати, мають низьку токсичність і майже не мають побічних ефектів; можливість застосування у лімітованих групах споживачів, таких як вагітні, діти, люди похилого віку. Таким чином, дослідження лікарських рослин, створення субстанції на їх основі та встановлення фармакологічної активності є досить перспективним напрямком у сучасній фармацевтичній галузі.

Перспективною рослинною сировиною є трава тонколучника однорічного – *Erigeron annuus* L., родини *Asteraceae*. Дана рослина широко розповсюджена в Україні, країнах Східної Європи, Північної Америки, Азії. Рід *Erigeron* це інвазійний вид, який походить з Північної Америки та інтродукований до Європи де широко поширений. Рід *Erigeron* налічує від 200-400 видів. Приблизно 180 видів є рідними для Північної Америки. [1, 2]. В медицині широко використовують фі-

тозасоби з трави злинки канадської (*Erigeron canadensis*) для лікування порушень у роботі шлунково-кишкового тракту, діареї; як протизапальні та кровоспинні засоби при внутрішніх кровотечах. Тонколучник однорічний та гострий використовуються як тонізуючі, діуретичні, в'язучі і капіляррозміцнюючі засоби. Трава тонколучника канадського та тонколучника гострого використовуються для виготовлення гомеопатичних засобів – «Гормель Хель», «*Erigeron-leptilon*», «Ерігерон есенція» зі свіжої сировини [3-6]. Надземна частина тонколучника однорічного накопичує різні групи біологічно активних речовин – флавоноїди, гідроксикоричні кислоти, органічні кислоти, моно- та сесквітерпеноїди, поліацетиленові сполуки, стероли, похідні γ – піронів [7]. Раніше ми повідомляли про вивчення біологічно активних речовин трави тонколучника однорічного, а саме макро та мікроелементів, амінокислот, цукрів, ефірних олій, органічних кислот, інуліну, флавоноїдів [8-14].

Мета

Метою роботи була стандартизація сировини трави тонколучника однорічного на вміст біологічно активних речовин.

Матеріал та методи дослідження

Сировиною для дослідження була трава тонколучника однорічного, заготовленого в Сумській та Харківській областях у період масового цвітіння (травень-червень) 2020 та 2021 роках. Хроматографічне дослідження проводили на папері «Filtrak» (FN-1), пластинках «Silufol» UV-254 (Чехія), Merk 60 F, Merk F₂₅₄ (Німеччина). Для хроматографування використовували наступні системи розчинників:

№ 1 – *n*-бутанол-оцтова кислота-вода (БОВ) (4:1:2) – для виявлення флавоноїдів, гідроксикоричних кислот, амінокислот;

№ 2 – 2 % оцтова кислота – для виявлення гідроксикоричних кислот;

№ 3 – 15 % оцтова кислота – для виявлення флавоноїдів, поліфенольних сполук;

№ 4 – етилацетат-оцтова кислота-мурашина кислота-вода (100:5:5:15) – виявлення гідроксикоричних кислот, флавоноїдів.

Процес хроматографування проводили методами висхідної (ПХ, ТШХ), одномірної, двомірної хроматографії (ПХ). Співвідношення розчинників вказано цифрами, взятих у об'ємних одиницях.

Результати та їх обговорення

На хроматограмах речовини виявляли до і після обробки різними реактивами за забарвленням у денному світлі та за флюоресценцією у УФ – світлі при 366 та 254 нм. Проявники: пари амоніаку; 1 % спиртовий розчин алюміній хлориду; 3% розчин ферум (III) хлориду; розчином аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти (10 г/л). Для проявлення та фотографування використовували візуалізатор Camag (TLC Visualizer, Gamag Linomat 5 (Kuriame Lietuvos ateiti) з програмним забезпеченням Win CATS), УФ-кабінет з фіксованими довжинами хвиль.

УФ-спектри поглинання та оптичну густину розчинів екстрактів знімали на спектрофотометрах SPEKOL 1500 (Analytik Jena AG, Germany) у кюветах з товщиною шару 10 мм.

Втрату в масі при висушуванні та екстрактивні речовини визначали за допомогою сушильної шафи «СНОЛ» (Україна)

Для кількісних досліджень використовували аналітичні ваги Mettler Toledo 200 (Germany).

Статистичний аналіз результатів кількісних визначень проводили згідно з вимогами ДФУ, 1-е вид., доп. 1, п. 5.3; обробка інформації здійснювалася за допомогою програмного забезпечення (Microsoft Office Excel 7.0) та програми «Statistika».

Для якісного аналізу трави тонколучника однорічного використовувався метод паперової та тонкошарової хроматографії. Сировину для аналізу подрібнювали до розміру часток 2-3 мм, екстрагували етанолом (70 % об/об) у співвідношенні сировина-екстрагент 1:10. Екстракт фільтрували та використовували для аналізу.

Дослідження фенольних сполук. Для дослідження поліфенольних сполук у сировині тонколучника однорічного використовувався метод двомірної паперової хроматографії у системах №1 і №3. Екстракти наносили на хроматографічний папір, хроматографували, потім висушували і проявляли в УФ-світлі парами аміаку. На хроматограмах спостерігались зони з коричневою, жовтою, блакитною, зелено-блакитною флуоресценцією, які були віднесені до груп БАР – флавоноїдів, ізофлавоноїдів, гідроксикоричних кислот.

