УДК 615.451.13:582.912.4:547.56 https://doi.org/10.24959/ubphj.20.293

Н. Б. Чайка, О. М. Кошовий, М. А. Комісаренко, І. В. Кіреєв, Г. Б. Кравченко

Національний фармацевтичний університет Міністерства охорони здоров'я України

Параметри стандартизації модифікованих екстрактів мучниці звичайної листя

Актуальність. В Україні 25 % населення мають схильність до захворювань сечовидільної системи та 10 % – ознаки хронічних захворювань нирок та сечового міхура. Мучниці звичайної (*Arctostaphylos uva-ursi* L.) листя є одним з найвідоміших видів лікарської рослинної сировини з уроантисептичною та діуретичної дією. Спосіб одержання відвару з листя мучниці загальновідомий, проте ця лікарська форма є нестандартизованою, погано зберігається, до того ж важко дотримуватися точності дозування. У зв'язку з цим розробка стандартизованих лікарських засобів на основі мучниці звичайної листя є актуальним завданням.

Мета. Визначити параметри стандартизації модифікованих сухих екстрактів мучниці звичайної листя відповідно до вимог ДФУ та розробити проєкти методик контролю якості на ці субстанції.

Матеріали та методи. Об'єктами дослідження були сухі екстракти з мучниці звичайної листя, модифіковані цистеїном, фенілаланіном, валіном, гліцином і аргініном. Для аналізу одержаних екстрактів використовували фармакопейні методи відповідно до монографій ДФУ «Мучниці звичайної листя». Ідентифікацію БАР у екстрактах проводили за допомогою методу ТШХ. Вміст гідрохінон-похідних та флаваноїдів у екстрактах визначали спектрофотометричним методом за ДФУ.

Результати та їх обговорення. У результаті проведених досліджень розроблено проєкти МКЯ та згідно з їх вимогами проведено дослідження сухих екстрактів мучниці звичайної, модифікованих з цистеїном, фенілаланіном, валіном, гліцином та аргініном. Проєкти МКЯ на сухі екстракти мучниці звичайної листя розроблено за такими показниками: опис, розчинність, ідентифікація (ТШХ: метод А (гідрохінон-похідні), метод В (флавоноїди) та метод С (амінокислоти)), втрата в масі під час висушування (не більше 10 %), залишкові кількості органічних розчинників (спирт етиловий не більше 1,0 %), важкі метали (не більше 100 ppm), мікробіологічна чистота, вміст гідрохінон-похідних (не менше 5 % у перерахунку на арбутин) та флавоноїдів (не менше 2 % у перерахунку на рутин). Усі екстракти відповідали вимогам розробленої документації.

Висновки. Розроблено проєкти МКЯ на модифіковані сухі екстракти мучниці звичайної листя та згідно з їх вимогами проведено дослідження 5 сухих екстрактів, які було модифіковано з цистеїном, гліцином, валіном, фенілаланіном та аргініном. Одержані стандартизовані екстракти є перспективними субстанціями та будуть використані для розробки лікарських форм нових лікарських засобів з уроантисептичною, діуретичною та гіпоглікемічною дією.

Ключові слова: *мучниця звичайна; листя; екстракт; модифікація; стандартизація.*

N. Chaika, O. Koshovyi, M. Komisarenko, I. Kireyev, G. Kravchenko

National University of Pharmacy of the Ministry of Health of Ukraine

Standardization parameters of modified extracts from *Arctostaphylos uva-ursi* L. leaves

Topicality. 25 % of the Ukrainian population is prone to the urinary system diseases and 10 % has signs of kidney and bladder chronic diseases. Common bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi* L.) leaves are one of the most well-known types of the medicinal plant raw material with the uroantiseptic and diuretic activity. The method of obtaining a decoction from bearberry leaves is well known, but this dosage form is non-standardized, poorly stored, and it is difficult to maintain the accuracy of dosing. Therefore, the development of standardized medicines based on bearberry leaves is a crucial task.

Aim. To determine standardization parameters of modified dry extracts from *Arctostaphylos uva-ursi* L. leaves in accordance with the requirements of the State Pharmacopeia of Ukraine (SPhU) and develop a draft of quality control methods (QCM) for these substances.

Materials and methods. The study subjects were dry extracts of bearberry leaves modified with cysteine, phenylalanine, valine, glycine and arginine. For the analysis of the extracts obtained the pharmacopoeial methods were used in accordance with the monographs of the SPhU "Common bearberry leaves". Identification of biologically active substances (BAS) in the extracts was performed using TLC. The content of hydroquinone derivatives and flavonoids in the extracts was determined by the spectrophotometric method according to the SPhU.

Results and discussion. As a result of the research conducted the QCM drafts were developed; and according to their requirements dry extracts of bearberry modified with cysteine, phenylalanine, valine, glycine and arginine were studied. The QCM drafts for dry extracts of bearberry were developed by the following indicators: description, solubility, identification (TLC: method A (hydroquinone derivatives), B (flavonoids) and C (amino acids)), loss on drying (not more than 10 %), residual amounts of organic solvents (ethyl alcohol not more than 1.0 %), heavy metals (not more than 100 ppm), microbiological purity, the content of hydroquinone derivatives (not less than 5 % calculated with reference to arbutin) and flavonoids (not less than 2 % calculated with reference to rutin)). All extracts met the requirements of the documentation developed.

Conclusions. The QCM drafts for modified dry extracts of bearberry leaves have been developed; according to their requirements, 5 dry extracts modified with cysteine, glycine, valine, phenylalanine and arginine have been studied. The standardized extracts obtained are promising substances. They can be used for developing dosage forms of new medicines with the uroantiseptic, diuretic and hypoglycemic activity.

