

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ І. Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО МОЗ УКРАЇНИ

Фармацевтичний факультет

Кафедра управління та економіки фармації з технологією ліків

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри
_____ Наталія БЕЛЕЙ
«___» _____ 2024 р.

УДК 615.07.322:582.664.3/.665.4:575.222.7

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему: Дослідження впливу фармацевтичних факторів на ступінь
вилучення біологічно активних речовин з щавнату трави

Виконав здобувач вищої освіти V курсу
заочної форми навчання
спеціальності 226 Фармація, промислова фармація
_____ Тарас МИХАЙЛЮК

Науковий керівник:
кандидат фармацевтичних наук, доцентка, доцентка закладу вищої освіти
кафедри управління та економіки фармації з технологією ліків
_____ Лілія БУДНЯК

ТЕРНОПІЛЬ 2024

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	3
ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1 ЩАВНАТ – ПЕРСПЕКТИВНА РОСЛИНА ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ НА РОСЛИННІЙ ОСНОВІ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	7
1.1 Ботанічна характеристика та хімічний склад щавнату	7
1.2 Аналіз сучасних досліджень щавнату та його потенціал у розробці лікарських засобів і дієтичних добавок	12
1.3 Методи екстрагування при одержанні рослинних лікарських засобів	13
Висновок до розділу 1	14
РОЗДІЛ 2 ОБ’ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	15
2.1 Об’єкти дослідження	15
2.2 Короткі відомості про прилади, методи і реактиви	15
2.3 Методики встановлення якісного складу біологічно активних речовин та визначення їх кількісного вмісту	16
Висновок до розділу 2	20
РОЗДІЛ 3 ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ФАРМАЦЕВТИЧНИХ ФАКТОРІВ НА ВИЛУЧЕННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН З ЩАВНАТУ ТРАВИ	21
3.1 Вивчення впливу фармацевтичних факторів на процес екстрагування біологічно активних речовин з щавнату трави	22
3.2 Якісний склад та кількісний вміст індивідуальних сполук флавоноїдів у витяжці з щавнату трави	34
Висновки до розділу 3	36
ВИСНОВКИ	37
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	38
ДОДАТКИ	43

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

БАР – біологічно активні речовини;

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія;

ДФУ – Державна фармакопея України;

ЛЗ – лікарський засіб;

ЛРС – лікарська рослинна сировина;

МПЕ – математичне планування експерименту;

ФСЗ – фармакопейний стандартний зразок.

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження

Пошук та дослідження нових перспективних рослин та створення на їх основі лікарських засобів є актуальним для сучасної фармації [1, 2].

ЛЗ на основі рослинної сировини широко застосовуються в традиційній фітотерапії багатьох країн. Завдяки їх корисним властивостям, засоби рослинного походження становлять четверту частину від загальної кількості усіх ЛЗ, які використовуються в сучасній медицині [1, 3]. Рослинні лікарські засоби мають перевагу над синтетичними, оскільки рідко викликають побічні реакції та добре переносяться пацієнтами будь-якого віку [4-7].

Переваги фітотерапії у лікуванні включають системність, ефективність і безпечність довготривалої терапії. Цей метод доступний та економічно привабливий, оскільки дозволяє створювати альтернативні рецепти та замінювати компоненти лікарських зборів [8-9].

Провівши аналіз фармацевтичного ринку ЛЗ, які зареєстровані на території нашої країни, встановлено, що в Україні немає ЛЗ на основі сировини щавнату. Проте, уже розроблено рекомендації щодо використання щавнату в медицині для приготування спеціалізованих лікувально-профілактичних засобів харчування та дієтичних добавок, які рекомендують при залізодефіцитній анемії, інтоксикації хімічними речовинами, атеросклерозі, гіповітамінозі С і А та при інших захворюваннях [10].

У 1990-х роках науковці з відділу культурної флори Національного ботанічного саду імені М. М. Гришка в Україні провели селекційну роботу, схрестивши щавень шпинатний (*Rumex patientia*) і щавень тянь-шанський (*Rumex tianschanicus*) для створення гібриду щавлю. Цей гібрид успішно пройшов всі необхідні тестування і був включений до Державного реєстру сортів рослин України. Щавнат має значення як кормова, харчова, енергетична, а також лікарська рослина. Зважаючи на те, що щавнат на сьогодні є маловивченим,

дослідження його лікувальних властивостей та фітосубстанцій, одержаних з даної рослини, є актуальним.

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

Наукова робота виконана в рамках науково-дослідної програми кафедри управління та економіки фармації з технологією ліків Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України «Дизайн досліджень із фармацевтичної розробки лікарських засобів, маркетингового і фармакоеконічного аналізу, фармакологічної і клінічної активності" (номер Державної реєстрації 0123U100065).

Мета і завдання дослідження

Метою роботи було дослідити вплив фармацевтичних факторів, серед яких природа екстрагента, співвідношення сировина : екстрагент та метод екстрагування на ступінь вилучення біологічно активних речовин (БАР) з щавнату трави.

Для реалізації цієї мети необхідно вирішити такі завдання:

- провести інформаційний пошук і проаналізувати джерела літератури щодо поширення, хімічного складу та застосування щавнату у традиційній медицині та різних галузях;
- дослідити вплив фармацевтичних факторів на ступінь вилучення суми поліфенолів, суми кислот гідроксикоричних, суми флаваноїдів і кількість одержаного сухого залишку із щавнату трави;
- встановити методом ВЕРХ якісний склад та визначити кількісний вміст індивідуальних сполук флаваноїдів у витяжці з щавнату трави.

Об'єкти дослідження – щавнату трава (*Rumex patientia* L. × *Rumex tianshanicus* Losinsk.) і витяжки отримані на її основі.

Предметом дослідження є дослідження впливу фармацевтичних факторів на ступінь вилучення БАР, що містяться у щавнату траві.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше проведено дослідження впливу екстрагента, співвідношення сировина : екстрагент та методу екстрагування на вилучення суми поліфенолів, суми кислот

гідроксикоричних, суми флаваноїдів і кількість одержаного сухого залишку. Встановлено оптимальні умови екстрагування, що дозволяють максимізувати вихід суми флавоноїдів, суми поліфенолів та суми кислот гідроксикоричних. Встановлено, що використання 70 % етанолу як екстрагента, співвідношення сировина : екстрагент – 1 : 5 та метод мацерації з примусовою подачею екстрагента забезпечують найвищий вихід БАР з щавнату трави.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані результати можуть бути використані в промисловому виробництві ЛЗ та дієтичних добавок на основі щавнату. Встановлені оптимальні умови екстрагування дозволяють розробити ефективну технологію отримання екстрактів з високим вмістом БАР, що можуть застосовуватися у фармацевтичній та харчовій промисловості. Результати дослідження можуть бути основою для подальшого використання щавнату як цінного джерела БАР.

Апробація результатів роботи. Результати роботи були представлені та обговорені на Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю “Запорізький фармацевтичний форум-2023” (Запоріжжя, 2023) та Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю “Сучасна фармація: реалії сьогодення та перспективи розвитку” (Одеса, 2024).

Публікації. За матеріалами кваліфікаційної роботи опубліковано 4 праці, у тому числі 1 стаття, що індексується у наукометричній базі SCOPUS, 1 стаття в іноземному журналі, 2 тез доповідей у матеріалах Всеукраїнських конференцій з міжнародною участю, одна з яких представлена у вигляді стендової доповіді.

Обсяг і структура роботи. Наукова робота складається зі вступу, огляду літератури, двох розділів власних досліджень, висновків, списку використаних джерел літератури та додатків. Робота ілюстрована 5 таблицями і 14 рисунками. Список використаних джерел містить 37 найменувань, з них 31 кирилицею та 6 латиницею.

РОЗДІЛ 1

ЩАВНАТ – ПЕРСПЕКТИВНА РОСЛИНА ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ НА РОСЛИННІЙ ОСНОВІ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Ботанічна характеристика та хімічний склад щавнату

Щавнат (*Rumex patientia* L. x *Rumex tianschanicus* Losinsky) отриманий шляхом схрещування щавлю шпинатного (*Rumex patientia*) і щавлю тянь-шаньського (*Rumex tianschanicus*). Даний гібрид став популярним завдяки можливості універсального застосування так як тільки створений [11]. Рослина спочатку була виведена як кормова, але також знайшла застосування у харчовій, енергетичній та медичній сферах [11]. Щавнат успадкував найкращі властивості від своїх “батьків” і відрізняється високою продуктивністю та невибагливістю у вирощуванні. Ця рослина, відома також як “шпинат Утеуша”, має різноманітні народні назви, такі як високостебельний шпинат, багаторічний шпинат, гібридний кормовий щавель, англійський шпинат. Важливо зауважити, що щавнат відрізняється від щавлю та шпинату за ботанічним походженням, смаком тощо [11].

Науковцями було створено три сорти щавнату різного призначення. Сорт “Румекс Ок” призначений для використання як овочево-кормова культура, “Бекор 1” рекомендований як біоенергетична рослина, а “Київський Ультра” – як овочева культура. Внесений до Державного реєстру сортів рослин України у 2006 році. Сорт “Київський Ультра” характеризується ранньою стиглістю і, вже на початку квітня досягає періоду, коли може бути використаний у якості продукту для харчування [11].

Високий продуктивний потенціал та екологічна стійкість сортів щавнату підтверджені результатами багаторічних виробничих випробувань у різних зонах України [12].

Київський ультра

Сорт овочевого напрямку використання дає 35-45 т/га зеленої маси. Особлива привабливість сорту – це його ультраранність: вживати можна вже через 10-12 днів після відростання. Вживати, як овоч, щавнат можна до фази стеблуння. У нього хороші смакові якості: слабокислий смак без терпкості і гіркості, придатний для використання у дієтичному і дитячому харчуванні [10].

Біекор-1, Наставник

Ці сорти щавнату призначені для використання у біоенергетиці. Вони мають потужний габітус і суцвіття з легким бурим відтінком. Листя розеткове велике, має яйцевидно-ланцетну форму, без вираженого антоціанового забарвлення. Стебло значно потужніше, ніж у овочевих сортів, з більшим діаметром при основі. Вони відзначаються цінними кормовими та харчовими властивостями, а також мають високу репродуктивну здатність, накопичуючи та виділяючи солі з ґрунту [10]. Тому ці сорти щавнату особливо рекомендовані для вирощування на засолених ґрунтах та в пересихаючих районах.

Румекс К-1, Румекс ОК-2

Сорти кормового призначення. Характеризуються високою інтенсивністю вегетації та високим виходом поживних речовин, тривалим періодом використання. У висоту рослини досягають 2-3 м. Сорти кормового та біоенергетичного напрямків дають 85-98 т/га зеленої маси та 11,1-12,9 т/га сухої речовини.

Всі згадані сорти щавнату внесені до Державного реєстру сортів рослин України та рекомендовані для вирощування у різних зонах нашої країни, переважно у Лісостепу та на Поліссі. При необхідності багаторічні плантації щавнату легко знищуються за один вегетаційний період за допомогою механічної обробки площі. Після нього в ґрунті залишається багато органічних залишків, тому він є хорошим попередником для зернових та зернобобових культур [12].

Значення щавнату у харчовій галузі розглядається в роботі С. А. Бажай - Жежерун, кандидата технічних наук з Національного університету

харчових технологій, спільно з Д. Б. Рахметовим, доктором наук з Національного ботанічного саду ім. М. М. Гришка НАН України. Дослідження проводилося з метою визначення повноцінності білків у всіх сортах щавнату та оцінки вмісту аскорбінової кислоти та каротину в листках [13].

В таблиці 1.1 представлені дані про вміст загальної суми амінокислот в різних видів сировини щавнату. Згідно з даними, загальна сума замінних амінокислот становить 210,67 мг/г сухих речовин щавнату, а незамінних амінокислот – 117,47 мг/г. Це означає, що незамінні амінокислоти становлять 35,79 % від загальної кількості амінокислот [14, 15].