Для ідентифікації фенольних сполук у траві тонколучника однорічного була розроблена методика хроматографування. Спиртовий екстракт наносився на ТШХ пластинку Merck F₂₅₄ в об'ємі 10 мкл зі стандартними зразками гіперозиду, ізохлорогенової та ферулової кислоти. Відстань, що має пройти рухома фаза – 10 см. Рухома фаза: етилацетат-оцтова кислота-мурашина кислота-вода (100:5:5:15). Хроматограму після висихання на повітрі обробляли розчином аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти (10 г/л). Флуоресценцію плям переглядали в УФ-світлі при довжині хвилі 254 нм. В екстракті з трави тонколучника однорічного були ідентифіковані гіперозид та хлорогенова кислота (Рис. 1).

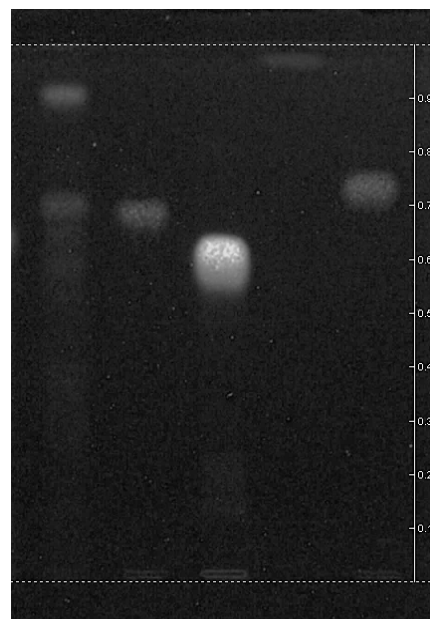


Рис. 1. Тонкошарова хроматограма етанольного екстракту трави тонколучника однорічного

Рухома фаза: етилацетат-оцтова кислота-мурашина кислота-вода (100:5:5:15).

- | | |
|--|-----------------------|
| 1-етанольний екстракт трави тонколучника однорічного | 3-хлорогенова кислота |
| 2-гіперозид | 4-фумарова кислота |

Висновки: при попередньому якісному аналізі в сировині тонколучника однорічного були ідентифіковані флавоноїд гіперозид; хлорогенова кислота. Одержані дані будуть використані для

розробки методик контролю якості сировини тонколучника однорічного та подальшого кількісного аналізу.

Кількісний аналіз трави тонколучника однорічного. Одним з показників доброякісності рослинної сировини та критерієм умов зберігання його впродовж тривалого часу є показник втрати в масі при висушуванні. Також цей показник необхідний для визначення кількісного вмісту. Для визначення втрати в масі при висушуванні використовувалась відома методика ДФУ [15].

Наважку сировини 1,0 г вміщують у бюкси, доведені до постійної маси, і сушать у сушильній шафі при температурі 100-105°C протягом 3 годин. Постійна маса вважається досягнутою, як-

що різниця між зважуваннями не перевищує 0,0005 г після 30 хв сушіння і 30 хв охолодження в ексікаторі. Втрату в масі при висушуванні визначали за формулою:

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

де: m — маса сировини;

m_1 — маса сировини після сушіння.

Середнє арифметичне значення двох паралельних проб вважають достовірним результатом.

Статистична обробка даних:

m	v	X_i	X_{cp}	S^2	S_{cp}	P	t(P, v)	Доверительный интервал		$\epsilon_{\text{г}}, \%$
1	2		3	4	5	6	7	8		9
4	3	7,28	7,27	0,0006	0,012247	0,95	3,18	7,27	± 0,038947	0,5357
		7,25								
		7,25								
		7,30								

Втрата в масі при висушуванні трави тонколучника однорічного склала 7,27 %.

Кількісне визначення суми гідроксикоричних кислот. Гідроксикоричні кислоти, що містяться у рослинній сировині, є дуже цінними сполуками, тому що мають високу біологічну активність. Вони виконують роль рослинних антиоксидантів, також проявляють протизапальну, гепатопротекторну, антимікробну дію [17]. Відомо, що гідроксикоричні кислоти накопичуються, переважно, у надземних органах. При попередньому аналізі було встановлено наявність хлорогенової кислоти у сировині тонколучника однорічного, тому кількісне визначення суми гідроксикоричних кислот проводили у перерахунку на дану сполуку.

Визначення суми гідроксикоричних кислот у траві тонколучника однорічного визначали спектрофотометричним методом, використовуючи методику [16]: близько 1,0 г (точна наважка) подрібненої сировини, що проходить крізь сито з отворами діаметром 1 мм, поміщають у колбу місткістю 200 мл, додають 100 мл етанолу (50%

об/об). Колбу з'єднують зі зворотним холодильником і нагрівають на водяній бані протягом 30 хвилин. Екстракт після охолодження фільтрують через паперовий фільтр «синя стрічка». 0,5 мл фільтрату переносять у мірну колбу на 25 мл та доводять об'єм до мітки етанолом (50% об/об). У якості компенсаційного розчину використовують етанол (50% об/об). Оптичну густину отриманого розчину вимірювали при довжині хвилі 328 нм.