***Key words*:** *bearberry; leaves; extract; modification; standardization*

Н. Б. Чайка, О. Н. Кошевой, Н. А. Комиссаренко, И. В. Киреев, А. Б. Кравченко
Национальный фармацевтический университет Министерства здравоохранения Украины

Параметры стандартизации модифицированных экстрактов толокнянки обыкновенной листьев

Актуальность. В Украине 25 % населения имеют предрасположенность к заболеваниям мочеполовой системы и 10 % – признаки хронических заболеваний почек и мочевого пузыря. Толокнянки обыкновенной (*Arctostaphylos uva-ursi* L.) листья является одним из наиболее известных видов лекарственного растительного сырья с уроантисептическим и диуретическим действием. Способ получения отвара из листьев толокнянки общеизвестный, однако эта лекарственная форма является нестандартизированной, плохо хранится, и трудно соблюсти точность дозирования. В связи с этим разработка стандартизированных лекарственных средств на основе толокнянки обыкновенной листьев является актуальной задачей.

Цель. Определить параметры стандартизации модифицированных сухих экстрактов толокнянки обыкновенной листьев в соответствии с требованиями ГФУ и разработать проекты методик контроля качества на эти субстанции.

Материалы и методы. Объектами исследования стали сухие экстракты толокнянки обыкновенной листьев, которые были модифицированы цистеином, фенилаланином, валином, глицином и аргинином. Для анализа полученных экстрактов использовали фармакопейные методы, в соответствии с монографией ГФУ «Толокнянки обыкновенной листья». Идентификацию БАР в экстрактах проводили с помощью метода ТСХ. Содержание гидрохинон-производных и флаваноидов в экстрактах определяли спектрофотометрическим методом согласно ГФУ.

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований разработаны проекты МКК и в соответствии с их требованиями проведены исследования сухих экстрактов толокнянки обыкновенной, модифицированных с цистеином, фенилаланином, валином, глицином и аргинином. Проекты МКК на сухие экстракты толокнянки обыкновенной листьев разработаны по следующим показателям: описание, растворимость, идентификация (ТСХ: метод А (гидрохинон-производные), метод В (флавоноиды) и метод С (аминокислоты)), потеря в массе при высушивании (не более 10 %), остаточные количества органических растворителей (спирт этиловый не более 1,0 %), тяжелые металлы (не более 100 ppm), микробиологическая чистота, содержание гидрохинон-производных (не менее 5 % в пересчете на арбутин) и флавоноидов (не менее 2 % в пересчете на рутин). Все экстракты отвечали требованиям разработанной документации.

Выводы. Разработаны проекты МКК на модифицированные сухие экстракты толокнянки обыкновенной листьев и, согласно их требованиям, проведено исследование 5 сухих экстрактов, которые были модифицированы с цистеином, глицином, валином, фенилаланином и аргинином. Полученные стандартизированные экстракты являются перспективными субстанциями. Их можно использовать для разработки лекарственных форм новых лекарственных средств с уроантисептическим, диуретическим и гипогликемическим действием.

***Ключевые слова**: толокнянка обыкновенная; листья; экстракт; модификация; стандартизация*

ВСТУП

В Україні 25 % населення мають схильність до захворювань сечовидільної системи та 10 % – ознаки хронічних захворювань нирок та сечового міхура. Мучниці звичайної (*Arctostaphylos uva-ursi* L.) листя є одним з найвідоміших видів лікарської рослинної сировини (ЛРС) з уроантисептичною та діуретичної дією [1-3]. Галенові засоби мучниці звичайної листя та сама сировина входять до складу багатьох лікарських препаратів та функціональних добавок. Ці засоби виявляють сечогінні, антисептичні, спазмолітичні, кровоспинні й антиканцерогенні властивості. На фармацевтичному ринку України на основі БАР мучниці звичайної представлено такі лікарські засоби: Нефрофіт, Фітонефрол, Детоксифіт, Настойка Панкова, Збір сечогінний № 1, Простаплекс, Cysto Fink тощо [3, 4].

Головними діючими речовинами *A. uva-ursi* L. є прості феноли, гідроксикоричні та фенолкарбонові кислоти, флавоноїди, дубильні речовини [4-9]. У мучниці звичайної листі виявлено прості феноли (арбутин, метиларбутин); гідроксикоричні кислоти (кавова, ферулова та протокатехінова); флавоноїди (кверцетин, мірицетин та їх глікозиди, катехін, епікатехін, епігалокатехін та епікатехіна галат, антоціани дельфінідін та ціанідин); дубильні речовини (танінова кислота, елаготанін, катехол-танін та ряд галотанінів) [5, 8]; іридоїди (асперулозид, монотропеїн); алантоїн; сапоніни (α-амірин, α-аміринацетат, олеанова, урсолова, бетулінова кислоти, уваол та лупеол) [4] та стероїди (β-ситостерол, стігмастерол) [4, 7, 10, 11].

Спосіб одержання відвару з листя мучниці звичайної загальновідомий [1, 4, 11], проте ця лікарська форма є нестандартизованою, погано зберігається, до того ж важко дотриматися точності дозування. У зв'язку з цим розробка стандартизованих лікарських засобів на основі мучниці звичайної листя є актуальним завданням.

Раніше нами було запропоновано спосіб одержання сухих екстрактів мучниці звичайної листя, модифікованих різними амінокислотами [12-15]. Найбільш перспективними виявилися екстракти, які було модифіковано цистеїном, фенілаланіном, валіном, гліцином та аргініном. Було вивчено їхній хімічний склад та фармакологічну активність. Екстракт, модифікований з цистеїном, мав виражену гіпоглікемічну та ліпотропну властивість [14]. Модифікований екстракт з фенілаланіном виявив виражену діуретичну та протизапальну активність [15]. Для створення інноваційних сухих екстрактів, які було модифіковано амінокислотами, доцільно розробити методи їх стандартизації.

Мета. Визначити параметри стандартизації модифікованих сухих екстрактів мучниці звичайної листя відповідно до вимог ДФУ та розробити проєкти методик контролю якості на ці субстанції.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Об'єктами дослідження були сухі модифіковані екстракти з мучниці звичайної листя. Листя мучниці звичайної було заготовлено в ботанічному саду Львівського медичного університету імені Данила Галицького.