Таблиця 1.1 – Амінокислотний склад сировини щавнату

Назва амінокислоти	Вміст загальних амінокислот, мг/г				
	ЩЛ	ЩН	ЩК	ЩСТ	ЩС
1	2	3	4	5	6
Гліцин	9,75±0,02	9,85±0,02	3,88±0,03	0,27±0,02	5,96±0,02
L-валін*	13,60±0,02	11,61±0,02	3,73±0,02	0,87±0,02	7,06±0,02
L-лейцин*	15,23±0,02	13,08±0,02	4,43±0,02	1,08±0,02	9,65±0,02
L-серин	9,33±0,04	9,39±0,02	2,42±0,02	0,58±0,02	5,94±0,02
L-треонін*	2,55±0,02	2,13±0,02	1,51±0,02	н/в	0,94±0,02
L-ізолейцин*	1,70±0,02	н/в	0,45±0,01	0,93±0,01	н/в
L-пролін	15,12±0,02	9,45±0,05	4,94 ± 0,02	1,02± 0,01	6,70± 0,02
L-аспаргінова кислота	10,48±0,02	10,80±0,02	2,12±0,02	1,25±0,01	7,46±0,02
L-метіонін*	0,75±0,02	2,12±0,02	1,08±0,01	н/в	0,44±0,02
L-глутамінова кислота	5,96±0,02	5,76±0,03	0,41±0,02	0,71±0,02	4,25±0,02

Продовження таблиці 1.1

1	2	3	4	5	6
L-цистеїн	0,54±0,02	0,04±0,02	н/в	н/в	н/в
L-фенілфталеїн	16,23±0,05	12,63±0,05	5,59±0,02	0,74±0,02	7,99±0,02
L-глутамін	н/в	н/в	0,32±0,02	н/в	н/в
L-лізин*	6,74±0,03	7,26±0,04	3,05±0,02	0,73±0,02	5,35±0,02
L-гістидин	н/в	н/в	0,17±0,01	н/в	н/в
L-тирозин	6,64±0,04	5,23±0,04	2,92±0,02	0,32±0,01	3,27±0,01
L-триптофан	н/в	0,37±0,01	3,87±0,02	н/в	н/в
Примітки: 1. * – незамінні амінокислоти; 2. н/в – не виявлено; 3. ЩЛ – щавнату листя, ЩН – щавнату насіння, ЩК – щавнату корені, ЩСТ – щавнату стебла, ЩС – щавнату суцвіття.					

Рослини мають здатність синтезувати майже всі амінокислоти, тоді як організм людини може синтезувати лише частину з них. Незамінні амінокислоти, які організм людини не може виробляти самостійно, повинні надходити з харчовими продуктами, оскільки кожна з них виконує певну важливу фізіологічну функцію.

Порівнюючи дані щодо кількісного вмісту незамінних амінокислот у щавнаті з рекомендованими добовими нормами споживання цих амінокислот, можна зазначити, що введення цієї рослини або засобів на її основі до раціону харчування сприятиме задоволенню значної частини добових потреб у незамінних амінокислотах [13].

Білки щавнату мають значний вміст аргініну та гістидину, амінокислот, які є необхідними для дитячого організму. Аргінін сприяє покращенню зв'язків між нервовими клітинами, поліпшує пам'ять, підвищує бадьорість та імунітет, а

також знижує депресію. Вміст аргініну та гістидину у щавнаті складає, відповідно, 1301 та 779 мг на 100 г сухих речовин.

Так, клітковина є основним компонентом харчових волокон. Вона виконує ряд корисних функцій, таких як підтримка нормальної мікрофлори товстого кишечника, підвищення адсорбції мінеральних речовин, нормалізація вуглеводного та ліпідного обміну. Крім того, клітковина має лікувально-профілактичну дію при цукровому діабеті та ожирінні, оскільки сприяє підтримці стабільного рівня цукру в крові і зменшенню надлишкової ваги.

Позитивний вплив харчових волокон на лікування та профілактику захворювань кишечника пов'язаний з їх високою здатністю утримувати воду, яка залежить від характеристик харчових волокон, таких як гідрофільність, кількість біополімерів, розмір та інших фізико-хімічних властивостей [11].

Щавнат сорту Київський Ультра містить 11,5 % харчових волокон на суху речовину. Його водоутримувальна здатність становить 7,0 г води на 1 г волокна.

Пектини відомі своєю властивістю утворювати комплекси з токсичними речовинами, важкими металами та радіонуклідами, що сприяє їх виведенню з організму. Крім того, вони проявляють бактерицидну дію у кишечнику проти хвороботворних бактерій, регулюють рівень холестерину, збільшують стійкість організму до алергій та є корисними при захворюваннях шлунково-кишкового тракту [16].

У щавнаті вміст пектинових речовин становить 4,5 % на суху речовину, а щодо моно- та дисахаридів, вони складають 1,8 % на суху речовину щавнату [16].

У щавнаті вміст вітаміну С складає 950,0 мг%, β -каротину – 50,5 мг% на суху речовину. Крім того, рослина містить флавоноїди, які є потужними антиоксидантами, а вміст ніотинової кислоти становить 7,5 г% [16].

Кількість ліпідів у зеленій масі щавнату незначна – від 2,8 до 6,2 %. Рослини багаті на протеїн і золу, в листі багато каротину. Вміст клітковини у рослині може зростати з 6,8 до 30 %. Завдяки значній кількості цукрів, щавнат

успішно використовується як сировина для силосування у суміші зі злаковими та іншими добавками [16].

1.2 Аналіз сучасних досліджень щавнату та його потенціал у розробці лікарських засобів і дієтичних добавок

Щавнат успішно визнаний як овочева культура, оскільки його зелень можна зібрати значно раніше, ніж урожай інших ранньовесняних рослин. Молоде листя щавнату, фото якого представлено на рисунку 1.1, багате вітамінами і має приємний смак. Щавнат придатний для споживання до початку стебління [17].



Рисунок 1.1 – щавнат [17]

Застосовувати щавнат рекомендують для лікування анемії, вітамінних дефіцитів, отруєнь хімічними речовинами, атеросклерозу та інших захворювань. В українській селекції щавнат отримав визнання. За кордоном, особливо в країнах Європейського Союзу, його використовують як енергетичну рослину [17].

1.3 Методи екстрагування при виробництві рослинних лікарських засобів

З метою екстрагування БАР з рослинної сировини використовують такі методи екстрагування: мацерація, ремацерація, мацерація з примусовою подачею екстрагента, мацерація з перемішуванням, перколяція, реперколяція та інші.

При використанні такого методу, як мацерація, сировину заливають екстрагентом та настоюють протягом 7-ми діб, якщо не вказано іншої тривалості. Одержані витяжки зливають. Шрот промивають екстрагентом. Отримані витяжки об'єднують та фільтрують.

Перевага цього методу полягає у його простоті. До недоліків належить неповна екстракція БАР, надмірна тривалість процесу, можливий високий вміст баластних речовин у витяжках (пектини, слизи, білки тощо).

При мацерації з перемішуванням ЛРС заливають екстрагентом і настоюють протягом 7-ми діб, періодично перемішуючи.

Відмінність таких методів ,як мацерація та мацерація з перемішуванням, полягає у періодичному перемішуванні сировини з екстрагентом, а також тривалості екстрагування.

При ремацерації сировину заливають екстрагентом, який попередньо ділять на рівні порції. Із кожною порцією настоюють. Перевагами даного методу є те, що за короткий час повніше виснажується сировина, оскільки постійно створюється висока різниця концентрацій у сировині та екстрагенті [18-22].

Використовуючи такий метод екстрагування, як мацерація з примусовою подачею екстрагента, ЛРС заливають екстрагентом під тиском. Екстрагент циркулює через ЛРС протягом доби для покращення вилучення БАР. Отриману витяжку повторно подають на ЛРС під тиском. Дані дії повторюють протягом 3-ох діб. Перевагами є те, що цей метод дозволяє скоротити втрати діючих речовин і екстрагента, оскільки в шроті залишається невеликий об'єм витяжки, а в готовій витяжці міститься висока кількість екстрактивних речовин [23].

Висновок до розділу 1

Щавнат, отриманий шляхом схрещування щавлю шпинатного і щавлю тянь-шаньського, демонструє високий потенціал як багатофункціональна рослина. Завдяки своїм високим врожаям, невибагливості у вирощуванні та багатому хімічному складу, щавнат знайшов широке застосування у різних галузях, включаючи харчову, енергетичну та медичну.

Серед переваг щавнату варто відзначити високу продуктивність та ранню стиглість, що робить його придатним для споживання вже на початку весни, коли інші культури ще не дозріли. Щавнат є джерелом важливих вітамінів та амінокислот, які сприяють здоров'ю людини, особливо у випадках анемії, дефіциту вітамінів, атеросклерозу та інших захворювань.

Результати багаторічних досліджень підтверджують, що сорти щавнату, такі як “Румекс Ок”, “Бекор 1” та “Київський Ультра”, мають високу врожайність і екологічну стійкість, що робить їх перспективними для широкого використання в Україні та за кордоном.

Таким чином, щавнат має значний потенціал для подальшого розвитку і використання у виробництві ЛЗ та дієтичних добавок, що підтверджується його багатим хімічним складом БАР та універсальністю застосування.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Об'єкти дослідження

Траву щавнату заготовляли у період цвітіння рослини у 2023 р. на дослідних ділянках відділу культурної флори Національного ботанічного саду імені М. М. Гришка Національної академії наук України (м.Київ). Сушили сировину при температурі 40 °С у тепло-конвекційній сушарці.

Витяжки з щавнату трави одержували при використанні 20, 40, 50 та 70 % етанолу, при співвідношенні сировина : екстрагент – 1 : 5, 1 : 8, 1 : 10, 1 : 12, за допомогою таких методів екстрагування: мацерація, мацерація з перемішуванням, ремацерація, мацерація з примусовою подачею екстрагента.

2.2 Короткі відомості про прилади, методи і реактиви

З метою встановлення якісного складу БАР використовували реакції ідентифікації.

Якісний склад та кількісний вміст індивідуальних сполук фенольної природи визначали методом ВЕРХ на Agilent 1200 (Agilent Technologies, США). На хроматографічній колонці ZorbaxSB-Aq (4,6 мм ± 150 мм, 3,5 мкм) (Agilent Technologies, США) проводили розділення.

Дослідження проводили використовуючи такі методи:

- фізико-хімічні (абсорбційна спектрофотометрія в УФ-ділянці спектру);
- хімічні (гравіметрія);
- статистичні (математична обробка отриманих результатів).

Кількісний вміст суми флавоноїдів, суми поліфенолів, суми кислот гідроксикоричних визначали спектрофотометричним методом [24, 25].

У ході досліджень використовували мірний посуд класу А, фармакопейні стандартні зразки (ФСЗ), реактиви, що відповідають вимогам ДФУ, сушильну шафу, ексикатор, аналітичні ваги “Kern ABJ 120-4M, ”, спектрофотометр Lambda 25 PerkinElmer (США), спектрофотометр LabAnalyt SP-V1000 (Китай).

Технологічні параметри вивчали, використовуючи метод математичного планування експерименту (МПЕ).

Для планування експерименту було використано один із планів дисперсійного аналізу (латинський квадрат 4×4 третього порядку). В повному факторному експерименті, а саме 4^3 (три фактори на чотирьох рівнях) необхідно було б провести $N = 64$ експерименти [26].

Для аналізу результатів дослідження використовували Microsoft Excel.

2.3 Методики встановлення якісного складу біологічно активних речовин та визначення їх кількісного вмісту

Визначення суми флавоноїдів

Проводили ідентифікацію флавоноїдів за допомогою таких якісних реакцій:

- ціанідінова реакція: до 1 мл елюату додавали 2 краплі кислоти хлористоводневої і щіпку порошку металічного магнію;
- реакція із ферум (III) хлоридом: до 1 мл елюату додавали 2 краплі 10 % розчину ферум (III) хлориду .
- реакція з лугом: до 1 мл елюату додавали 2 краплі 10 % водно-спиртово розчину калію гідроксиду;
- реакція з плюмбум ацетатом: до 1 мл елюату додавали 4 краплі 10 % розчину плюмбум ацетату.