Вміст гідроксикоричних кислот у перерахуванні на хлорогенову кислоту обчислювали по формулі:

$$X = \frac{A \times 100 \times 25 \times 100}{E_{1\text{см}}^{1\%} \times m_{\text{г}} \times 0,5(100 - W)}$$

де: A — оптична щільність досліджуваного розчину;

m — наважка сировини, г; W — втрата в масі

при висушуванні, % $E_{1\text{см}}^{1\%}$ — питомий показник поглинання хлорогенової кислоти, 504;

Статистична обробка даних:

m	v	X_i	X_{cp}	S^2	S_{cp}	P	t(P, v)	Доверительный интервал		$\epsilon_{\text{г}}, \%$
1	2		3	4	5	6	7	8		9
4	3	4,92	4,94	0,0022	0,023452	0,95	3,18	4,94	± 0,074578	1,5097
		4,92								
		5,01								
		4,91								

Кількісний вміст суми гідроксикоричних кислот у перерахунку на хлорогенову кислоту у траві тонколучника становить 4,94 %.

Кількісне визначення суми флавоноїдів. Флавоноїди — клас біологічно активних речовин, що зустрічається найчастіше у рослинній сировині,

мають дуже широкий спектр фармакологічної активності. Найбільш поширеними у медичному застосуванні є рутин. Він, як і інші флавоноїди, підвищує еластичність кровоносних судин, знешкоджує важкі метали, має протипухлинну та протирадіаційну дію, нетоксичний і не спричи-

нює побічної дії. Антиоксидантна властивість біофлавоноїдів зумовлена нейтралізацією вільних радикалів ($-OH$ та $-O_2$) – активних форм кисню. Наведені сполуки мають здатність проникати крізь ліпідний шар, тож блокують вільну ліпопероксидацію [18]. У спиртовому екстракті методом тонкошарової хроматографії з трави тонколучника однорічного була ідентифікована лише одна сполука флавоноїдної природи – гіперозид.

Кількісний вміст суми флавоноїдів встановлювали спектрофотометричним методом у перерахунку на гіперозид, використовуючи методику, яка базується на вимірюванні оптичної густини при батохромному зсуві при комплексоутворенні. Перерахунок суми флавоноїдів робили на гіперозид, використовуючи питомий показник поглинання [19, 20]: аналітичну пробу сировини подрібнювали до розміру часток, що проходять крізь сито з отворами діаметром 1 мм. Близько 1,0 г (точна наважка) подрібненої сировини поміщали в конічну плоскодонну колбу місткістю 100 мл із притертою пробкою, додавали 30 мл етанолу (70 % об/об), закривали колбу пробкою й зважували (з погрішністю $\pm 0,01$). Потім колбу з'єднували зі зворотнім холодильником, нагрівали на водяній бані протягом 2 годин. Після охолодження колбу знову закривали пробкою й зважували, втрату в масі компенсували 70 % спиртом і настоювали протягом 1 години. По-

тім екстракт фільтрували через паперовий фільтр «синя стрічка».

1 мл фільтрату переносили у мірну колбу місткістю 25 мл, додавали 2 мл 2 %-ого спиртового розчину $AlCl_3$ й доводили об'єм розчину етанолом (96 %) до мітки.

Як компенсаційний розчин використовували розчин, що складається з 1 мл екстракту, 1 краплі розведеної оцтової кислоти й доведений 96 % етанолом до мітки в мірній колбі місткістю 25 мл. Через 40 хв. вимірювали оптичну густину розчину на спектрофотометрі при довжині хвилі 425 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Вміст суми флавоноїдів у перерахуванні на гіперозид в % (X) обчислювали за формулою:

$$X = \frac{A \times 30 \times 25 \times 100}{E_{1cm}^{1\%} \times m_n \times 1 \times (100 - W)}, \text{ де } A - \text{оптична}$$

щільність випробуваного розчину;

$E_{1cm}^{1\%}$ – питомий показник поглинання гіперозиду, 500;

m – маса сировини в грамах; W – втрата в масі при висушуванні сировини в %.

Статистична обробка даних:

m	v	X _i	X _{ср}	S ²	S _{ср}	P	t(P, v)	Доверительный интервал			ε _{_,} %
1	2		3	4	5	6	7	8			9
4	3	1,48	1,448	0,0009	0,01493	0,95	3,18	1,45	±	0,047479	3,2800
		1,41									
		1,44									
		1,46									

Кількісний вміст суми флавоноїдів у перерахунку на гіперозид у траві тонколучника однорічного склав 1,45 %.

Кількісне визначення дубильних речовин. Дубильні речовини мають давню історію застосування у народній медицині, і є першими сполуками, біологічну активність яких було встановлено. Вони мають терпкий і в'язкий смак, проявляють протизапальну, антигеморагічну, помірну анестезуючу, протимікробну та антидіарейну дію. Вони знайшли широке застосування у лікуванні шлункових, кишкових та маткових кровотеч, захворювань дихального шляху, сечостатевої системи, розладів функції травного тракту [21].