Для отримання екстрактів 100 г мучниці звичайної листя, подрібненого до розміру частинок 2-3 мм, поміщали в колбу, заливали 500 мл 50 % розчином спирту етилового, екстрагували протягом доби за кімнатної температури. Екстракцію повторювали ще раз з новою порцією екстрагента (500,0 мл) [12-15]. Одержані витяги об'єднували, відстоювали протягом доби, відфільтровували та стерилізували. До 400 мл фільтрату додавали відповідну амінокислоту (цистеїн, фенілаланін, валін, гліцин або аргінін) у трикратній еквімолярній кількості та настоювали розчин протягом доби. Фільтрат упарювали за допомогою ротаційного вакуум-випарного апарата до сухого екстракту.

Для аналізу одержаних екстрактів використовували фармакопейні методи відповідно до монографій ДФУ «Мучниці звичайної листя» [1].

Визначення кількісного вмісту гідрохінон-похідних в екстрактах з мучниці звичайної листя проводили спектрофотометричним методом [1, 16, 17].

Випробовуваний розчин. 1,0 г екстракту (точна наважка) розчиняють у 50 % етанолі та кількісно переносять у мірну колбу на 50,0 мл. 5,0 мл одержаного розчину поміщують у ділильну лійку, додають 45 мл води, 1 мл розчину 2 % амінопіразолону *Р*, 0,5 мл аміаку розчину розведеного та 1 мл розчину 8 % калію фериціаніду *Р*, ретельно переміщують після кожного додавання. Витримують протягом 5 хв, одержаний водний шар струшують не менше як 3 порціями (25 мл кожна) хлороформу *Р*, хлороформний шар щоразу фільтрують крізь попередньо промитий хлороформом *Р* фільтр у мірну колбу ємністю 100 мл, доводять об'єм розчину хлороформом *Р* до позначки та перемішують.

Розчин порівняння. 0,015 г (точна наважка) арбутину розчиняють у 50 мл води, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100 мл. 5,0 мл одержаного розчину поміщують у ділильну лійку, а далі чинять так само, як під час приготування випробовуваного розчину, що описано вище.

Вимірюють оптичну густину випробовуваного розчину за довжини хвилі 455 нм, використовуючи як компенсаційну рідину хлороформ *Р*. Паралельно вимірюють оптичну густину розчину порівняння. Вміст гідрохінон-похідних у екстрактах мучниці звичайної листя в перерахунку на арбутин та сухий залишок у відсотках обчислюють за формулою:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 2{,}5 \cdot P}{A_0 \cdot m},$$

де: A – оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 455 нм; A_0 – оптична густина розчину порівняння за довжини хвилі 455 нм; m_0 – маса наважки ФСЗ ДФУ арбутину, у г; P – вміст арбутину безводного у ФСЗ ДФУ арбутину, у %; m – маса наважки екстракту, у г.

Вміст флаваноїдів в екстрактах визначали спектрофотометричним методом у перерахунку на рутин за ДФУ 2.2.25 [1, 18, 19].

Вихідний розчин. Близько 0,25 г сухого екстракту мучниці звичайної листя (точна наважка) вносять у мірну колбу ємністю 25,0 мл, розчиняють у 70 % спирті етиловому за перемішування, доводять об'єм розчину в колбі до мітки цим же розчинником і перемішують. 2,0 мл розчину вносять у мірну колбу ємністю 25 мл, додають 2,0 мл 3 % алюмінію хлориду в 96 % спирті етиловому, доводять об'єм 70 % спиртом до мітки і перемішують.

Через 30 хв розчин фільтрують крізь паперовий фільтр, відкидаючи перші порції фільтрату, та вимірюють оптичну густину отриманого комплексу за довжини хвилі 417 нм. Розчином порівняння є розчин, що містить 2,0 мл розчину, доведений у мірній колбі ємністю 25,0 мл до мітки 70 % спиртом етиловим.

Розчин порівняння. Близько 0,01 г (точна наважка) рутину, висушеного за температури 135 °С до постійної маси, вносять у мірну колбу ємністю 25 мл, розчиняють у 96 % спирті, доводять об'єм розчину до мітки й перемішують. До 1,0 мл розчину РСЗ рутину додають 1,0 мл 3 % спиртового розчину алюмінію хлориду й доводять 70 % спиртом до 25,0 мл. Як розчин порівняння використовують розчин РСЗ рутину, доведений у мірній колбі ємністю 25,0 мл до мітки 70 % спиртом етиловим.

Вміст суми флавоноїдів у екстрактах у перерахунку на рутин обчислюють (у відсотках) за формулою:

$$X = \frac{A_1 \cdot a_0 \cdot 25 \cdot 1 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot a_1 \cdot 25 \cdot 2 \cdot 25 \cdot (100 - w)},$$

де A_1 – оптична густина досліджуваного розчину; A_0 – оптична густина розчину комплексу РСЗ рутину з алюмінію хлоридом; a_1 – наважка сировини, у г; a_0 – наважка РСЗ рутину; w – втрата в масі за висушування, у %.

Статистичну обробку результатів виконували згідно з вимогами ДФУ [1].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті проведених досліджень розроблено проєкти МКЯ та згідно з їх вимогами проведено дослідження сухих екстрактів мучниці звичайної листя, які було модифіковано з цистеїном, фенілаланіном, валіном, гліцином та аргініном. Проєкти МКЯ на сухі екстракти мучниці звичайної розроблено за такими показниками: опис, розчинність, ідентифікація (ТШХ: метод А (гідрохінон-похідні), метод В (флавоноїди) та метод С (амінокислоти)), втрата в масі під час висушування (не більше 10 %), залишкові кількості

органічних розчинників (спирт етиловий не більше 1,0 %), важкі метали (не більше 100 ppm), мікробіологічна чистота, вміст гідрохінон-похідних (менше 5 % у перерахунку на арбутин) та флавоноїдів (не менше 2 % у перерахунку на гіперозид). Усі екстракти відповідали вимогам розробленої документації.