Кількісне визначення вмісту флавоноїдів.

Випробовуваний розчин. Аліквоту одержаної витяжки поміщали у мірну колбу місткістю 25 мл, додавали 10 мл 70 % етанолу, 2 мл 3 % спиртового розчину алюмінію хлориду і доводили об'єм отриманого розчину 70 % етанолом до позначки та перемішували.

Компенсаційний розчин. Аліквоту отриманої витяжки поміщали у мірну колбу місткістю 25 мл і доводили об'єм розчину 70 % етанолом до позначки та перемішували.

Розчин стандартного зразка рутину. 0,05 г (точна наважка) ФСЗ рутину поміщали у мірну колбу місткістю 100 мл, додавали 70 мл 70 % етанолу, розчиняли та доводили об'єм розчину тим же розчинником до позначки і перемішували.

Розчин порівняння. 1 мл розчину стандартного зразка рутину поміщали в мірну колбу місткістю 25 мл, додавали 2 мл 3 % спиртового розчину алюміній хлориду і доводили об'єм розчину 70 % етанолом до позначки, перемішували.

Компенсаційний розчин. 1 мл розчину стандартного зразка рутину поміщали в мірну колбу місткістю 25 мл та доводили об'єм розчину 70 % етанолом до позначки, перемішували.

Оптичну густину випробовуваного розчину і розчину порівняння вимірювали через 45 хв після приготування за довжини хвилі 408 нм відносно компенсаційних розчинів для кожного, відповідно.

Вміст суми флавоноїдів обчислювали у перерахунку на рутин у мг/мл.

Визначення суми поліфенолів

Визначення проводили за загальноприйнятою методикою ДФУ 2.8.14 у такій редакції [27].

Аліквоту витяжки доводили водою до об'єму 250 мл. Суміш фільтрували крізь фільтрувальний папір. Відкидали перші 50 мл фільтрату.

Вихідний розчин. Аліквоту поміщали у мірну колбу місткістю 25 мл і додавали воду очищену до позначки, перемішували та при необхідності фільтрували.

Випробовуваний розчин. 2 мл вихідного розчину поміщали у мірну колбу місткістю 25 мл, додавали 1 мл фосфорномолібденово-вольфрамового реактиву і 10 мл води очищеної та доводили об'єм розчину до позначки розчином 290 г/л натрію карбонату, перемішували.

Стандартний розчин. 50 мг пірогалолу розчиняли у воді і доводили об'єм розчину тим самим розчинником до 100 мл, перемішували. 5 мл одержаного розчину поміщали у мірну колбу місткістю 100 мл і доводили об'єм розчину водою очищеною до позначки, перемішували.

Розчин порівняння. 2 мл стандартного розчину пірогалолу поміщали у мірну колбу місткістю 25 мл, додавали 1 мл фосфорномолібденово-вольфрамового реактиву і 10 мл води очищеної та доводили об'єм розчину до позначки розчином 290 г/л натрію карбонату, перемішували.

Через 30 хв вимірювали оптичну густину випробовуваних розчинів і розчину порівняння за довжини хвилі 760 нм, використовуючи як компенсаційний розчин воду очищену.

Вміст суми поліфенолів обчислювали у перерахунку на пірогалол у мг/мл.

Визначення суми гідроксикоричних кислот

Наявність кислот гідроксикоричних встановлювали за реакцією з розчином ферум (III) хлориду. До 1 мл одержаної витяжки додавали 2 краплі 10 % розчину ферум (III) хлориду.

Кількісне визначення вмісту суми кислот гідроксикоричних.

Аліквоту витяжки поміщали у мірну колбу на 25 мл, додавали 20 % етанол до мітки. За необхідності розчин фільтрували через сухий паперовий фільтр (розчин В).

В мірну колбу місткістю 25 мл вносили 1 мл розчину В і доводили розчин до мітки 20 % етанолом.

Оптичну густина отриманого розчину вимірювали за довжини хвилі 327 нм. Розчином порівняння був 20 % етанол.

Вміст суми кислот гідроксикоричних у перерахунку на кислоту хлорогенову обчислювали у мг/мл.

Використовували питомий показник поглинання хлорогенової кислоти, що дорівнює 531

Встановлення якісного складу та визначення кількісного вмісту індивідуальних сполук флавоноїдів

Одержану витяжку з щавнату трави розводили у 8 разів 80 % етанолом. Отриманий розчин центрифугували при 3000 об/хв. Потім центрифугат фільтрували через одноразові мембранні фільтри з порами 0,22 мкм.

На рідинному хроматографі Agilent Technologies 1200 проводили рідинну хроматографію. В якості рухомої фази використовували ацетонітрил (А) та 0,1 % розчин мурашиної кислоти у воді (В). Елюювання проводили в градієнтному режимі (табл. 2.1).

Таблиця 2.1 – Параметри градієнтного режиму елюювання

Час, хв	Елюент А, %	Елюент В, %
0	5	95
20	30	70
50	100	0
60	100	0

Розділення проводили на хроматографічній колонці Zorbax SB-C18 (3,5 мкм, 150 ммх 4,6 мм) (Agilent Technologies, USA). Швидкість потоку через колонку становила 0,25 мл/хв, температура термостату 30 °С, об'єм інжекції – 4 мкл.

Детекцію проводили з використанням діодно-матричного детектора з реєстрацією сигналу при 280 та 365 нм та фіксацією спектрів поглинання у діапазоні 210-700 нм [28].

Ідентифікацію та кількісний аналіз проводили з використанням стандартних розчинів флавоноїдів (рутин, кверцетин-3-*O*- β -*D*-глюкозид, нарінгін, неогесперидин, кверцетин, нарінгенін, кемпферол, лютеолін, апігенін, кемпферол-3-*O*- β -*D*-глюкозид, фісетин, силібінін, байкалеїн, рамнетин, кастицин).

Вміст флавоноїдів розраховували у мг/мл витяжки.

Визначення сухого залишку

Визначення сухого залишку у рідкому екстракті проводили згідно ДФУ 2.8.16 [27].

2 мл витяжки поміщали у зважений бюкс, що мав висоту близько 3 см і діаметр близько 5 см. Випарювали насухо на водяній бані та в сушильній шафі сушили при температурі від 100 до 105 °С протягом 3 год. Бюкс охолоджували у ексикаторі над фосфор (V) оксидом при кімнатній температурі протягом 30 хв і зважували.

Висновки до розділу 2

1. Наведено характеристику об'єктів дослідження.
2. Наведено короткі відомості про прилади, методи і реактиви.
3. Наведено методики встановлення якісного складу БАР та визначення їх кількісного вмісту.

РОЗДІЛ 3

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ФАРМАЦЕВТИЧНИХ ФАКТОРІВ НА ВИЛУЧЕННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН З ЩАВНАТУ ТРАВИ

Для екстрагування БАР з рослинної сировини використовується екстрагування. Процес екстрагування, що є складним, визначається декількома факторами, серед яких природа екстрагенту, розмір частинок рослинного матеріалу (ступінь подрібнення), температура та тривалість екстрагування, а також співвідношення сировина : екстрагент.

При розробці фітопрепаратів, з метою забезпечення максимального виходу діючих БАР важливо враховувати різноманітні фармацевтичні фактори, що значно впливають на ефективність екстракції. До них належать гідродинамічні умови (обумовлено швидкістю перемішування, що впливає на контакт між екстрагентом та сировиною), поверхня розподілу фаз (із збільшенням поверхні контакту між сировиною та екстрагентом підвищується ефективність екстракції), різниця концентрацій БАР, метод екстрагування, в'язкість екстрагенту (в'язкий екстрагент може ускладнити процес екстракції, зменшуючи ефективність), температура (тепло сприяє розчиненню БАР в екстрагенті, але може також впливати на стабільність деяких сполук), природа ЛРС (різні рослини мають різний склад БАР, що можуть розчинятися по-різному), вологість (вологість сировини може впливати на розчинність БАР), насипна густина до та після усадки (зміни у насипній густині можуть вплинути на проникнення екстрагента та ефективність вилучення БАР), насипний об'єм (розмір частинок сировини може впливати на ефективність екстракції, так зменшення розміру частинок може збільшити поверхню контакту, що сприяє кращому проникненню екстрагента у середину ЛРС та ефективнішому вилученню БАР), коефіцієнт набухання та поглинання (впливає на процес екстракції через здатність рослинних матеріалів до збільшення свого об'єму під дією екстрагента) тощо [29-31].

Для скорочення часу та оптимізації досліджень (зменшення кількості експериментів) було застосовано МПЕ, яке базується на принципі дисперсійного аналізу. Це дозволило визначити оптимальні параметри для екстрагування ЛРС. МПЕ виявляється дуже зручним у разі, коли потрібно провести порівняльні експерименти для оцінки різних технологічних етапів та операцій у виробництві ЛЗ [32-35].

3.1 Вивчення впливу фармацевтичних факторів на процес екстрагування біологічно активних речовин з щавнату трави

Досліджувані фактори, серед яких співвідношення сировина : екстрагент, концентрація екстрагенту, метод екстрагування вивчали на 4 рівнях (табл. 3.1).

Таблиця 3.1 – Перелік фармацевтичних факторів, що вивчали при екстрагуванні БАР з щавнату трави

Фактори	Рівні факторів
А – концентрація екстрагенту	a_1 – 20 % етанол; a_2 – 40 % етанол; a_3 – 50 % етанол; a_4 – 70 % етанол.
В – співвідношення сировина : екстрагент	b_1 – 1 : 5; b_2 – 1 : 8; b_3 – 1 : 10; b_4 – 1 : 12.
С – метод екстрагування	c_1 – мацерація; c_2 – мацерація з перемішуванням; c_3 – ремацерація; c_4 – мацерація з примусовою подачею екстрагента.

Матриця планування експерименту та результати дослідження впливу фармацевтичних факторів на показники витяжок щавнату наведено у таблиці 3.2 [36, 37].

Таблиця 3.2 – Матриця планування експерименту і результати дослідження впливу фармацевтичних факторів на показники витяжок з щавнату трави

№	A	B	C	y ₁	y ₂	y ₃	y ₄
1	a ₁	b ₁	c ₁	1,01	3,46	0,98	1,25
2	a ₁	b ₂	c ₂	0,99	2,83	0,89	1,22
3	a ₁	b ₃	c ₄	0,77	2,43	0,82	0,73
4	a ₁	b ₄	c ₃	0,51	2,25	0,77	0,78
5	a ₂	b ₁	c ₂	2,98	3,8	1,93	1,65
6	a ₂	b ₂	c ₁	2,65	3,92	1,82	1,43
7	a ₂	b ₃	c ₃	2,11	3,18	1,70	1,1
8	a ₂	b ₄	c ₄	1,92	3,32	1,56	1,09
9	a ₃	b ₁	c ₃	3,25	4,88	2,98	1,71
10	a ₃	b ₂	c ₄	3,02	4,12	2,79	1,22
11	a ₃	b ₃	c ₁	2,65	3,41	2,42	1,12
12	a ₃	b ₄	c ₂	2,23	3,05	1,95	0,91
13	a ₄	b ₁	c ₄	3,57	5,05	2,83	1,75
14	a ₄	b ₂	c ₃	3,13	3,8	2,43	1,03
15	a ₄	b ₃	c ₂	2,86	4,97	2,39	1,06
16	a ₄	b ₄	c ₁	2,29	3,77	1,84	0,94

Примітка:

y₁ – кількісний вміст суми флавоноїдів, мг/мл;

y₂ – кількісний вміст суми поліфенолів, мг/мл;

y₃ – кількісний вміст суми кислот гідроксикоричних, мг/мл;

y₄ – сухий залишок, %.

Технологія одержання витяжок була такою: щавнату траву подрібнювали та заливали у різних співвідношеннях (1 : 5, 1 : 8, 1 : 10, 1 : 12) екстрагентом (етанолом 20, 40, 50 та 70 %) згідно матриці планування.

Оцінювали вплив фармацевтичних факторів (концентрація екстрагенту, співвідношення сировина : екстрагент, метод екстрагування) на ступінь вилучення таких БАР:

- суми флавоноїдів;
- суми поліфенолів;
- суми кислот гідроксикоричних.