Для встановлення кількісного вмісту суми дубильних речовин у траві тонколучника однорічного використовували методику ДФ СРСР [16, 18]. Близько 2,0 г (точна наважка) подрібненої сировини, просіяної крізь сито з діаметром отворів 3 мм, поміщали в конічну колбу місткістю 500 мл, заливали 250 мл нагрітої до кипіння води

очищеної і кип'ятили зі зворотним холодильником впродовж 30 хвилин при періодичному перемішуванні. Екстракт охолоджували до кімнатної температури й фільтрували близько 100 мл у конічну колбу місткістю 200-250 мл. Потім відбирали піпеткою 25 мл отриманого витягу в іншу конічну колбу місткістю 750 мл, додавали 500 мл води, 25 мл розчину індігосульфокислоти і титрували при постійному перемішуванні розчином перманганату калію (0,02 моль/л) до золотаво-жовтого кольору.

Паралельно проводили контрольний дослід. 1 мл розчину перманганату калію (0,02 моль/л) відповідає 0,004157 г дубильних речовин у перерахуванні на гідролізуємі дубильні речовини. Вміст дубильних речовин (x) у відсотках у перерахунку на абсолютно суху сировину обчислювали по формулі:

$$X = \frac{(V - V_1) \times K \times 250 \times 100 \times 100}{m \times 25 \times (100 - W)}$$

де: V – об'єм розчину перманганату калію (0,02 моль/л), витраченого на титрування витягу, мл;

V_1 – об'єм розчину перманганату калію (0,02 моль/л), витраченого на титрування в контрольному досвіді, мл;

K – кількість дубильних речовин, що відповідає 1 мл розчину перманганату калію (0,02 моль/л) (для гідролізуємих дубильних речовин –

0,004157), у г;

m – маса сировини в грамах; W – втрата в масі при висушуванні сировини у відсотках; 250 – загальний об'єм витягу, мл; 25 – об'єм витягу, узятим для титрування, у мл.

Статистична обробка даних:

m	v	X_i	X_{cp}	S^2	S_{cp}	P	t(P, v)	Доверительный интервал		$\varepsilon_{\%}$
1	2		3	4	5	6	7	8		9
4	3	7,25	7,258	0,0085	0,046075	0,95	3,18	7,26	± 0,146519	2,0189
		7,33								
		7,32								
		7,13								

Вміст дубильних речовин у сировині тонколу-чника однорічного склав 7,26 % у перерахунку на гідролізуємі дубильні речовини.

Кількісне визначення суми поліфенолів. Поліфеноли – це збірний клас сполук, які включають в себе таніни, лігніни, флавоноїди та інші. Вони мають різноманітну будову, в основі якої є молекули фенолу. Поліфенольні сполуки є цінними з точки зору фітохімії, тому що мають дуже широкий і різноманітний спектр дії [22, 23]. Кількісний вміст поліфенольних сполук визначали спектрофотометричним методом за методикою ДФУ [23]: аналітичну пробу сировини подрібнювали до розміру часток, що проходять крізь сито з отворами діаметром 1 мм. Близько 1,0 г (точна наважка) подрібненої сировини поміщали в конічну плоскодонну колбу місткістю 100 мл із пробкою, додавали 30 мл етанолу (70% об/об), закривали колбу пробкою й зважували (з погрешністю $\pm 0,01$). Потім колбу з'єднували зі зворотнім холодильником, нагрівали на водяній бані протягом 30 хвилин. Після охолодження колбу знову закривали пробкою й зважували, втрату в масі компенсували 70 % спиртом і настоювали протягом 1 години. Потім екстракт фі-

льтрували через паперовий фільтр «синя стрічка».

0,5 мл фільтрату переносили у мірну колбу місткістю 25 мл, доводили об'єм колби до мітки етанолом (70% об/об).

Як компенсаційний розчин використовували етанол (70% об/об).

Оптичну щільність розчину вимірювали на спектрофотометрі при довжині хвилі 265 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм.

Вміст суми фенольних сполук у перерахуванні на галову кислоту в % (X) обчислювали за формулою:

$$X = \frac{A \times 100 \times 25 \times 100}{E_{1cm}^{1\%} \times m_n \times 0,5 \times (100 - W)}, \text{ де}$$

A – оптична щільність випробуваного розчину;

$E_{1cm}^{1\%}$ – питомий показник поглинання галової кислоти, 508;

m – маса сировини в грамах;

W – втрата в масі при висушуванні сировини в %.

Статистична обробка даних:

m	v	X_i	X_{cp}	S^2	S_{cp}	P	t(P, v)	Доверительный интервал		$\varepsilon_{\%}$
1	2		3	4	5	6	7	8		9
4	3	6,78	6,665	0,0114	0,053307	0,95	3,18	6,67	± 0,169517	2,5434
		6,64								
		6,71								
		6,53								

Кількісний вміст суми фенольних сполук у перерахунку на галову кислоту у траві тонколу-чника однорічного склав 6,67%.