Опис. Мучниці звичайної листя екстракти сухі є аморфні гігроскопічні порошки від світло-коричневого до коричневого кольору зі слабким запахом.

Розчинність. Екстракти легко розчиняються у 50 % етанолі, помірно розчинні у 96 % етанолі та воді, дуже мало розчиняються у хлороформі та ефірі. Випробування проводили відповідно до вимог ДФУ 1.4.

Ідентифікація

Метод А. Ідентифікація гідрохінон-похідних. Визначення проводили методом тонкошарової хроматографії (2.2.27) ДФУ.

Випробовуваний розчин. До 0,5 г екстракту мучниці звичайної листя додавали 5 мл суміші рівних об'ємів метанолу *Р* і води *Р*, нагрівали зі зворотним холодильником протягом 10 хв, одержаний гарячий розчин фільтрували, колбу та фільтр ополіскували сумішшю рівних об'ємів метанолу *Р* і води *Р* і доводили тією самою сумішшю розчинників до об'єму 5 мл.

Розчин порівняння. 25 мг арбутину *Р* розчиняли в метанолі *Р* і доводили об'єм розчину до 10,0 мл тим самим розчином.

Пластинка: ТШХ пластинка із шаром силікагелю. *Рухома фаза*: кислота мурашина безводна *Р* – вода *Р* – етилацетат Р (6:6:88). *Об'єм проби*, що наноситься: 10 мкл, смугами. *Відстань, що має пройти рухома фаза*: 15 см від лінії старту. *Висушування*: за температури від 100 до 105 °С. *Виявлення*: обприскують пластинки розчинами 10 г/л амінопіразолону, 20 г/л калію фериціаніду, проявляють парами аміаку й переглядають у денному світлі.

Результати: у середній частині хроматограми розчину порівняння проявляється червона зона, відповідна арбутину (рис.). На хроматограмі випробовуваного розчину можуть проявлятися також інші флюоресційні зони.

На хроматографі (рис.) за перегляду в денному світлі ідентифікували коричневі зони на рівні зон галової кислоти та червоні плями на рівні зони арбутину. Отже, в екстрактах мучниці звичайної листя було виявлено галову кислоту та арбутин.

Метод В. Ідентифікація флавоноїдів. Визначення проводили методом тонкошарової хроматографії (2.2.27) ДФУ [1, 20].

Випробовуваний розчин. До 0,5 г екстракту додавали 10 мл метанолу, нагрівали на водяній бані за температури 60 °С зі зворотним холодильником протягом 10 хв, охолоджували і фільтрували.

Розчин порівняння. 3,0 мг рутину розчиняють у 10 мл метанолу.

Пластинка: ТШХ пластинка із шаром силікагелю. *Рухома фаза:* етилацетат – вода – кислота мурашина безводна – кислота оцтова безводна (72:14:7:7). *Об'єм проби,* що наноситься: 20 мкл, смугами. *Відстань, що має пройти рухома фаза:* 15 см від лінії старту. *Висушування:* за температури від 100 до 105 °С. *Виявлення:* обприскують розчином 10 г/л аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти в метанолі. Потім пластинку обприскують розчином 50 г/л макроголу 400 у метанолі, сушать на повітрі протягом 30 хв і переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

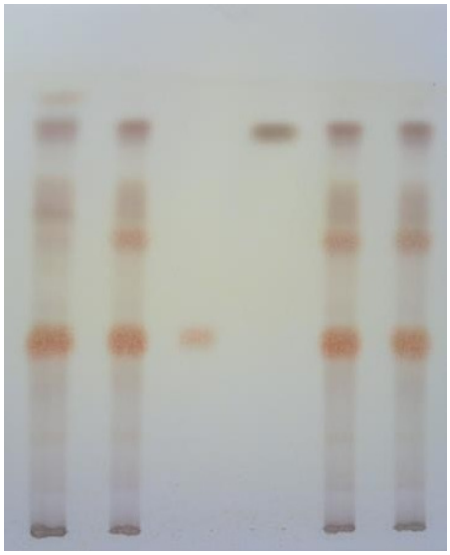

Рис. *Хроматограма розчинів екстрактів мучниці звичайної листя за перегляду в денному світлі*

Результати: у середній частині хроматограми розчину порівняння проявляється жовтаво-помаранчева флюоресційна зона, що відповідає рутину. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть проявлятися також інші флюоресційні зони.

Метод С1, С2. Ідентифікація валіну, цистеїну або фенілаланіну. Визначення проводять методом тонкошарової хроматографії (2.2.27), використовуючи ТШХ пластинки із шаром *силікагелю Р*.

Для аналізу валіну, цистеїну або фенілаланіну у відповідних екстрактах як *рухому фазу* використовують суміш розчинників *кислота оцтова льодяна Р – вода Р – бутанол Р* (20:20:60).

Розчин порівняння цистеїну (а). 10 мг ФСЗ цистеїну розчиняють у воді Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 50 мл.

Розчин порівняння валіну (б). 10 мг ФСЗ валіну розчиняють у 0,1 М розчині кислоти хлористоводневої і доводять об'єм розчину тією самою кислотою до 50 мл.

Розчин порівняння фенілаланіну (в). 10 мг ФСЗ фенілаланіну розчиняють у суміші рівних об'ємів *кислоти оцтової льодяної Р* і *води Р* і доводять об'єм розчину тією самою сумішшю розчинників до 50 мл.