Також, визначали кількість одержаного сухого залишку.

Отримані результати були піддані дисперсійному аналізу, який дозволив визначити вплив фармацевтичних факторів на ступінь вилучення БАР із щавнату трави.

На процес екстрагування суми поліфенолів найбільший вплив мав фактор А.

Вплив концентрації екстрагенту на вилучення поліфенолів ілюструється таким рядом переваг: $a_4 > a_3 > a_2 > a_1$, який наведено на рисунку 3.1.

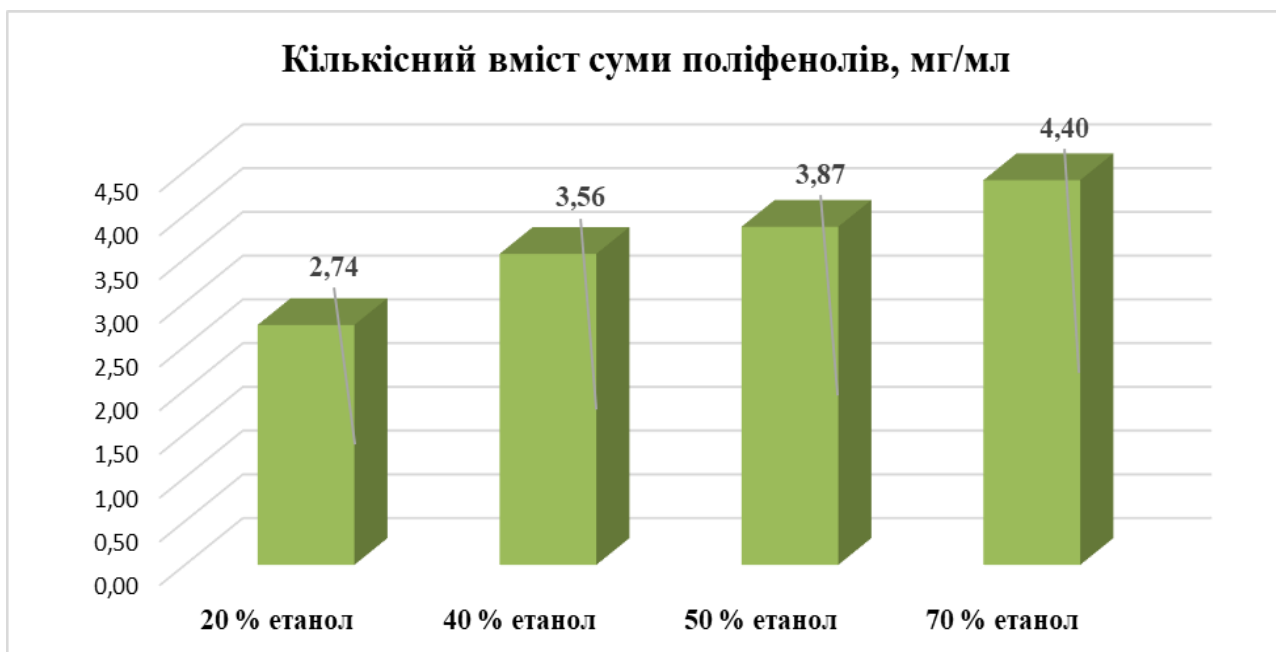


Рисунок. 3.1 – Вплив концентрації екстрагента на ступінь вилучення суми поліфенолів із щавнату трави

Проаналізувавши одержані дані, встановлено, що найбільше суми поліфенолів вилучається при використанні як екстрагенту 70 % етанолу та становить 4,4 мг/мл. При використанні 50 і 40 % етанолу було вилучено із щавнату трави дещо менше поліфенолів – 3,87, і 3,56 мг/мл, відповідно. Найменшу кількість суми поліфенолів екстраговано із досліджуваної ЛРС при використанні 20 % етанолу – 2,74 мг/мл.

Ряд переваг для рівнів фактору В має такий вигляд: $b_1 > b_2 > b_3 > b_4$ (рис. 3.2). Результати дослідження свідчать, що найбільша кількість суми поліфенолів вилучається при співвідношенні сировина : екстрагент – 1:5, і становить 4,3 мг/мл. Співвідношення 1:8 та 1:10 дозволяють вилучити практично однакову кількість суми поліфенолів – 3,67 та 3,5 мг/мл, відповідно. Найменшу кількість суми поліфенолів було екстраговано із щавнату трави при співвідношенні сировина : екстрагент – 1 : 12 (3,10 мг/мл).

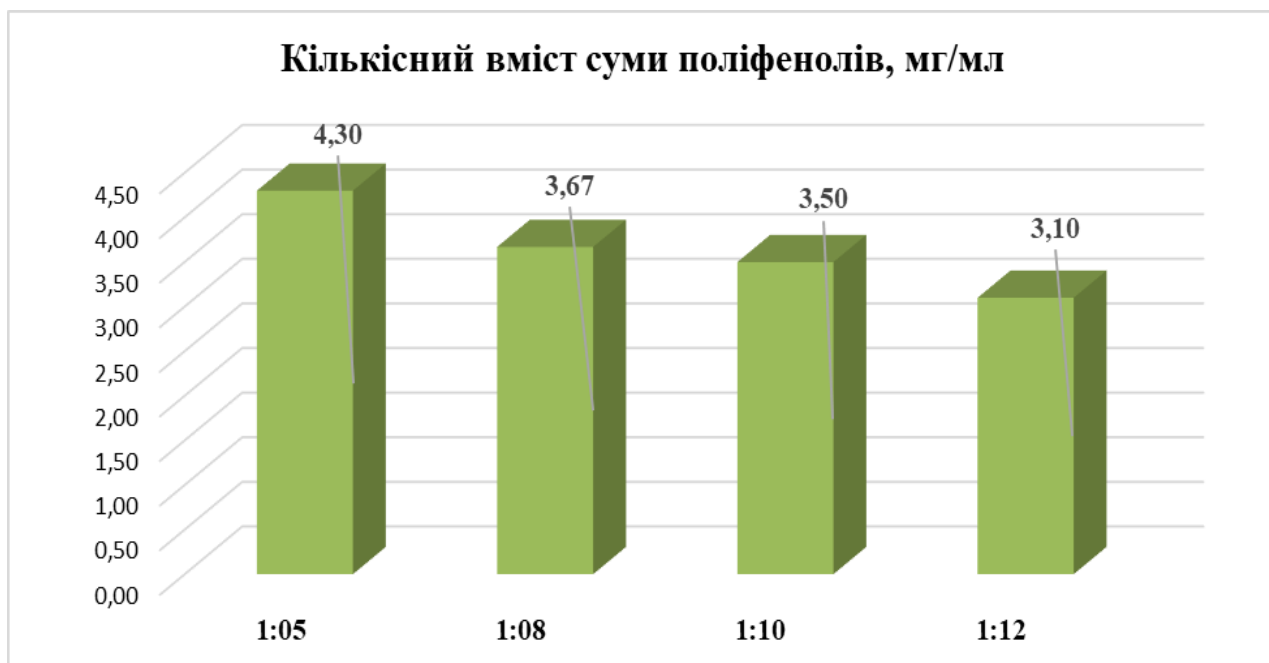


Рисунок. 3.2 – Вплив співвідношення сировина – екстрагент на ступінь вилучення суми поліфенолів із щавнату трави

Вплив рівнів фактору С – методу екстрагування, на ступінь вилучення суми поліфенолів, є незначним (незначущим), він відображений на рисунку 3.3.

Найбільша кількість суми поліфенолів екстрагується при використанні методу мацерації з примусовою подачею екстрагенту (3,73 мг/мл). Практично однакова кількість суми поліфенолів вилучається при використанні мацерації та мацерації з перемішуванням та становить 3,64 та 3,66 мг/мл, відповідно. При ремацерації було виявлено 3,53 мг/мл суми поліфенолів. Ряд переваг для рівнів фактору С має такий вигляд: $c_4 > c_2 > c_1 > c_3$.

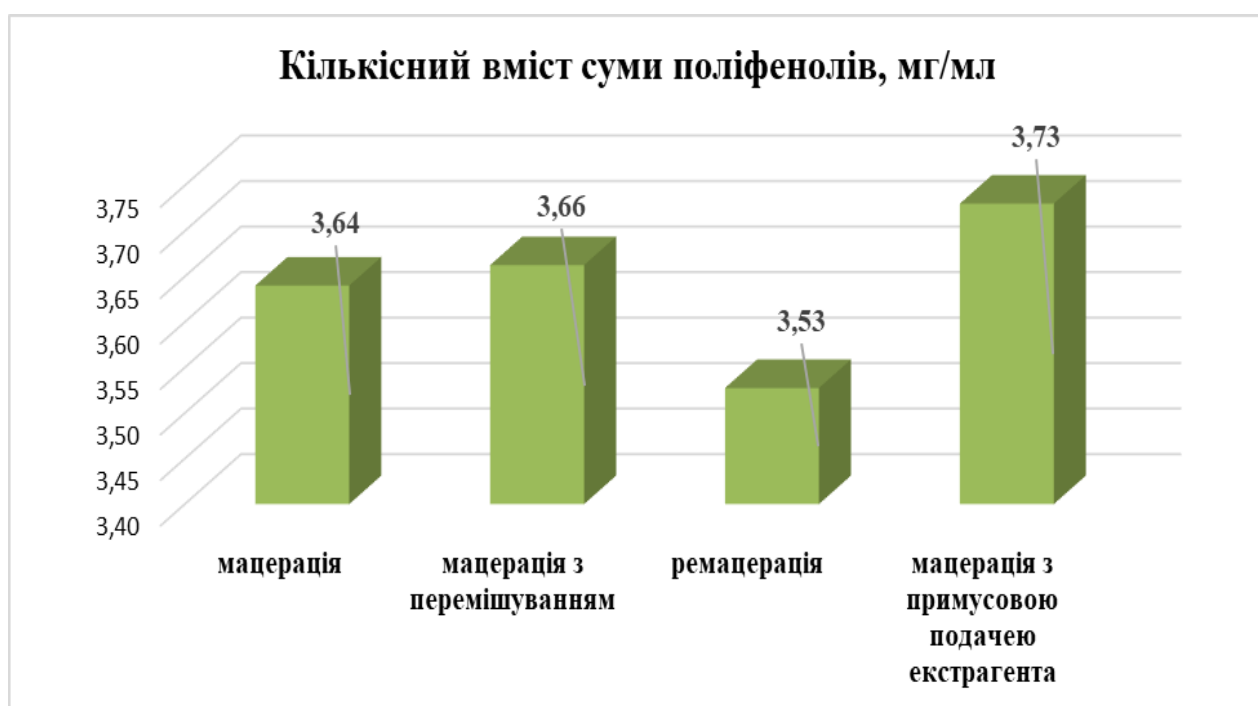


Рисунок. 3.3 – Вплив методу екстрагування на ступінь вилучення суми поліфенолів із щавнату трави

На ефективність екстрагування кислот гідроксикоричних найбільший вплив мав фактор А.

Вплив концентрації екстрагенту на ступінь вилучення суми кислот гідроксикоричних ілюструється таким рядом переваг: $a_3 > a_4 > a_2 > a_1$, який наведено на рисунку 3.4.