Встановлення кількісного вмісту золи у траві тонколу-чника. Зольний залишок трави тонколу-чника однорічного встановлювали за загальновідомою методикою [15, 23]: близько 5,0 г (точна наважка) рослинної сировини переносять у фарфоровий тигель, попередньо доведений до постійної маси. Аналізуємі зразки сировини

спалюють у муфельній печі при температурі 550 °С протягом 2 годин. Тигель з вмістом охолоджують в ексикаторі, зважують. Після цього доводять до постійної маси у сушильній шафі при температурі 105 °С. Постійна маса вважається досягнутою, якщо різниця між зважуваннями не перевищує 0,0005 г після 30 хв висушування і 30 хв охолодження в ексикаторі.

Вміст загальної золи у траві тонколу-чника розраховували за формулою:

$$X = \frac{m_1 - m_0}{m} \times 100, \text{ де}$$

m_1 . маса тигля з золю
 m_0 . маса тигля
 m - маса наважки сировини
 Статистична обробка даних:

m	v	X_i	X_{cp}	S^2	S_{cp}	P	t(P, v)	Доверительный интервал		ε , %
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
4	3	6,28	6,275	0,0004	0,010408	0,95	3,18	6,28	± 0,033098	0,5275
		6,27								
		6,25								
		6,30								

Вміст загальної золи у траві тонколучника однорічного склав 6,28%.

Вибір оптимального екстрагента. Перед одержанням сухого екстракту проводили підбір екстрагенту за методикою [23]: близько 1,0 г сировини (точна наважка) поміщали у конічну колбу, додавали 50 мл розчинника (використовували воду очищену, 20%, 40%-, 70%-, 96% - етиловий спирт) і зважували. Колбу нагрівали впро-

довж 2 годин, з'єднавши зі зворотнім холодильником. Після охолодження колбу зважували і втрату в масі компенсували відповідним розчинником. Після чого витяг фільтрували через паперовий фільтр у суху колбу. 25 мл фільтрату переносили у попередньо висушені при температурі 100-105 °C і доведені до постійної маси порцелянові чашки і випарювали досуха на водній бані.

Таблиця 1

Дослідження екстрактивних речовин трави тонколучника, $n=3$, ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)

Розчинник	Сухий залишок, %
Вода очищена	12,31 ± 0,13%
Етанол (20% об/об)	11,90 ± 0,10%
Етанол (40% об/об)	14,00 ± 0,16%
Етанол (70% об/об)	11,86 ± 0,09%
Етанол (96 %)	6,38 ± 0,11%

За результатами, що наведені у таблиці 1, визначено, що оптимальним екстрагентом є етиловий спирт (40 % об/об) – екстрактивні речовини склали 14 %, а також вода очищена – вихід екстрактивних речовин – 12,31 %. Сухий залишок при екстрагуванні 20% і 70% етанолом майже однаковий; найменший – при екстрагуванні 96% етанолом. Отримані дані будуть використані при розробці технології одержання сухого екстракту з листя тонколучника однорічного.

Розробка методів контролю якості сировини тонколучника однорічного. Основною вимогою виробника лікарських засобів є доброякісність сировини, яка використовується на певних етапах виробництва. Вихідною сировиною для одержання сухого екстракту є трава тонколучника однорічного. На даному етапі досліджується та регламентуються показники якості трави тонколучника однорічного, метою чого є розробка нормативної документації. Так як у вітчизняних та зарубіжних фармакопеях відсутня стаття на даний вид, то розробку методик контролю якості робили виходячи з емпіричних даних.

Для стандартизації сировини трави тонколучника запропоновані такі розділи, як «Ідентифікація», що включає в себе макро- та мікроскопічний аналіз, метод ТШХ. Розділ «Випробування» - стандартні визначення втрати в масі при висушуванні, загальна зола; розділ «Кількісне визна-

чення» - запропонований метод спектрофотометрії для встановлення кількісного вмісту суми флавоноїдів.

Встановлення анатомо-морфологічних ознак трави тонколучника однорічного.

Макроскопічний аналіз. Морфологічний аналіз цілісної сировини виявив основні видові ознаки. Надземні пагони заввишки 20-90 см, розгалужені на верхівці, густо опушені притиснутими волосками. Низове листя черешкове, частіше відмирає на початку цвітіння, за формою обернено-яйцеподібне (4,0-17,0 см завдовжки і 1,5-4,0 см завширшки), загострене на верхівці, при основі клиноподібно звужене, з рідкими крупними зубцями по краю і щетинистоволосистим опушенням. Стеблові листки почергові, звужені в короткий черешок, темно-зелені, прості, цілісні, поліморфні (4-15 см): серединні обернено-узкоюяйцеподібні, край рідко-пильчастий, опушення щетинисте, густе; верхівкові – сидячі, ланцетні або лінійні, гострі на верхівці, 1-9 см завдовжки і 0,5-2,0 см шириною, з неправильно зубчастим або майже цілісним краєм. Кошики 6-8 мм завдовжки і 10,0-15,0 мм у діаметрі, знаходяться на верхівках пагонів у кількості 5-50 і утворюють пухке щитковидно-волотеве суцвіття. Обгортка кошиків напівколюста, дво- або трирядна, листочки зовнішнього кола коротші внутрішніх, зелені, рясно опушені. Крайові язичкові

квітки численні, у 2 рази перевищують обгортку, складають 2 кола, жіночі, безплідні, з чашечкою, редукованою до одного кола волосків, трубка віночка 1,0-1,5 мм завдовжки, відгин білий або блідо-блакитний, лінійно-язичковий, довжиною 5,0-10,0 мм. Серединні квітки трубчасті, жовті, двостатеві, 2,0-3,0 мм завдовжки, з колом 119 волосків чашечки. Сім'янки світло-коричневі, трохи сплюснуті, голі, з однорядним щетинистим чубком.