На лінію старту хроматографічної пластинки наносять 5 мкл випробуваного розчину та 5 мкл розчину

порівняння (*а, б* або *в* залежно від субстанції). Пластинку сушать на повітрі та поміщають у камеру із системою розчинників: *кислота оцтова льодяна Р – вода Р – бутанол Р* (20:20:60). Коли фронт розчинників пройде 15 см від лінії старту, пластинку виймають із камери, сушать на повітрі та обприскують розчином *нінгідрину Р*. Пластинку нагрівають за температури від 100 °С до 105 °С протягом 15 хв. На хроматограмі випробовуваного розчину спостерігається пляма на рівні плями розчину порівняння, яка за кольором і значенням R_f відповідає стандартній речовині.

Метод С3. Ідентифікація аргініну. *Випробовуваний розчин.* 0,5 г екстракту мучниці звичайної листя розчиняють у *кислоті хлористоводневій, розведеній Р,* і доводять об'єм розчину тим же розчинником до 10 мл. 1 мл розчину екстракту доводять *водою Р* до об'єму 50 мл. *Розчин порівняння.* 10 мг *ФСЗ аргініну* розчиняють у *0,1 М розчині кислоти хлористоводневої* і доводять об'єм розчину тим же розчинником до 50 мл. *Пластинка:* ТШХ пластинка із шаром силікагелю. *Рухома фаза:* етилацетат – вода – кислота мурашина безводна – кислота оцтова безводна (72:14:7:7). *Об'єм проби,* що наноситься: випробуваного розчину – 50 мкл, розчину порівняння – 5 мкл, смугами. *Відстань, що має пройти рухома фаза:* 15 см від лінії старту. *Висушування:* за температури від 100 °С до 105 °С. *Виявлення:* обприскують *розчином нінгідрину Р*, сушать за температури від 100 °С до 105 °С протягом 15 хв і переглядають у денному світлі. *Результати:* на хроматограмі випробуваного розчину має виявлятись основна пляма на рівні розчину порівняння, відповідна їй за забарвленням.

Метод С4. Ідентифікація гліцину. Визначення проводять методом тонкошарової хроматографії (2.2.27), використовуючи ТШХ пластинки із шаром силікагелю Р. Для аналізу лізину або гліцину у відповідних екстрактах як *рухому фазу* використовують *аміак концентрований Р – 2-пропанол Р* (30:70). *Випробовуваний розчин.* 1 г сухого екстракту розчиняють у 10 мл 96 % етанолу або метанолу, фільтрують через паперовий фільтр, відганяють розчинник та розчиняють у 1 мл метанолу. *Розчин порівняння.* 25 мг ФСЗ гліцину розчиняють у воді *Р* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл. На лінію старту хроматографічної пластинки наносять 5 мкл випробуваного розчину та 5 мкл розчину порівняння (*а* або *б* залежно від субстанції). Пластинку сушать на повітрі та поміщають у камеру із сумішшю розчинників. Коли фронт розчинників пройде 15 см від лінії старту, пластинку виймають із камери, сушать за температури від 100 °С до 105 °С до зникнення запаху аміаку та обприскують розчином нінгідрину *Р*. Пластинку нагрівають за температури від 100 °С до 105 °С протягом 15 хв. На хроматограмі випробуваного розчину виявляється основна інтенсивна зона на рівні плями розчину порівняння.

Випробування

Втрата в масі за висушування. Не більше 10,0 %. Визначення проводять згідно з ДФУ 2.0 *(2.8.17).* 0,50 г здрібненого на тонкий порошок екстракту поміщають у бюкс і сушать у сушильній шафі за температури від 100 °С до 105 °С протягом 3 год до постійної маси. Охолоджують в ексикаторі та зважують.

Залишкові кількості органічних розчинників (спирт етиловий). Вміст спирту етилового у модифікованому екстракті мучниці звичайної листя не повинен перевищувати 1,0 %.

Близько 1 г (точна наважка) екстракту вносять у мірну колбу ємністю 10 мл, розчиняють у 7 мл води, додають 1 мл ацетону і 1,2-дихлоретану (внутрішні стандарти), доводять об'єм розчину водою до мітки і перемішують. По 1 мкл отриманого розчину і розчину стандартного зразка (СЗ) спирту етилового хроматографують на газовому хроматографі з полум'яно-іонізаційним детектором, одержуючи не менш 5 хроматограм.

Результати аналізу вважаються достовірними, якщо витримуються вимоги тесту «Перевірка придатності хроматографічної системи».

Важкі метали. Для токсикологічної безпеки в усіх видах фітохімічної продукції потрібно контролювати вміст важких металів, за вимогами ДФУ (*2.4.8*) їх вміст має бути не більше 100 ppm.

Мікробіологічна чистота. Для фітохімічних засобів характерна мікробна забрудненість, тому потрібно контролювати кількість життєздатних бактерій і грибів у екстрактах. Випробування проводять відповідно до вимог ДФУ, *2.6.12, 2.6.13*. [1, 21].

Склад нейтралізувальної рідини, що містить 10 % полісорбату-80 та 20 % ізопропілміристату: полісорбат-80 – 100 г, ізопропілміристат – 200 г, лецитин (яєчний) – 3 г, гістидину гідрохлорид – 1 г, пептон ферментативний – 1 г, натрію хлорид – 4,3 г, калію дигідрофосфат – 3,6 г, динатрію гідрофосфат дигідрат – 7,2 г, вода очищена – 1000 мл.

Нормування мікробіологічної чистоти екстракту визначають відповідно до вимог ДФУ, *5.1.4*, категорія 2. В екстракті допускається загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів: не більше 1000 мікроорганізмів (бактерій і грибів сумарно) в 1 г. Не допускається наявність ентеробактерій і деяких інших грамнегативних бактерій в 1 г. Не допускається наявність *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г. Не допускається наявність *Staphylococcus aureus* в 1 г.

Кількісне визначення

Вміст гідрохінон-похідних в екстрактах визначали спектрофотометричним методом у перерахунку на арбутин за ДФУ 2.2.25. Вміст гідрохінон-похідних у перерахунку на арбутин – не менше 5 % (таблиця).