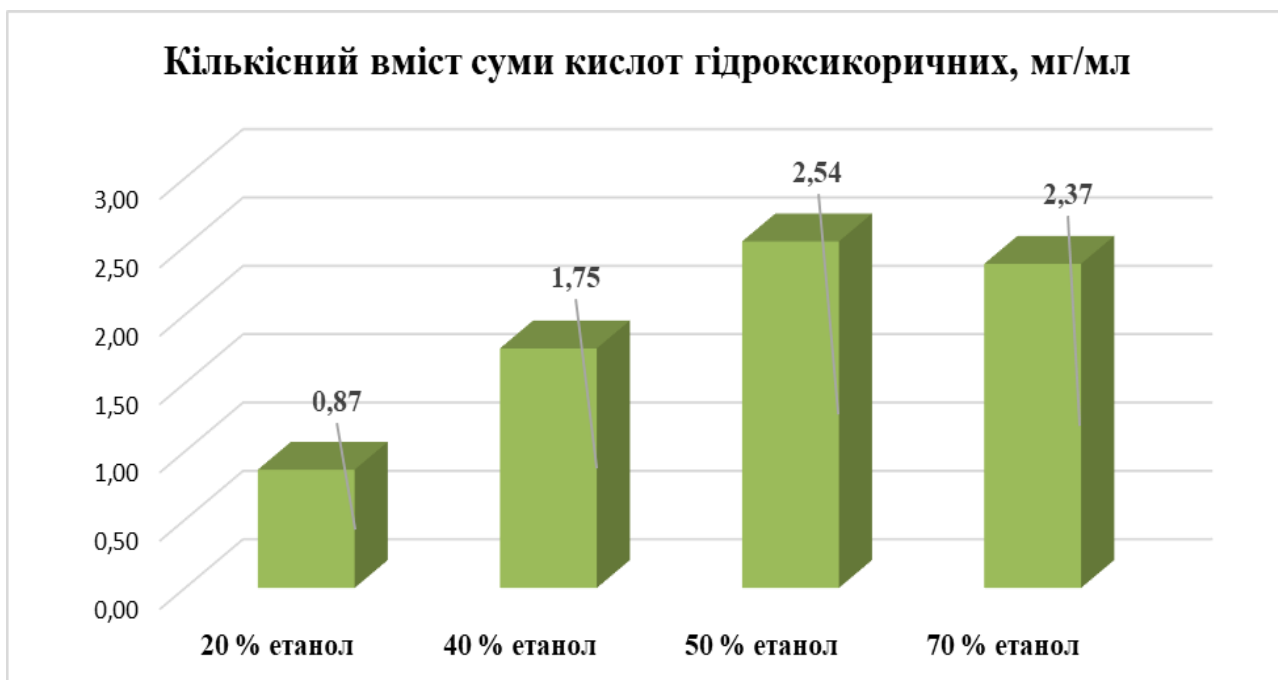


Рисунок. 3.4 – Вплив концентрації екстрагента на ступінь вилучення суми кислот гідроксикоричних із щавнату трави

Проаналізувавши одержані дані, встановлено, що найбільше суми кислот гідроксикоричних вилучається при використанні як екстрагенту 50 % етанолу та становить 2,54 мг/мл. При використанні 70 і 40 % етанолу було вилучено із щавнату трави дещо менша кількість суми кислот гідроксикоричних, їх вміст становив 2,37 і 1,75 мг/мл. Найменшу кількість суми кислот гідроксикоричних було екстраговано із досліджуваної ЛРС при використанні 20 % етанолу (0,87 мг/мл.).

Ряд переваг для рівнів фактору В має такий вигляд: $b_1 > b_2 > b_3 > b_4$ (рис. 3.5). Результати дослідження свідчать, що найбільша кількість суми кислот гідроксикоричних вилучається при співвідношенні сировина : екстрагент – 1:5 (2,18 мг/мл). Співвідношення 1:8 та 1:10 дозволяють вилучити практично однакову кількість суми кислот гідроксикоричних 1,98 та 1,83 мг/мл, відповідно. Найменшу кількість кислот гідроксикоричних екстраговано із щавнату трави при співвідношенні сировина – екстрагент 1 : 12, що становить 1,53 мг/мл.

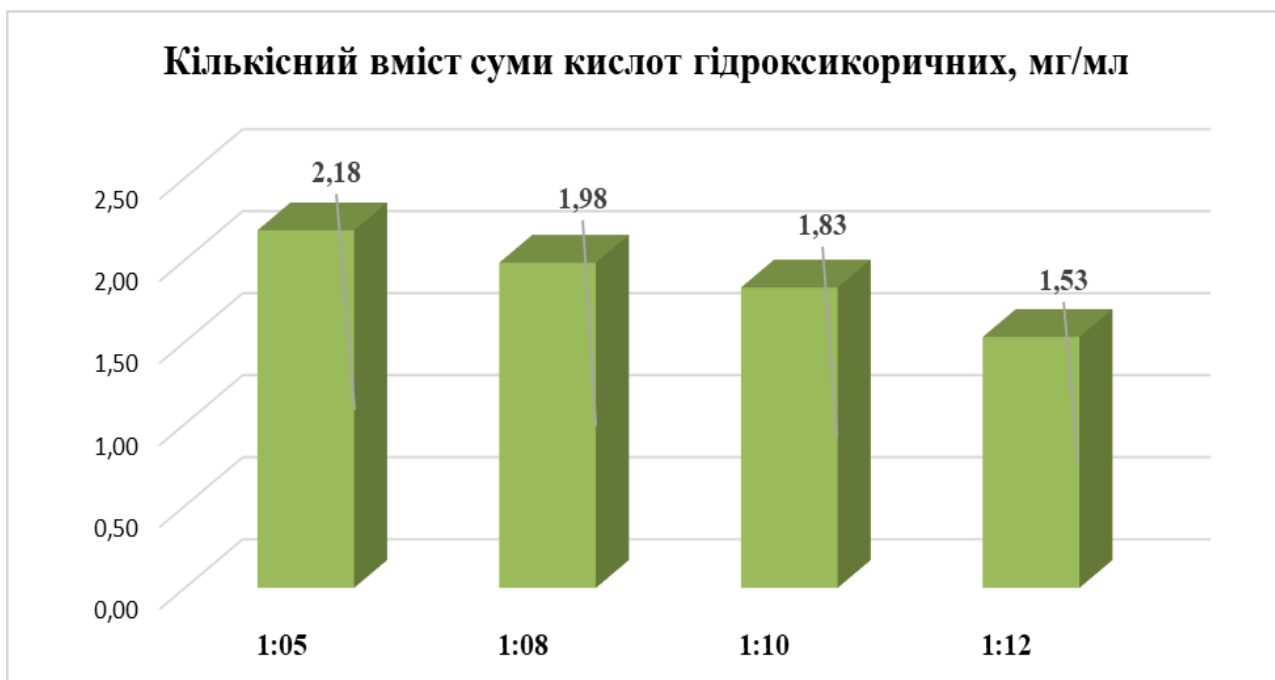


Рисунок. 3.5 – Вплив співвідношення сировина : екстрагент на ступінь вилучення суми кислот гідроксикоричних із щавнату трави

Вплив рівнів фактору С – методу екстрагування, на ступінь вилучення суми кислот гідроксикоричних, є незначним, та наведений на рисунку 3.6.

Дещо більша кількість суми кислот гідроксикоричних екстрагується при використанні мацерації з примусовою подачею екстрагента та становить 2,0 мг/мл. Відповідно, методом ремацерації, була вилучена дещо менша кількість суми кислот гідроксикоричних, що становила 1,97 мг/мл. Практично однакова кількість суми кислот гідроксикоричних вилучається при використанні мацерації та мацерації з перемішуванням та становить – 1,79 та 1,77 мг/мл, відповідно. Ряд переваг для рівнів фактору С має такий вигляд: $c_4 > c_3 > c_2 > c_1$.

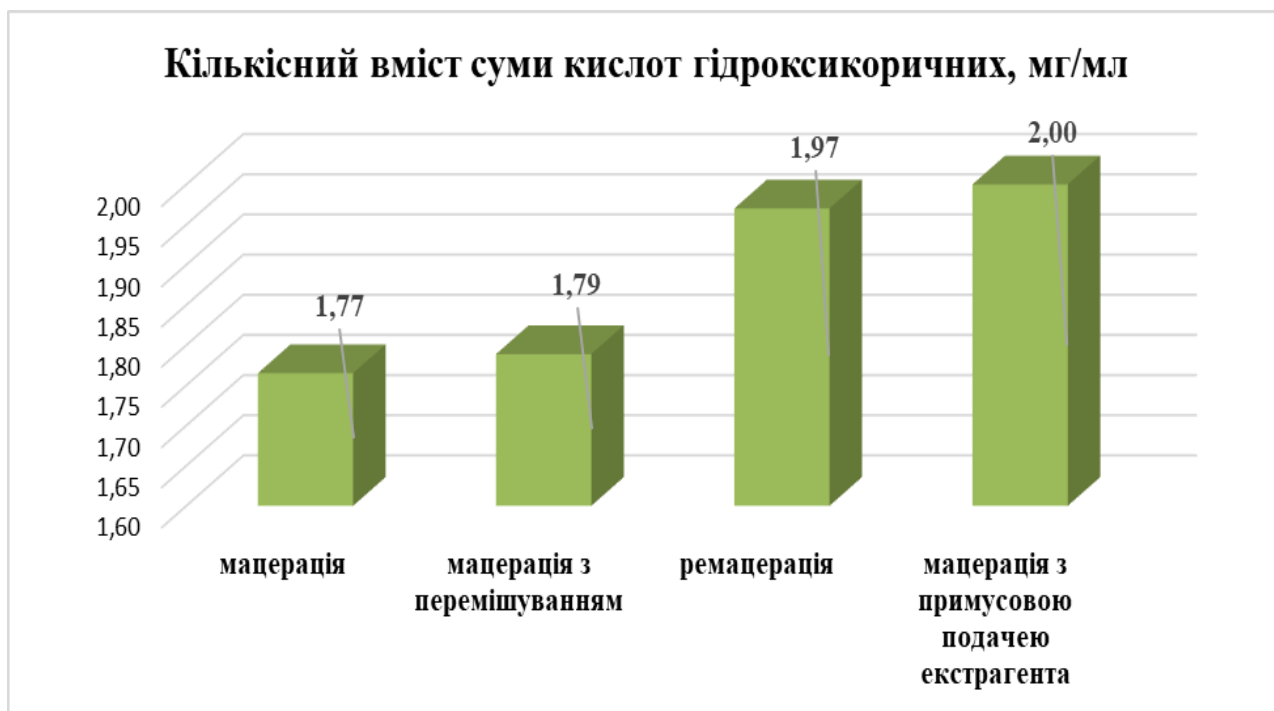


Рисунок. 3.6 – Вплив методу екстрагування на ступінь вилучення суми кислот гідроксикоричних із щавнату трави

Найбільший вплив на ступінь вилучення суми флавоноїдів з надземної частини щавнату має фактор А.

На рисунку 3.7 відображено за допомогою діаграми вплив концентрації екстрагента на ефективність екстрагування суми флавоноїдів. Одержанні дані ілюструє такий ряд переваг: $a_4 > a_3 > a_2 > a_1$. Найбільш ефективним для вилучення суми флавоноїдів, серед досліджуваних екстрагентів, був 70 % етанол, який дозволяв вилучити 2,96 мг/мл досліджуваних БАР. Відповідно, 50 % етанол, дозволив вилучити дещо менше суми флавоноїдів, їх кількість становила 2,79 мг/мл. В 1,31 рази менше суми флавоноїдів екстраговано 40 % етанолом, у порівнянні з 70 % етанолом, і становить 2,42 мг/мл. Найменшу кількість суми флавоноїдів екстраговано 20 % етанолом, їх кількість становить 0,82 мг/мл, що у 3,07 рази менше, у порівнянні з 70 % етанолом.