Мікроскопічний аналіз. Анатомічна будова стебел від пучкової у верхній частині до перехідної у середній і нижній зонах. Обрис на поперечному зрізі округлий, з рельєфно виступаючими округлими ребрами, виповненими кутовою коленхімою. Їх висота і товщина мінливі. Епідерма ребер і міжреберних просторів стебла відрізняється. Між ребер епідерма з вузько-овальними продихами, базисні клітини прозенхімні, тонкостінні, клиноподібно з'єднані. По реберчастих виступах епідерма без продихів, а з волосками, базисні клітини паренхімні, товстостінні. Волоски прості, 6-8-клітинні, з виступаючою розеткою. Вони рівномірно, на певній відстані розподілені, зігнуті, притиснуті й спрямовані донизу. Найбільшу площу стебла займає пухка серцевина, яка складається із тонкостінної паренхіми і більшою чи меншою мірою руйнується від центру до периферії. Первинна кора вузька, субепідермальна хлоренхіма лише 1-3-шарова. Під нею нерівномірним одно-тришаровим кільцем розташована більш крупноклітинна запасаюча паренхіма, серед якою зустрічаються схизогенні вмістища з темним секретом. Під дією розчину 0,1 г/л заліза (III) хлориду Р вміст основної паренхіми набуває темного забарвлення. Шар ендодерми межує з кільцем перичиклічної склеренхіми і чітко відділяє кору від центрального циліндра. Склеренхіма утворює обкладку пучків і займає міжпучкові ділянки. У відцентровому напрямі клітини укрупнюються, їх оболонки тонкіше й менш склерифіковані. Провідні пучки відкриті колатеральні, між основними крупними закладаються додаткова, які поступово розростаються і у нижній частині стебла

змикаються з основними. На поперечних зрізах ділянка тонкостінної флоєми пучків овальної форми. Судини ксилеми з широкими просвітами, розсіяні довільно по ксилемі, оточені вузькими клітинами лібриформу [24].

Методи контролю якості.

Herba Erigeron annuus

Тонколучника однорічного трава

1. **Опис.** Подрібнена надземна частина тонколучника однорічного (*Erigeron annuus* L.), зібрана у період цвітіння.

Вміст: не менше 1,0 % гіперозиду ($C_{21}H_{20}O_{12}$, М.м. 464,38) у перерахунку на суху речовину.

2. **Ідентифікація.**

А. Суха трава подрібнена на фрагменти 3-4 см, листя обернено-яйцеподібне (4,0-17,0 см завдовжки і 1,5-4,0 см завширшки), загострене на верхівці, при основі клиноподібно звужене, з рідкими крупними зубцями по краю і щетинисто-волосистим опушенням. Кошики 6-8 мм завдовжки і 10,0-5,0 мм у діаметрі, знаходяться на верхівках пагонів у кількості 5-50 і утворюють пухке щитковидно-волоте суцвіття.

В. Мікроскопічне дослідження. Порошок світло-зеленого кольору переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин хлоральгідрату Р. У порошку виявляються такі діагностичні структури: округлі ребра, виповнені кутовою коленхімою. Між ребер епідерма з вузько-овальними продихами, базисні клітини прозенхімні, тонкостінні, клиноподібно з'єднані. Волоски прості, 6-8-клітинні, з виступаючою розеткою. Пухка серцевина, яка складається із тонкостінної паренхіми і, зазвичай, руйнується від центру до периферії. Первинна кора вузька, субепідермальна хлоренхіма лише 1-3-шарова. Під нею нерівномірним одно-тришаровим кільцем розташована більш крупноклітинна запасаюча паренхіма, серед якою зустрічаються схизогенні вмістища з темним секретом.

С. Переглядають хроматограми

Послідовність зон на хроматограмі випробуваного розчину і розчину порівняння мають відповідати зонам, наведеним нижче.

Верхня частина пластинки	
гіперозид: жовта флуоресцююча зона	– жовта флуоресцююча зона (гіперозид) – світло-жовтувато-коричнева флуоресцююча зона – блакитна флуоресцююча зона
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

ВИПРОБУВАННЯ

2,0 г здрібненої на порошок сировини тонколучника однорічного екстрагують 20 мл метанолу Р на УЗ-бані протягом 30 хвилин.

Розчин порівняння: 10 мг гіперозиду в 10 мл метанолу Р.

Рухома фаза: етилацетат Р-оцтова кислота льодяна-мурашина кислота безводна-вода Р (100:5:5:15).