Вміст флаваноїдів в екстрактах визначали спектрофотометричним методом у перерахунку на рутин за ДФУ 2.2.25. Вміст суми флаваноїдів у перерахунку на рутин – не менше 2 % (таблиця).

Таблиця

РЕЗУЛЬТАТИ АНАЛІЗУ СУХИХ ЕКСТРАКТІВ МУЧНИЦІ ЗВИЧАЙНОЇ ЛИСТЯ ЗГІДНО З МКЯ

Показники якості	Допускні межі	Результати визначення в серіях екстрактів, модифікованих з														
		цистеїном			гліцином			валіном			фенілаланіном			аргініном		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Опис	Аморфний гігроскопічний порошок від світло-коричневого до коричневого кольору зі слабким запахом	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Розчинність																
у 96 % етанолі	помірно розчинний	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
у 50 % етанолі	легко розчинний	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
в ефірі	дуже мало розчинний	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
у хлороформі	дуже мало розчинний	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
у воді	помірно розчинний	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ідентифікація																
Гідрохінон-похідні	Метод А (ТШХ)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Флавоноїди	Метод В (ТШХ)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Амінокислоти	Метод С (ТШХ) Цистеїн Гліцин Валін Фенілаланін Аргінін	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Випробування																
Втрата в масі під час висушування	Не більше 10 %	6,9	5,1	4,5	7,4	6,4	7,2	5,6	4,8	6,3	8,7	8,1	6,8	6,5	4,9	5,7
Залишкові кількості органічних розчинників	Не більше 1,0 % (спирт етиловий)	0,4	0,3	0,2	0,4	0,2	0,1	0,2	0,3	0,2	0,1	0,1	0,2	0,5	0,2	0,4
Важкі метали	Не більше 100 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Мікро-біологічна чистота	В 1 г препарату не більше 100 мікроорганізмів (бактерій і грибів сумарно). Не допускається наявність ентеробактерій та деяких інших грам-негативних бактерій в 1 г. Не допускається наявність *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г. Не допускається наявність *Staphylococcus aureus* в 1 г	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Кількісне визначення																
Вміст гідрохінон-похідних	не менше 5 % у перерахунку на арбутин	6,44 ± 0,08	6,32 ± 0,04	6,12 ± 0,03	5,51 ± 0,02	5,54 ± 0,07	5,22 ± 0,05	7,11 ± 0,08	6,87 ± 0,05	7,02 ± 0,04	5,18 ± 0,07	5,64 ± 0,08	5,21 ± 0,06	6,07 ± 0,04	5,64 ± 0,05	5,42 ± 0,08
Вміст флавоноїдів	не менше 2 % у перерахунку на рутин	2,21 ± 0,02	2,32 ± 0,05	2,42 ± 0,03	2,51 ± 0,02	2,44 ± 0,03	2,52 ± 0,03	2,31 ± 0,01	2,30 ± 0,04	2,22 ± 0,03	2,18 ± 0,03	2,24 ± 0,02	2,21 ± 0,03	2,07 ± 0,02	2,04 ± 0,05	2,02 ± 0,03

Примітка. «+» – екстракт відповідає вимогам проєкту МКЯ.

Отже, всі серії модифікованих сухих екстрактів мучниці звичайної листя відповідають вимогам розробленого проєкту МКЯ.

ВИСНОВКИ

Розроблено проєкти МКЯ на модифіковані сухі екстракти мучниці звичайної листя та згідно з їх вимогами проведено дослідження 5 сухих екстрактів, які було модифіковано з цистеїном, гліцином, валіном, фенілаланіном та аргініном. Одержані стандартизовані екстракти є перспективними субстанціями та будуть використані для розробки лікарських форм нових лікарських засобів з уроантисептичною, діуретичною та гіпоглікемічною дією.