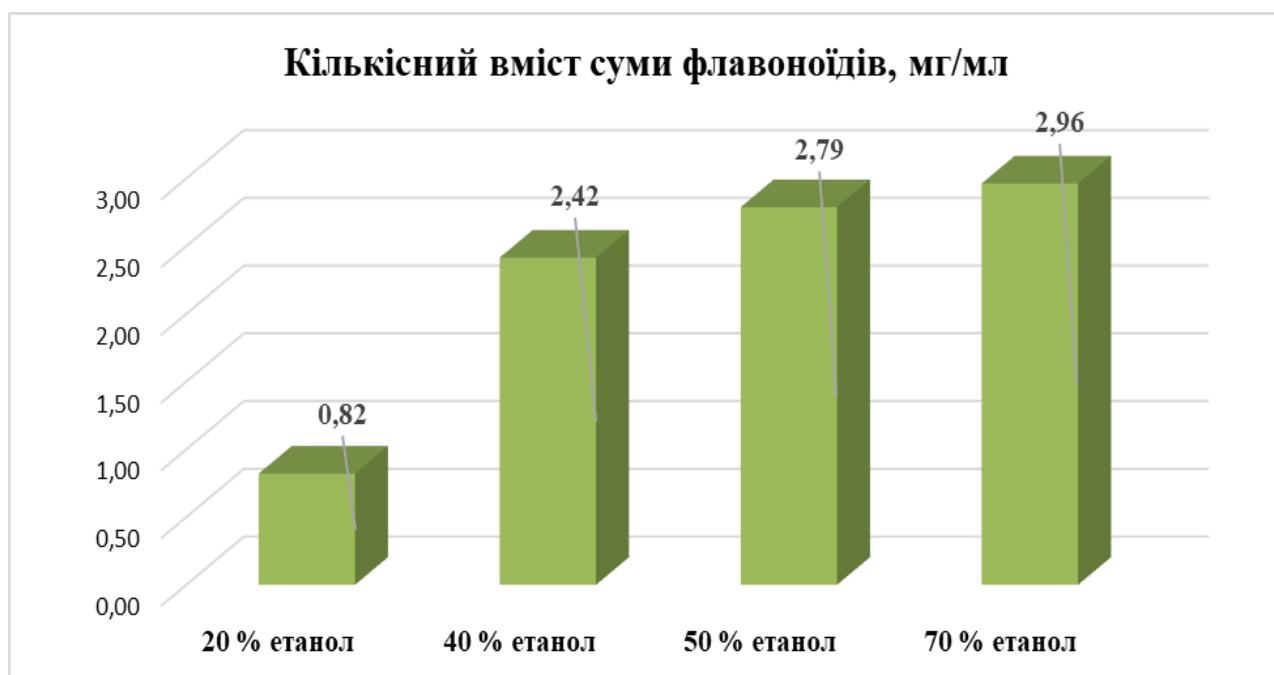


Рисунок. 3.7 – Вплив концентрації екстрагента на ступінь вилучення суми флавоноїдів із щавнату трави

Дослідження впливу рівнів фактору В, а саме співвідношення сировина : екстрагент, наведено на рисунку 3.8.

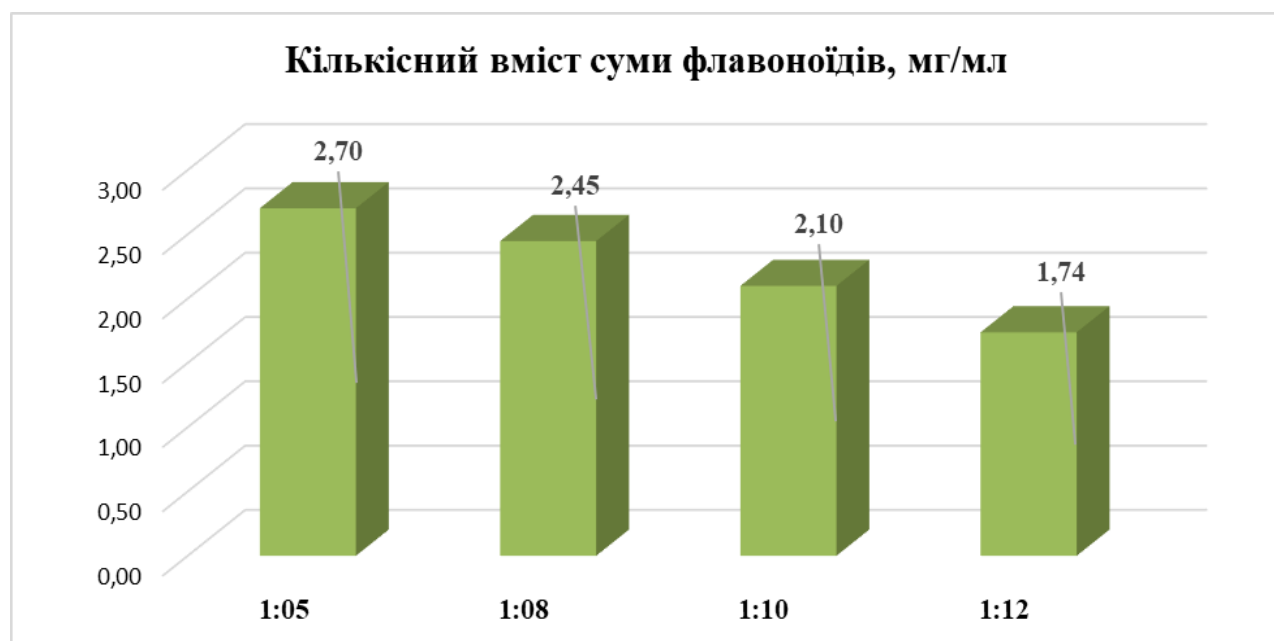


Рисунок. 3.8 – Вплив співвідношення сировина : екстрагент на ступінь вилучення суми флавоноїдів із щавнату трави

Ряд переваг для рівнів цього фактору має такий вигляд: $b_1 > b_2 > b_3 > b_4$. Найбільша кількість флавоноїдів вилучається при співвідношенні сировина – екстрагент 1:5 і становить 2,70 мг/мл. В 1,27 рази менше екстраговано досліджуваних БАР при використанні співвідношення сировина – екстрагент 1:8, вилучається – 2,45 мг/мл. При співвідношенні 1:10 вилучається у 1,39 рази менше флавоноїдів та становить 2,10 мг/мл. Найменше флавоноїдів вилучається при співвідношенні сировина – екстрагент 1:12, їх кількість становить 1,74 мг/мл.

Метод екстрагування має незначний вплив на екстрагування з трави щавнату суми флавоноїдів, їх кількісний вміст коливається у межах 2,15–2,32 мг/мл. Найбільше суми флавоноїдів вилучається при використанні такого методу екстрагування, як мацерація з примусовою подачею екстрагента та становить 2,32 мг/мл. При використанні такого методу екстрагування, як мацерація, екстраговано найменшу кількість досліджуваних БАР – 2,15 мг/мл. Результати дослідження впливу методу екстрагування відображено на рисунку 3.9.

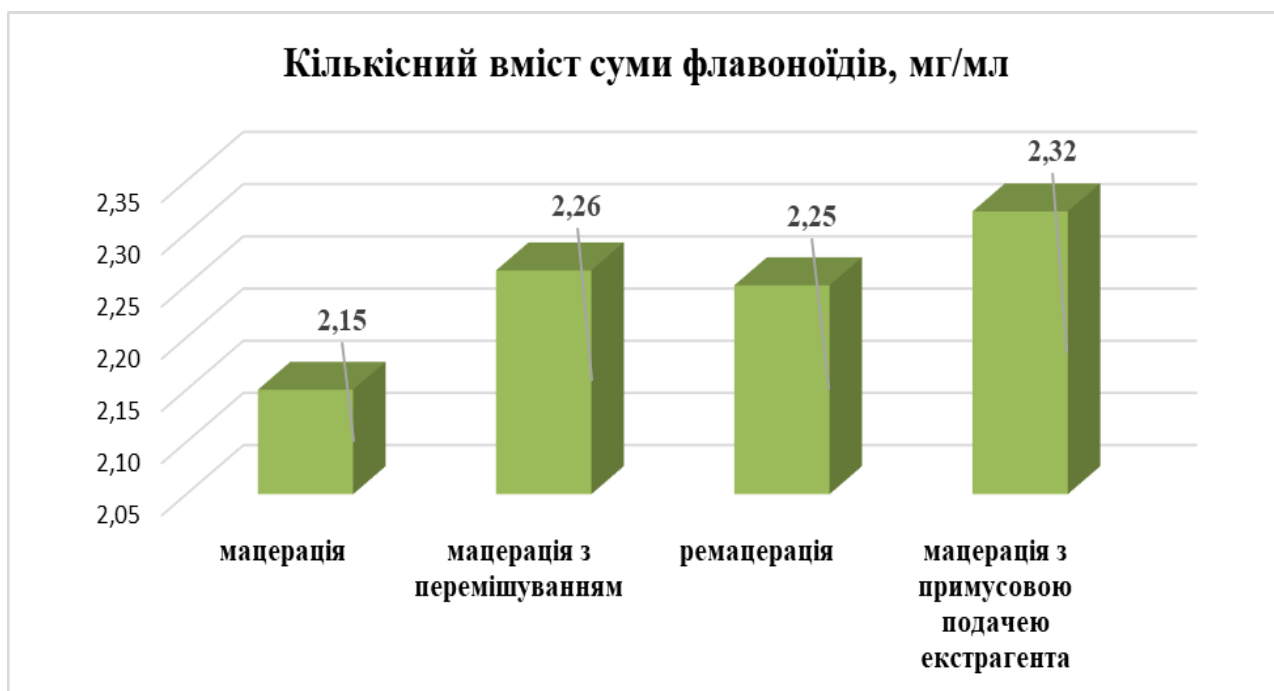


Рисунок. 3.9 – Вплив методу екстрагування на ступінь вилучення суми флавоноїдів із щавнату трави

На кількість одержаного сухого залишку із витяжок щавнату трави найбільше впливає фактор В.

Ряд переваг для рівнів фактора В наведено на рисунку 3.10 і має такий вигляд: $b_1 > b_2 > b_3 > b_4$. Одержані результати свідчать про те, що найбільшу кількість сухого залишку отримано при співвідношенні сировина : екстрагент – 1:5, вона становить 1,59 %. Співвідношення 1:8 дозволяє одержати 1,23 % сухого залишку, співвідношення 1:10 – 1,0 %, а співвідношення 1:12 – 0,93 %, що у 1,29, 1,59 та у 1,7 рази менше, ніж при співвідношенні сировина : екстрагент – 1:5.

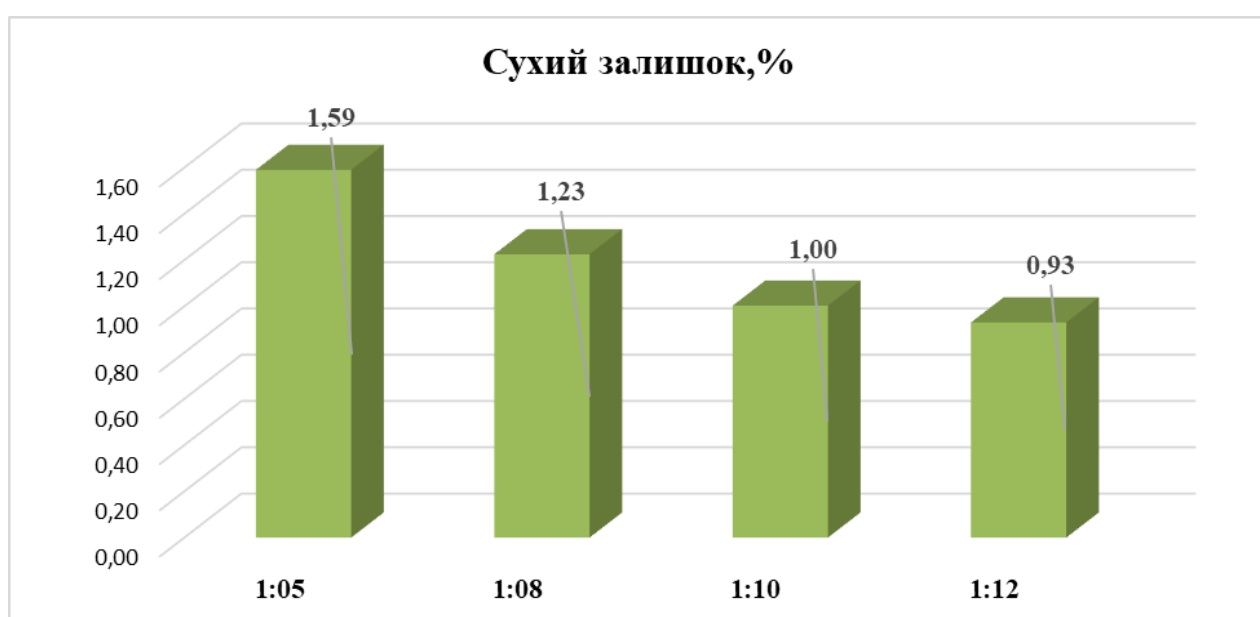


Рисунок. 3.10 – Вплив співвідношення сировина : екстрагент на кількість одержаного сухого залишку з щавнату трави

Вплив концентрації екстрагента на кількість отриманого сухого залишку із витяжок наведено на рисунку 3.11, його ілюструє такий ряд переваг: $a_2 > a_3 > a_4 > a_1$.

