

ISSN 2414-9195

ФАРМАКОМ

науково-практичний журнал

ЛІКАРСЬКІ ЗАСОБИ

- наука

- технологія

- якість

- стандартизація

4
2019

Редакційна колегія

Головний редактор — Леонтєв Д. А., д. фарм. н.

Заступник

головного редактора — Воловик Н. В., к. фарм. н.

Члени редакційної колегії:

Безугла О. П., к. фарм. н., ст. н. с. (Україна)
Блажеєвський М. Є., д. х. н., професор (Україна)
Васюк С. О., д. фарм. н., професор (Україна)
Гризодуб О. І., д. х. н., професор (Україна)
Гудзенко О. П., д. фарм. н., професор (Україна)
Керимов Ю. Б., д. фарм. н., професор (Азербайджан)
Коваленко С. І., д. фарм. н., професор (Україна)
Котов А. Г., д. фарм. н., ст. н. с. (Україна)
Кошовий О. М., д. фарм. н., доцент (Україна)
Краснопольський Ю. М., д. фарм. н. (Україна)
Кресюн В. Й., д. мед. н., професор (Україна)
Маслова Н. Ф., д. б. н., професор (Україна)
Півень О. П., д. фарм. н. (Україна)

- Науково-практичний журнал ФАРМАКОМ видається із серпня 1992 року. Свідоцтво про реєстрацію КВ № 21361-11161ПР від 09.06.2015.
- Засновники: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», м. Харків, Державне підприємство «Державний науковий центр лікарських засобів і медичної продукції», Запорізький державний медичний університет.
- Передплата — редакційна (розсилання рекомендованими листами).
- Матеріали публікуються українською, російською та англійською мовами (змішані мови).
- Журнал включено до переліку видань, в яких можуть публікуватись основні результати дисертаційних робіт.

ISSN 2414-9195



9 772414 919001 15

- Адреса редакції: ФАРМАКОМ, ДП «Фармакопейний центр», вул. Астрономічна, 33, Харків, 61085, тел. +380 (67) 716 04 04, +380 (99) 180 06 01 (бух.). E-mail: pharmacomeditor@gmail.com.
- <http://sphu.org>.
- Повне або часткове передрукування матеріалів журналу можливе тільки за письмовим дозволом редакції.

Зміст

До введення у дію Державної Фармакопеї України

Котов А. Г., Юрченко Т. В., Котова Е. Е.

Питання введення до Державної Фармакопеї України національної монографії «Барвінку трава» 5

Котов А. Г., Суворова І. М., Тимченко О. В., Останіна Н. В.

Питання введення до Державної Фармакопеї України нової редакції статті «Дієтичні добавки» 10

Кишинець Н. В., Тимченко О. В., Котляр В. О., Меркулова Ю. В., Яворський В. В., Малігон О. І., Безбородова І. А., Кононюк Ю. В., Мойсеєнко М. О.

«Плазма для лабораторної діагностики *in vitro*» — нова національна індивідуальна монографія Державної Фармакопеї України..... 16

Фітохімічні дослідження

Сас І. А.

Дослідження седативної активності екстрактів видів роду Буквиця — *Betonica* (L.) 23

Фармакологічні дослідження

Крусір Г. В., Бельтюкова С. В., Лівенцова О. О., Прилуцький В. П.

Виділення та фізико-хімічні властивості протеази насіння томатів..... 28

Старченко Г. Ю.

Гістологічне дослідження мигдалеподібного комплексу мишей після введення екстрактів *Calluna vulgaris* L. (Hull.) 36

-
- Рецензенти: д. фарм. н., проф. Гонтова Т. М.; д. х. н., проф. Гризодуб О. І.; к. б. н. Деєва Т. В.; к. мед. н. Іваночко В. М.; д. фарм. н. Краснопольський Ю. М.; д. б. н., проф. Маслова Н. Ф.; к. мед. н. Чутрієв А. М.; д. фарм. н. Котов А. Г.
 - Випуск підготували: Воловик Н. В., Саматов Р. С., Боярська В. О., Лук'янова І. С., Лук'янова О. С.
 - Підписано до друку 26.12.19. Тираж 500 прим.