Конфлікт інтересів: відсутній.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Державна фармакопея України : в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. Т. 1. 1128 с.
2. Плеханов А. Н., Дамбаев А. Б. Инфекция мочевых путей: эпидемиология, этиология, патогенез, факторы риска, диагностика : обзор литературы. *Acta Biomedica Scientifica*. 2016. Т. 1, № 1. С. 70–74. DOI: https://doi.org/10.12737/21490.
3. Машковский М. Д. Лекарственные средства. 16-е, изд. перераб., испр. и доп. Москва : Новая Волна, 2012. 1216 с.
4. Фармацевтична енциклопедія / гол. ред. ради В. П. Черних. 3-є вид., перероб. і допов. Київ : МОРІОН, 2016. 1952 с.
5. A Single Extraction Step in the Quantitative Analysis of Arbutin in Bearberry (Arctostaphylos uva-ursi) Leaves by High-Performance Liquid Chromatography / I. Parejo et al. *Phytochemical Analysis*. 2001. Vol. 12, Iss. 5. P. 336–339. DOI: https://doi.org/10.1002/pca.602.
6. Radulović N., Blagojević P., Palić R. Comparative Study of the Leaf Volatiles of Arctostaphylos uva-ursi (L.) Spreng. And Vaccinium vitis-idaea L. (Ericaceae). *Molecules*. 2010. Vol. 15, Iss. 9. P. 6168–6185. DOI: https://doi.org/10.3390/molecules15096168.
7. Flavonoids, sugars and fruit acids of alpine bearberry (Arctostaphylos alpina) from Finnish Lapland / K. Linderborg et al. *Food Research International*. 2011. Vol. 44, Iss. 7. P. 2027–2033. DOI: https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.036.
8. Pegg R. B., Rybarczyk A., Amarowicz R. Chromatographic separation of tannin fractions from a bearberry-leaf (Arctostaphylos uva-ursi L. Sprengel) extract by HPLC – a short report. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2008. Vol. 58, Iss. 4. P. 485–490.
9. Amarowicz R., Pegg R. B. Inhibition of proliferation of human carcinoma cell lines byphenolic compounds from a bearberry-leaf crude extract and its fractions. *Journal of functional foods*. 2013. Vol. 5, Iss. 2. P. 660–667. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.01.009.
10. Дослідження фенольних сполук спиртового екстракту листя мучниці звичайної / М. А. Комісаренко та ін. Фармаком. 2012. № 1/2. С. 50–54. URL: http://sphu.org/wp-content/uploads/2017/01/Farmacom_1_2_2012.pdf.
11. Дослідження динаміки екстрагування біологічно активних речовин з листя мучниці звичайної / Н. Б. Чайка та ін. Фітотерапія. Часопис. 2019. № 4. С. 64–68. DOI: https://doi.org/10.33617/2522-9680-2019-4-64.
12. Спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу з діуретичною та протизапальною дією з листя мучниці звичайної з валіном / Н. Б. Чайка та ін. : пат. на кор. мод. 141184 Україна, № u 2019 9322 ; заявл. 15.08.2019 ; опубл. 25.03.2020, Бюл. № 6.
13. Спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу діуретичної дії з листя мучниці звичайної та гліцину / Н. Б. Чайка та ін. : пат. на кор. мод. 140872 Україна. № u 2019 09323 ; заявл. 15.08.2019 ; опубл. 10.03.2020, Бюл. № 5.
14. Спосіб одержання засобу з гіпоглікемічною та ліпотропною дією з листя мучниці звичайної з додаванням цистеїну / О. М. Кошовий та ін. : пат. на кор. мод. 142930 Україна. № u 2019 10495 ; заявл. 21.10.2019 ; опубл. 10.07.2020, Бюл. № 13.
15. Спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу з діуретичною дією з листя мучниці звичайної з фенілаланіном / Н. Б. Чайка та ін. : пат. на кор. мод. 140486 Україна. № u 2019 09324 ; заявл. 15.08.2019 ; опубл. 25.02.2020, Бюл. № 4.
16. Количественное определение арбутина в листьях толокнянки обыкновенной / В. А. Куркин и др. Химия растительного сырья. 2015. № 1. С. 95–100. DOI: https://doi.org/10.14258/jcprm.201501410.
17. Migas P., Krauze-Baranowska M. The significance of arbutin and its derivatives in therapy and cosmetics. *Phytochemistry Letters*. 2015.Vol. 13. С. 35–40. DOI: http://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.05.015.
18. Кошовий О. М. Сучасні підходи до створення лікарських засобів на основі рослин родів Евкаліпт та Шавлія : автореф. дис. … д-ра фармацевт. наук : 15.00.02. Харків, 2013. 41 с. URL: http://dspace.nuph.edu.ua/handle/123456789/2574.
19. The study of the chemical composition and pharmacological activity of Salvia officinalis leaves extracts getting by complex processing / O. N. Koshovyi et al. *Azerbaijan Pharmaceutical and Pharmacotherapy Journal*. 2015. № 1. P. 30–34.
20. Дослідження ізопреноїдного складу та антимікробної активності густого екстракту листя шавлії лікарської / О. М. Кошовий та ін. Клінічна фармація. 2011. № 1. С. 26–29.
21. Koshovyi O., Romanenko Ye., Komissarenko A. The study of the phenolic composition of the dry extract of motherwort herb and its psychotropic activity. *American Journal of Science and Technologies*. 2016. № 1 (21). P. 1055–1059.

REFERENCES

1. DP "Ukrainskyi naukovyi farmakopeinyi tsentr yakosti likarskykh zasobiv". (2015). *Derzhavna Farmakopeia Ukrainy. (Vols. 1-3; Vol. 1).* (2nd ed.). Kharkiv: DP "Ukrainskyi naukovyi farmakopeinyi tsentr yakosti likarskykh zasobiv", 1128.
2. Plekhanov, A. N., Dambayev, A. B. (2016). *Acta Biomedica Scientifica*, *1 (1)*, 70–74.
3. Mashkovskii, M. D. (2012). *Lekarstvennye sredstva*. Moscow: Novaia Volna, 1216.
4. Chernykh, V. P. (Ed.). (2016). *Pharmaceutical encyclopedia.* Kyiv: MORION, 1952.
5. Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Codina, C. A. (2001). A Single Extraction Step in the Quantitative Analysis of Arbutin in Bearberry (Arctostaphylos uva-ursi) Leaves by High-Performance Liquid Chromatography. *Phytochem. Anal*., *12*, 336–339. doi: 10.1002/pca.602.
6. Radulović, N., Blagojević, P., Palić R. (2010). Comparative Study of the Leaf Volatiles of Arctostaphylos uva-ursi (L.) Spreng. And Vaccinium vitis-idaea L. (Ericaceae). *Molecules*, *15,* 6168-6185. doi:10.3390/molecules15096168.
7. Linderborg, K., Laaksonen, O., Kallio, H., Yang, B. (2011). Flavonoids, sugars and fruit acids of alpine bearberry (Arctostaphylos alpina) from Finnish Lapland. *Food Research International*, 44 (7), 2027–2033. doi: https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.036.
8. Amarowicz, R., Pegg, R.B., Kosińska, A. (2008). Chromatographic separation of tannin fractions from a bearberry-leaf (Arctostaphylos uva-ursi L. Sprengel) extract by HPLC – a short report. *Pol. J. Food Nutr. Sci*., *58 (4)*, 485–490.
9. Amarowicz, R., Pegg, R. B. (2013). Inhibition of proliferation of human carcinoma cell lines byphenolic compounds from a bearberry-leaf crude extract and its fractions. *Ournal of functional foods*, *5,* 660–667. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.jf f.2013.01.009.
10. Komisarenko, M. A., Heiderykh, A. S., Kovaleva, A. M., Koshovyi, O. M. (2012). *Farmakom, 1/2*, 50–54. Available at: http://sphu.org/wp-content/uploads/2017/01/Farmacom_1_2_2012.pdf.
11. Chaika, N. B., Komisarenko, M. A., Koshovyi, O. M., Kovaleva, A. M., Borodina, N. V. (2019). *Fitoterapiya. Chasopys*, 4, 64–68. doi: https://doi.org/10.33617/2522-9680-2019-4-64.
12. Chaika, N. B., Koshovyi, O. M., Kireiev, I. V., Il'iina, T. V., Borodina, N. V. (2020). Patent Ukraina № 141184. *Biul., 6.*