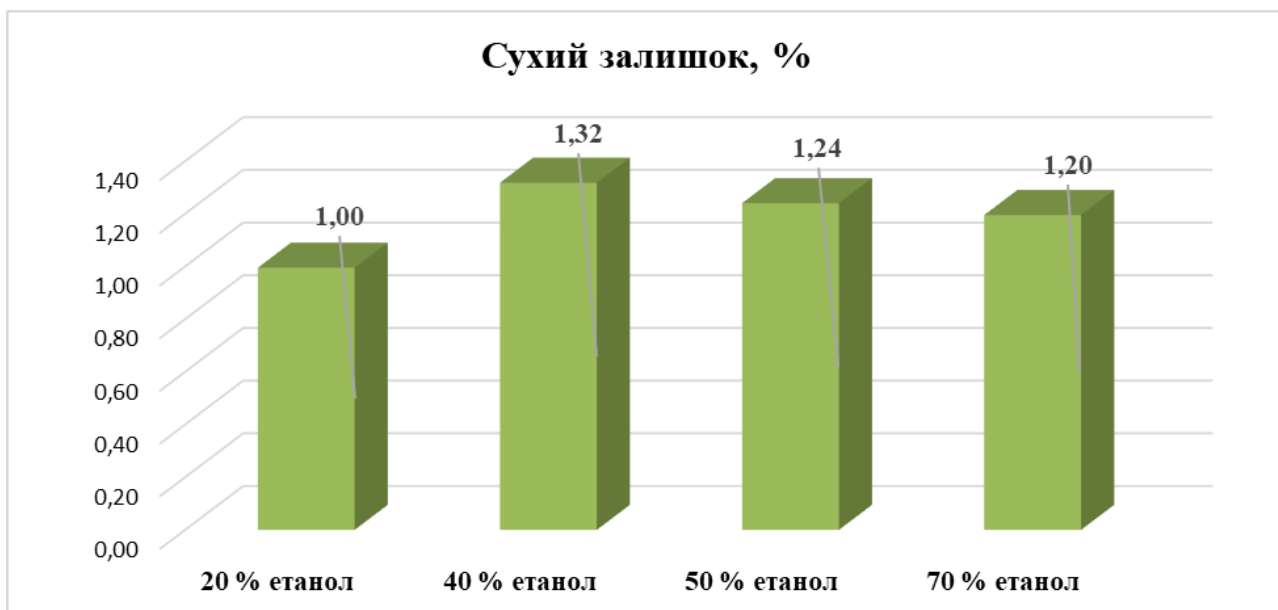


Рисунок 3.11 – Вплив концентрації екстрагента на кількість одержаного сухого залишку з щавнату трави

Найкраще серед рівнів фактору А проявив себе, як екстрагент, 40 % етанол. Це дозволило отримати 1,32 % сухого залишку із витяжки. Використовуючи 50 та 70 % етанол одержано витяжки, у яких кількість сухого залишку становить 1,24 і 1,2 %, відповідно. Найменша кількість одержаного сухого залишку вилучена 20 % етанолом та становить 1,0 %.

На рисунку 3.12 наведено результати визначення впливу методу екстрагування на кількість одержаного сухого залишку із витяжок щавнату трави. Згідно одержаних даних, можна зробити висновок, що метод екстрагування практично не впливає на кількість одержаного сухого залишку із витяжок щавнату трави, він коливається у межах 1,16-1,21 %.

Згідно одержаних результатів, дещо більшу кількість сухого залишку отримано при використанні такого методу екстрагування як мацерація з перемішуванням, що становить 1,21 %.

Використання таких методів, як мацерація з примусовою подачею екстрагента та мацерація, забезпечує одержання близьких значень кількостей отриманих сухих залишків і становить 1,20 та 1,19 %, відповідно.

Найменшу кількість сухого залишку (1,16 %) було одержано із витяжки отриманої методом ремацерації.

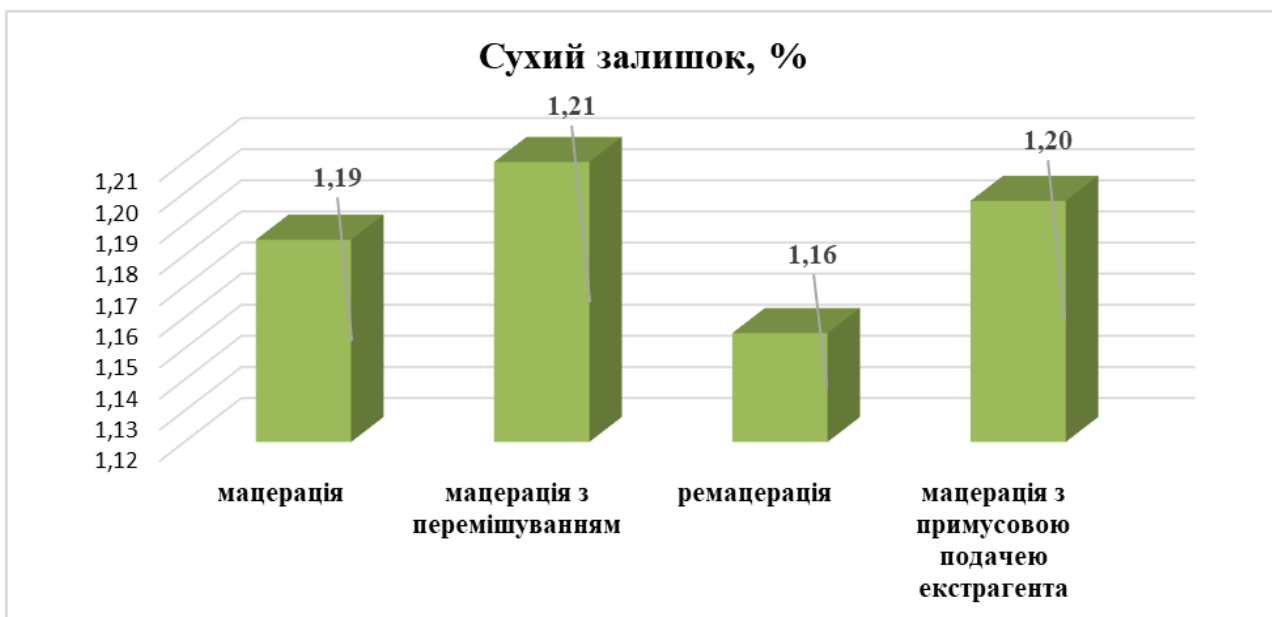


Рисунок. 3.12 – Вплив методу екстрагування на кількість одержаного сухого залишку з щавнату трави

3.2 Якісний склад та кількісний вміст індивідуальних сполук флавоноїдів у витяжці з щавнату трави

Проаналізувавши результати визначення кількісного вмісту суми БАР у 16 серіях витяжок щавнату трави і кількість одержаного сухого залишку, встановлено, що оптимальним екстрагентом є 70 % етанол, метод екстрагування – мацерація з примусовою подачею екстрагента, співвідношення сировина : екстрагент – 1: 5.

Із врахуванням вищевказаних факторів одержано витяжку, у якій встановлювали якісний склад та визначали кількісний вміст індивідуальних сполук флавоноїдів методом ВЕРХ. Результати проведеного дослідження представлено на рисунку 3.13 і в таблиці 3.3.

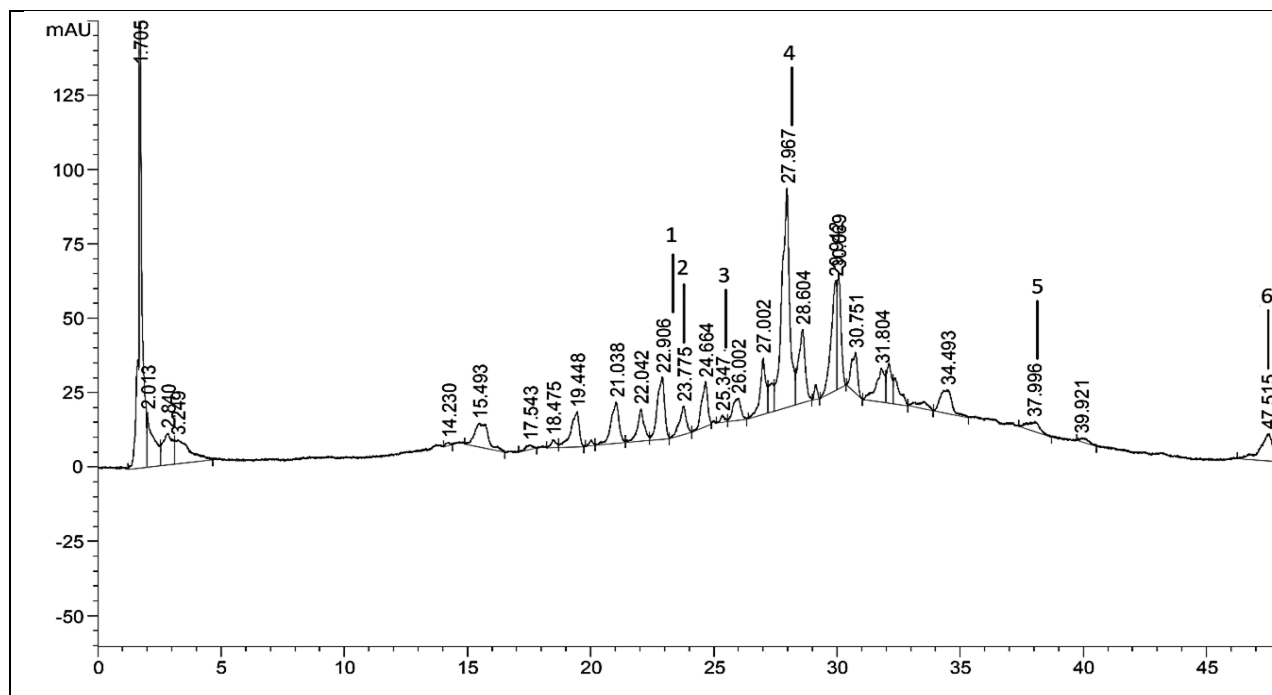


Рисунок. 3.13 – ВЕРХ-хроматограма флавоноїдів витяжки щавнату трави:
 1 – рутин, 2 – кверцетин-3-*O*- β -*D*-глюкозид, 3 – кемпферол-3-*O*- β -*D*-глюкозид, 4
 – неогесперидин, 5 – нарінгенін, 6 – кемпферол

Таблиця 3.3 – Якісний склад та кількісний вміст індивідуальних сполук
 флавоноїдів витяжки щавнату трави

Назва сполуки	Кількісний вміст, мг/мл	Кількісний вміст, %*
Рутин	0,264	16,84
Кверцетин-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> - глюкозид	0,028	1,79
Кемпферол-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> - глюкозид	0,005	0,32
Неогесперидин	1,12	71,43
Нарінгенін	0,089	5,68
Кемпферол	0,062	3,95
Всього	1,568	100
Примітка: * – від загального вмісту всіх ідентифікованих флавоноїдів		

Методом ВЕРХ встановлено якісний склад та визначено кількісний вміст неогесперидину, рутину, нарінгеніну, кемпферолу, кверцетин-3-*O*- β -*D*-глюкозиду, кемпферол-3-*O*- β -*D*-глюкозиду. Кількісний вміст усіх виявлених індивідуальних сполук флавоноїдів становив 1,57 мг у мл витяжки.

В одержаній витяжці не виявлено нарінгіну, кверцетину, лютеоліну, фісетину, силібініну, байкалеїну, рамнетину та кастицину.