Пластинка: ТШХ-пластинка із шаром силіка-

гелю F_{254} Р розміром 10×10 см.

Нанесення: 10 мкл випробовуваного розчину та 4 мкл розчину порівняння, смугами по 6 мм.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 8 см від лінії старту.

Висушування: на повітрі.

Виявлення: обприскують розчином 10 г/л дифенілборної кислоти аміноетилового ефіру Р у метанолі Р, потім обприскують розчином 50 г/л макрогелю 400 Р у метанолі Р, вису-

шують на повітрі протягом 30 хв. Переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм.

Результати. На хроматограмі випробованого розчину можуть проявлятися світло-жовто-коричнева та блакитна флуоресціюючі зони нижче зони, відповідно гіперозиду на хроматограмі розчину порівняння.

3. **Втрата в масі при висушуванні.** Не більше 12 %. 1,0000 г здрібненої на порошок сировини сушать при температурі 105°C впродовж 2 годин.

4. **Загальна зола.** Не більше 10 %.

5. **Кількісне визначення.**

Вихідний розчин. 1,0 г (точна наважка) подрібненої сировини поміщають в конічну плоскодонну колбу місткістю 100 мл із притертою пробкою, додають 30 мл етанолу (70 % об/об), закривають колбу пробкою й зважували (з погрешністю $\pm 0,01$). Потім колбу з'єднують зі зворотнім холодильником, нагрівають на водяній бані протягом 2 годин. Після охолодження колбу знову закривають пробкою й зважують, втрату в масі компенсують 70 % спиртом і настоюють протягом 1 години. Потім екстракт фільтрують через паперовий фільтр «синя стрічка».

Випробуваний розчин. 1 мл вихідного розчину переносять у мірну колбу місткістю 25 мл, додають 2 мл 2 %-ого спиртового розчину AlCl_3 й доводять об'єм розчину етанолом (96 %) до мітки.

Як компенсаційний розчин використовують розчин, що складається з 1 мл екстракту, 1 краплі розведеної оцтової кислоти й доведений 96 % етанолом до мітки в мірній колбі місткістю 25 мл. Через 40 хв. вимірюють оптичну густину розчину на спектрофотометрі при довжині хвилі 425 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм.

Вміст суми флавоноїдів у перерахуванні на гіперозид в % (X) обчислюють за формулою:

$$X = \frac{A \times 30 \times 25 \times 100}{E_{1\text{cm}}^{1\%} \times m \times 1 \times (100 - W)}$$

де: A – оптична щільність випробуваного розчину;

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ – питомий показник поглинання гіперозиду, 500;

m – маса сировини в грамах;

W – втрата в масі при висушуванні сировини в %.

Висновки

1. Проведено стандартизацію трави тонколучника однорічного на вміст біологічно активних речовин.

2. Спектрофотометричним методом встановлено вміст гідроксикоричних кислот – 4,94%, флавоноїдів – 1,45%, фенольних сполук – 6,67%; перманганатометричним методом встановлено вміст дубильних речовин гідролізуємої природи – 7,26%.

3. За методиками Державної Фармакопеї України визначено втрату в масі при висушуванні,

яка склала – 7,27%; вміст загальної золи – 6,28%, визначено вміст оптимального екстрагенту – етиловий спирт (40 % об/об) – вміст екстрактивних речовин склав 14 %.

4. Методом тонкошарової хроматографії встановлено вміст біологічно активних речовин фенольної природи: гіперозиду та хлорогенової кислоти.

5. Проведено розробку методів контролю якості трави тонколучника однорічного за розділами «Ідентифікація», ТШХ, «Випробування», «Кількісне визначення». За всіма розділами трава тонколучника однорічного відповідає вимогам ДФУ.