13. Chaika, N. B., Koshovyi, O. M., Kireiev, I. V., Komisarenko, M. A., Kovaleva A. M. (2020). Patent Ukraina № 140872. *Biul., 5.*
14. Koshovyi, O. M., Kravchenko, H. B., Krasil'nikova, O. A., Mazen, Matar, Chaika, N. B. (2020). Patent Ukraina № 142930. *Biul., 13*.
15. Chaika, N. B., Koshovyi, O. M., Kireiev, I. V., Zupanets, I. A., Komisarenko, A. M. (2020). Patent Ukraina № 140486. *Biul., 4.*
16. Kurkin, V. A., Riazanova, T. K., Platonov, I. A., Pavlova, L. V. (2015). *Khimiia rastitelnoho syria*, *1*, 95–100. doi: https://doi.org/10.14258/jcprm.201501410.
17. Migas, P., Krauze-Baranowska, M. (2015). The significance of arbutin and its derivatives in therapy and cosmetics. *Phytochemistry Letters*, *13,* 35–40. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2015.05.015.
18. Koshovyi, O. M. (2013). Suchasni pidkhody do stvorennya likarskykh zasobiv na osnovi roslyn rodiv Evkalipt ta Shavliya. *Extended abstract of Doctors thesis.* Kharkiv, 41.
19. Koshovyi, O. N., Vovk, H. V., Akhmedov, E. Yu., Komissarenko, A. N. (2015). The study of the chemical composition and pharmacological activity of Salvia officinalis leaves extracts getting by complex processing. *Azerbaijan Pharmaceutical and Pharmacotherapy Journal*, *1,* 30–34.
20. Koshovyi, O. M., Perederii, Ye. O., Osolodchenko, T. P., Kovaleva, A. M., Komisarenko, A. M. (2011). *Klinichna farmatsiia*, *1*, 26–29.
21. Koshovyi, O., Romanenko, Ye., Komissarenko, A. (2016). The study of the phenolic composition of the dry extract of motherwort herb and its psychotropic activity. *American Journal of Science and Technologies*, *1 (21),* 1055–1059.

Відомості про авторів:
Чайка Н. Б., аспірантка кафедри фармакогнозії, Національний фармацевтичний університет Міністерства охорони здоров'я України. E-mail: gnosy@nuph.edu.ua
Кошовий О. М., доктор фарм. наук, професор, завідувач кафедри фармакогнозії, Національний фармацевтичний університет Міністерства охорони здоров'я України. E-mail: oleh.koshovyi@gmail.com. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9545-8548
Комісаренко М. А., асистент кафедри фармакогнозії, Національний фармацевтичний університет Міністерства охорони здоров'я України. E-mail: a0503012358@gmail.com. ORCID: 0000-0002-1161-8151
Кіреєв І. В., доктор мед. наук, професор, директор Навчально-наукового інституту прикладної фармації, Національний фармацевтичний університет Міністерства охорони здоров'я України. E-mail: ivkireev1026@gmail.com. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5413-9273
Кравченко Г. Б., кандидатка біол. наук, доцентка, завідувачка кафедри біологічної хімії, Національний фармацевтичний університет Міністерства охорони здоров'я України. E-mail: annabk2014@gmail.com. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-6574-5028
Information about authors:
Chaika N., postgraduate student of the Pharmacognosy Department, National University of Pharmacy of the Ministry of Health of Ukraine. E-mail: oleh.koshovyi@gmail.com. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9545-8548
Koshovyi O., Doctor of Pharmacy (Dr. habil.), professor, head of the Pharmacognosy Department, National University of Pharmacy of the Ministry of Health of Ukraine. E-mail: oleh.koshovyi@gmail.com. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9545-8548
Komisarenko M., teaching assistant of the Pharmacognosy Department, National University of Pharmacy of the Ministry of Health of Ukraine. E-mail: a0503012358@gmail.com. ORCID: 0000-0002-1161-8151
Kireyev I., Doctor of Medicine (Dr. habil.), professor, Director of the Educational and Scientific Institute of Applied Pharmacy of the National University of Pharmacy of the Ministry of Health of Ukrain. E-mail: ivkireev1026@gmail.com. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5413-9273
Kravchenko G., Candidate of Biology (Ph.D), associate professor, head of the Biological Chemistry Department of the National University of Pharmacy of the Ministry of Health of Ukraine. E-mail: annabk2014@gmail.com. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-6574-5028
Сведения об авторах:
Чайка Н. Б., аспирант кафедры фармакогнозии, Национальный фармацевтический университет Министерства здравоохранения Украины. E-mail: gnosy@nuph.edu.ua
Кошевой О. Н., доктор фарм. наук, профессор, заведующий кафедрой фармакогнозии, Национальный фармацевтический университет Министерства здравоохранения Украины. E-mail: oleh.koshovyi@gmail.com. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9545-8548
Комиссаренко Н. А., ассистент кафедры фармакогнозии, Национальный фармацевтический университет Министерства здравоохранения Украины. E-mail: a0503012358@gmail.com. ORCID: 0000-0002-1161-8151
Киреев И. В., доктор мед. наук, профессор, директор Учебно-научного института прикладной фармации, Национальный фармацевтический университет Министерства здравоохранения Украины. E-mail: ivkireev1026@gmail.com. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5413-9273
Кравченко А. Б., кандидат биол. наук, доцент, заведующая кафедрой биологической химии, Национальный фармацевтический университет Министерства здравоохранения Украины. E-mail: annabk2014@gmail.com. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-6574-5028

Надійшла до редакції 06.11.2020 р.