Висновки до розділу 3

1. Досліджено вплив фармацевтичних факторів на ступінь вилучення БАР з щавнату трави. Встановлено, що процес екстракції залежить від різних факторів: концентрація екстрагента, співвідношення сировина : екстрагент, методу екстрагування.

2. Найбільший вплив на ступінь вилучення суми поліфенолів, суми флавоноїдів та суми кислот гідроксикоричних мала концентрація екстрагенту. Найбільшу кількість суми поліфенолів та суми флавоноїдів вилучено при використанні в якості екстрагента 70 % етанолу, суми гідроксикоричних кислот – 50 % етанолу.

3. Оптимальним співвідношенням ЛРС та екстрагенту, при якому вилучається найбільша кількість суми поліфенолів, суми флавоноїдів, суми кислот гідроксикоричних, одержано найбільшу кількість сухого залишку є 1 : 5.

4. Метод мацерації з примусовою подачею екстрагента виявився найефективнішим, із вивчених методів, для максимального вилучення як суми поліфенолів, суми флавоноїдів, суми кислот гідроксикоричних, так і для отримання найбільшої кількості сухого залишку.

5. Методом ВЕРХ виявлено у витяжці такі флавоноїди: неогесперидин (1,12 мг/мл), рутин (0,264 мг/мл), нарінгенін (0,089 мг/мл), кемпферол (0,062 мг/мл), кверцетин-3-*O*- β -*D*-глюкозид (0,028 мг/мл), кемпферол-3-*O*- β -*D*-глюкозид (0,005 мг/мл).

ВИСНОВКИ

1. На підставі проведеного аналізу джерел літератури встановлено, що виведені сорти щавнату є цінним джерелом багатьох біологічно активних речовин та можуть використовуватися у медичній та фармацевтичній практиках.

2. На основі проведеного дисперсійного аналізу досліджено вплив методу екстрагування, концентрації екстрагента, співвідношення сировина : екстрагент на кількість одержаного сухого залишку, ступінь вилучення біологічно активних речовин із щавнату трави – суми поліфенолів, суми флавоноїдів, суми кислот гідроксикоричних. Встановлено, що оптимальним методом є мацерація з примусовою подачею екстрагента, екстрагент – 70 % етанол, співвідношення сировина : екстрагент – 1 : 5.

3. Методом ВЕРХ встановлено якісний склад та визначено кількісний вміст індивідуальних сполук флавоноїдів у витяжці щавнату трави. Серед них домінував неогесперидин, його вміст становив 1,12 мг/мл (71,43 % від загальної кількості виявлених флавоноїдів).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Лікарські рослини і трави в народній медицині [Електронний ресурс]. URL: <http://www.infoherbs.ru/ukr> (дата звернення: 15.11.2023). Назва з екрану.
2. Шостак Т. А., Калинюк Т. Г., Гудзь Н. І. Застосування рослинних субстанцій в якості активних фармацевтичних інгредієнтів. *Фітотерапія*. 2014. №3. С. 63-65.
3. Гудзенко А. В., Цуркан О. О., Ковальчук Т. В. Реалізація сучасних підходів до стандартизації полікомпонентних фітопрепаратів. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2012. Т. 30, № 5. С. 99-106.
4. Budniak L., Slobodianiuk L., Marchyshyn S., Plashchuk P. Determination of polysaccharides in *Gentiana cruciata* L. herb. *Pharmacologyonline*. 2021. № 2. P. 1473-1479.
5. Budniak L., Slobodianiuk L., Marchyshyn S., Parashchuk E. Determination of carbohydrates in burnet saxifrage (*Pimpinella saxifraga* L.). *Pharmacologyonline*. 2021. № 2. С. 1374-1382.
6. Marchyshyn S., Slobodianiuk L., Budniak L., Ivasiuk I. Hypoglycemic effect of *Cyperus esculentus* L. tubers extract. *Pharmacologyonline*. 2021. № 2. P. 1383-1392.
7. Slobodianiuk L., Budniak L., Marchyshyn S., Kostyshyn L., Ezhned M. Determination of amino acids content of the *Tagetes lucida* Cav. by GC/MS. *Pharmacia*. 2021. Т. 68, № 4. P. 859-867. doi: 10.3897/pharmacia.68.e73325.
8. Кобзар А. Фармакогнозія в медицині: навч. посібник. Київ: Медицина, 2007. 544 с.
9. Гойко І. Ю. Перспективи розроблення фітоекстрактів з лікарської рослинної сировини антиоксидантної дії. У: Лікарське рослинництво: від досвіду минулого до новітніх технологій: матеріали третьої Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції. Полтава, 2014. С. 102-105
10. Рахметов Д., Рахметова С. Нова ультрарання культура комплексного використання. *Пропозиція*. 2008. №3. С. 62-70. URL:

<https://propozitsiya.com/ua/nova-ultrarannya-kultura-kompleksnogo-vikoristannya>
(дата звернення: 21.12.2023).

11. Щавнат – подвійний ефект: продуктивна та невибаглива культура. *Ogorodnik.com*. URL: <https://www.ogorodnik.com/articles/shchavnat-podviynnyu-efekt-produktyvna-ta-nevybaglyva-kultura> (дата звернення: 07.06.2024).

12. Рахметов Д. Б., Рахметова С. О. Сортове різноманіття щавнату (*Rumex patientia* L. *Rumex tianshanicus* A. Los.) та напрями його використання. *Інтродукція рослин*. 2006. № 1. С. 11–16.

13. Бажай-Жежерун С. А., Рахметов Д. Б. Харчова цінність щавнату. *Харчова промисловість*. 2014. № 16. С. 15-19. URL: http://ir.polissiauniver.edu.ua/bitstream/123456789/9026/1/Nauk_chyt_2017_191-195.pdf (дата звернення: 21.12.2023).

14. Марчишин С. М., Жияєва С. М., Слободянюк Л. В., Кравчук Л. О. Дослідження амінокислотного складу сировини щавнату методом газової хромато-мас-спектрометрії. *Медична та клінічна хімія*. 2023. Т. 25, № 3. Відтворено з: https://www.researchgate.net/publication/347648480_doslidzenna_aminokislotnogo_skladu_sirovini_matioli_dvorogoi_matthiola_bicornis_sibth_sm_dc_sortu_carica_no_si (дата звернення: 21.12.2023).

15. Марчишин С. М., Жияєва С. М., Кравчук Л. О. Визначення вмісту жирних кислот у сировині щавнату. У: *Хімія природних сполук: матеріали VI Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю (м. Тернопіль, 27-28 жовтня 2022 р.)*. Тернопіль: ТНМУ, 2022. С. 52. Відтворено з: <https://www.researchgate.net/profile/Roman-Lysiuk/publication/365186233> (дата звернення: 21.12.2023).

16. Макух Х. І. Клініко-фармацевтичне обґрунтування моделі раціональної фітотерапії в охороні здоров'я України: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. фарм. наук: 15:00:01. Львів, 2013. 24 с.

17. Щавнат. Інформаційно-аналітична система "Аграрії разом". URL: <https://agrarii-razom.com.ua/culture/shavnat> (дата звернення: 18.05.2024).

18. Марчишин С. М., Будняк Л. І., Слободянюк Л. В., Костишин Л. В. Встановлення оптимального режиму екстрагування сапонінів та поліфенолів з трави мильнянки лікарської методом дисперсійного аналізу. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. 2023. № 1. С. 128-135.
19. Гойко І. Ю. Перспективи розроблення фітоекстрактів з лікарської рослинної сировини антиоксидантної дії. Лікарське рослинництво: від досвіду минулого до новітніх технологій: матеріали III Міжнар. наук.-практ. інтернет конф., Полтава, 15–16 травня 2014 р. Полтава, 2014. С. 102-105.
20. Васенда М. М. Дослідження процесу екстракції флаваноїдів з перетинок грецького горіха / Ю. Ю. Шилан, О. І. Онишків. *Актуальні наукові дослідження в сучасному світі. Зб. наук. праць*. Переяслав-Хмельницький, 2017. Вип. 5(25), ч. 3. С. 145.
21. Павлюк І. В., Стадницька Н. Є., Новіков В. П. Дослідження кінетики екстрагування флаваноїдів зі шроту шишок хмелю. *Східно-Європейський журнал передових технологій*. 2015. № 77. С. 36-41.
22. Павлюк І. В., Стадницька Н. Є. Оптимізація умов технологічного процесу переробки шроту *Origanum vulgare*, *Daucus carota*, *Humulus lupulus*. *Вісник НУ "Львівська політехніка"*. 2015. № 812. С. 251–256.
23. Промислова технологія лікарських засобів: базовий підручник для студентів вищих навчальних фармацевтичних закладів (фармацевтичних факультетів та медичних університетів) / [ред. Гладух Є. В., Рубан О. А., Сайко І. В.]. Харків: Вид-во НФаУ, 2018. 688 с.
24. Марчишин С. М., Стойко Л. І., Покотило О. О. Дослідження хімічного складу деяких рослин родини *Gentianaceae*. *Медична та клінічна хімія*. 2017. № 3. С. 23-28.
25. Марчишин С. М., Стойко Л. І. Визначення фенольних сполук у траві *Centaureum erythraea* Rafn. методом ВЕРХ. *Фармацевтичний часопис*. 2014. № 1. С. 15–17.

26. Грошовий Т.А., Марценюк В.П., Кучеренко Л.І., Вронська Л.В., Гуреєва С.М. Математичне планування експерименту при проведенні наукових досліджень в фармації. Тернопіль: ТДМУ «Укрмедкнига», 2008. 368 с.
27. Державна Фармакопея України: в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид., Т. 1. Харків: Держ. п-во «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. 1128 с.
28. Pyrzynska K., Sentkowska A. Chromatographic Analysis of Polyphenols. *Polyphenols in Plants*. Academic Press, 2019. С. 353-364.
29. Шалата В. Я., Сур С. В. Вивчення технологічних властивостей багатокомпонентної лікарської рослинної сировини. *Запорізький медичний журнал*. 2012. № 2. С. 111-115.
30. Гарна С. В., Ветров П. П., Русинов О. І., Георгіянц В. А. Оптимізація технології екстракції ліпофільних комплексів з лікарської рослинної сировини. *Запорожский медицинский журнал*. 2010. Т. 12, № 3. С. 92-94.
31. Полова Ж. М., Попович В. П., Глуховський П. В. Використання нанорозмірних мікроелементів як активних складових косметичних препаратів. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2012. № 1 (8). С. 74-77.
32. Власенко В. В., Бандура В. М., Коляновська Л. М. Інтенсифікація екстрагування в технології виробництва рослинних олій. Вінниця: РВВ ВНАУ, 2016. 203 с.
33. Екстракція рослинної сировини / І. Ю. Сидоров, І. І. Губицька, Р. Т. Конечна, В. П. Новіков. Львів: Видавництво Національного університету «Львівська політехніка», 2008. 334 с.
34. Ройко О. М., Арсеньєва Л. Ю., Ройко О. Ю., Паламарчук О. П. Обґрунтування та розробка технології екстрактів на основі функціональної фітокомпозиції «Антистрес» адаптогенного призначення. *Вчені записки ТНУ імені В. І. Вернадського*. 2019. Т. 30 (69), ч. 2, № 4. С. 111–116.

35. Крюкова А. І., Коноваленко І. С., Владимірова І. М., Тарасенко В. О. Розробка технології отримання та дослідження екстракту сухого зі збору аналгетичної та протизапальної активності. *Український журнал військової медицини*. 2022. № 3. С. 68–79.
36. Будняк Л., Михайлюк Т., Михайлюк О. Визначення вмісту поліфенолів і флавоноїдів у витяжках із трави щавнату. *Фітотерапія. Часопис*. 2023. № 4. С. 101-105. doi: 10.32782/2522-9680-2023-4-101.
37. Mykhailiuk T., Budniak L., Mykhailiuk O. Study of the influence of technological factors on the content of flavonoids in the extracts of *Rumex patientia* L. × *Rumex tianschanicus* Losinsky herb. *International independent scientific journal*. 2024. No. 62. P. 18-21.

ДОДАТКИ