References

- Sennikov AN, Kurtto A. Memoranda Soc. Fauna Flora Fennica. 2019; 95:40.
- Chekman MV. Bull. Cherkasy Univ. S: Biol. Sci. 2015; 19:134.
- Nazaruk J, Karna E, Wiczorek P, Sacha P, Tryniszewska E. In vitro antiproliferative and antifungal activity of essential oils from *Erigeron acris* L. and *Erigeron annuus* (L.) Pers. Zeitschrift für Naturforschung C. 2010; 65(11-12):642-646.
- ZHENG, Yulong, et al. Synergistic action of *Erigeron annuus* L. Pers and *Borago officinalis* L. enhances anti-obesity activity in a mouse model of diet-induced obesity. Nutrition Research, 2019, 69: 58-66.
- Bukharina OV. Rosliny rodu Zlynka – perspektyvna syrovyna dla novykh fitokhimichnykh zasobiv [Plants of the genus Zlynka - promising raw material for new phytochemical agents]. In: Tekhnolohichni ta biofarmatsevtychni aspekty stvorennia likarskykh preparativ riznoi napravlennosti dii: materialy II mizhnar. nauk.-prakt. internet – konf., Kharkiv, November 12-13, 2015; Kharkiv: Vyd-vo NFaU; 2015. p. 59–60. (Ukrainian).
- Jeong CH, Nam EK, Shim KH. Chemical components in different parts of *Erigeron annuus*. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 2005; 34(6):857-861.
- Golovach AR, Kovalev SV, Kovalev VN. Science and innovation. 2019; 3:96.
- Kovalev SV, Golovach AR, Kovalev VN. Azerbaijan Pharm. Pharmacother. J. 2020; 2:7.
- Kovalev SV, Golovach AR, Kovalev VN. Methods Objects Chem. Anal. 2021; 16:88-92.
- Kovalev S, Golovach A, Kovalev V, Poleszak E, Akhmedov E, Bobrytska O. Study and determination of fructan-type polysaccharide content in herb of *Erigeron annuus* L. Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences. 2022; 1:8-12.
- Kovalev V, Kovalev S, Golovach A. Study and analysis of organic acids of the *Erigeron annuus* herb. Azerbaijan Pharm. Pharmacother. J. 2022; 2:48-52.
- Kovalev SV, Golovach AR, Kovalev VN, Khilya VP. Flavonoids from *Erigeron annuus*. Chemistry of Natural Compounds. 2023; 59(4):776-777.
- Kovalev SV, Golovach AR, Kovalev VN, Deviatkina NM. The carbohydrates research on *Erigeron annuus*. French-Ukrainian Journal of Chemistry. 2024; 12(1):39-51.
- Derzhavna farmakopeia Ukrainy [State Pharmacopoeia of Ukraine]. Kharkiv: DP "Naukovo-ekspertnyi farmakopeinyi tsentr" [SE "Scientific and Expert Pharmacopoeial Center"]; 2008. 620 p. (Ukrainian).
- Kovalev SV. Pokhidni fenolkarbonovykh ta hidroksykorychnykh kyslot vydiv ozhyny [Derivatives of phenolic carboxylic and hydroxycinnamic acids of blackberry species]. Zdobutky klinichnoi i eksperymentalnoi medytsyny. 2013; 1(18):80-83. (Ukrainian).
- Nemzer B, Kalita D, Yashin AY, Yashin YI. Chemical Composition and Polyphenolic Compounds of Red Wines: Their Antioxidant Activities and Effects on Human Health—A Review. Beverages. 2022; 8:1-18.
- Kovalev SV. Flavonoidy ozhyny shorstkoi [Flavonoids of rough blackberry]. Visnyk farmatsii. 2013; 3(75):42-44. doi:10.35205/0558-1125-2020-75-18-31. (Ukrainian).
- Kovalev SV. Rubus candicans Weihe yak dzhereho flavonoidiv [Rubus candicans Weihe as a source of flavonoids]. Farmakom. 2013; 1:24-27. (Ukrainian).
- Zhang Y, Zhao Q, Ma J, Wu B, Zeng X. Chemical characterization of phenolic compounds in erigeron injection by rapid-resolution LC coupled with multi-stage and quadrupole-TOF-MS. Chromatographia. 2010; 72(7-8):651-658.
- Fernández-Pachón MS, Villano D, García-Parrilla MC, Troncoso AM. Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. Analytica Chimica Acta. 2004; 513(1):113-118. doi:10.1016/j.aca.2004.02.028.

21. Fattouch S, Caboni P, Coroneo V, Tuberoso CI, Angioni A, Dessi S, et al. Antimicrobial activity of Tunisian quince (*Cydonia oblonga* Miller) pulp and peel polyphenolic extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007; 55(3):963-969.
22. Derzhavna Farmakopeia Ukrainy [State Pharmacopoeia of Ukraine]. 2008; 2:102. (Ukrainian).
23. Kovalev S, Golovach A, Kovalev V, Demeshko O. Makro- and microscopic research of *Erigeron annuus*. *Norwegian Journal of development of the International Science*. 2021; 74:45-49.

Summary

STANDARDIZATION OF RAW MATERIALS OF ERIGERON ANNUUS (ANNUAL FLEABANE)

Holovach A.R., Kovalov S.V., Kovalov V.M., Deviatkina N.M., Karamyshev D.V., Korshenko V.O.

Keywords: standardization, *Erigeron Annuus* (Annual Fleabane), flavonoids, hydroxycinnamic acids, chromatography.

Medicinal plant raw materials and their derived preparations are widely used by leading pharmaceutical manufacturers and constitute a significant share of the global pharmaceutical market. Standardization plays a crucial role as a quality control mechanism for herbal medicinal products. The term “standardization” refers to all measures taken during the production process and quality control to ensure the consistent quality of herbal preparations.

To obtain high-quality herbal medicines, it is essential to oversee all stages of production, starting from proper cultivation and identification of medicinal plants, considering the season and region of collection, and concluding with the extraction and purification of plant-based preparations.

Herbal medicines and finished plant-based pharmaceutical products have been widely used for thousands of years. In recent decades, the growth in the production of herbal medicinal preparations and the increasing popularity of phytotherapy have significantly expanded the share of plant-based pharmaceuticals in the global market. Today, herbal medicines account for 70-95% of the global pharmaceutical industry. According to the World Health Organization (WHO), approximately 80% of the world's population relies on herbs and other traditional medicinal products to meet their primary healthcare needs.