Content

To the introduction into the State Pharmacopoeia of Ukraine

Kotov A. G., Yurchenko T. V., Kotova E. E.

Issues of the introduction of the national monograph
«*Vinca minor*» into the State Pharmacopoeia of Ukraine 5

Kotov A. G., Suvorova I. M., Tymchenko O. V., Ostanina N. V.

Issues of the introduction of a new edition of the article
«Food supplements» into the State Pharmacopoeia of Ukraine 10

Kyshynets N. V., Tymchenko O. V., Kotlyar V. O.,

Merkulova Yu. V., Yavorskyi V. V., Malyhon O. I.,

Bezborodova I. A., Kononyuk Yu. V., Moyseyenko M. O.

A new national individual monograph

«Plasma for Laboratory Diagnostics *in vitro*» of the State Pharmacopoeia of Ukraine..... 16

Phytochemical studies

Sas I. A.

Research of the sedative activity
of extracts of the genus *Betonica* (L.) species 23

Pharmacological studies

Krusir G. V., Belyukova S. V., Liventsova O. O., Prylutskyi V. P.

Isolation and physicochemical properties of tomato seed protease..... 28

Starchenko G. Yu.

Histological examination of the almond-shaped mouse complex
after administration of extracts from *Calluna vulgaris* L. (Hull.) 36

Содержание

К введению в действие Государственной Фармакопеи Украины

Котов А. Г., Юрченко Т. В., Котова Э. Э.

Вопросы введения в Государственную Фармакопею Украины национальной монографии «Барвинка трава» 5

Котов А. Г., Суворова И. Н., Тимченко О. В., Останина Н. В.

Вопросы введения в Государственную Фармакопею Украины новой редакции статьи «Диетические добавки» 10

Кишинец Н. В., Тимченко О. В., Котляр В. А.,

Меркулова Ю. В., Яворский В. В., Малигон О. И.,

Безбородова И. А., Кононюк Ю. В., Мойсеенко М. А.

«Плазма для лабораторной диагностики *in vitro*» — новая национальная индивидуальная монография Государственной Фармакопеи Украины 16

Фитохимические исследования

Сас И. А.

Исследование седативной активности экстрактов видов рода Буквица — *Betonica* (L.) 23

Фармакологические исследования

Крусир Г. В., Бельтюкова С. В., Ливенцова Е. О., Прилуцкий В. П.

Выделение и физико-химические свойства протеазы семян томатов 28

Старченко Г. Ю.

Гистологическое исследование миндалевидного комплекса мышей после введения экстрактов *Calluna vulgaris* L. (Hull.) 36

До введення у дію Державної Фармакопеї України

УДК 615.11 : 615.322

Котов А. Г., Юрченко Т. В., Котова Е. Е.

Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», Харків, Україна

Питання введення до Державної Фармакопеї України національної монографії «Барвінку трава»

Метою дослідження була розробка національної фармакопейної монографії «Барвінку трава». Проведено порівняльний аналіз підходів до стандартизації якості барвінку малого трави. Досліджено 5 серій сировини б. малого трави різних виробників України на відповідність вимогам нормативних документів. Усі випробовувані зразки продемонстрували відповідність вимогам Французької Фармакопеї та специфікацій виробників. Для ідентифікації методом тонкошарової хроматографії розроблена методика, гармонізована з вимогами специфікацій виробників, з використанням стандартного зразка вінкаміну й фармакопейного стандартного зразка Державної Фармакопеї України (ДФУ) барвінку екстракту для подальшого його використання замість першого. Реактив для виявлення (розчин амонію церію сульфату) змінено на більш доступні реактиви, а саме — розчин калію йодовісмутату й розчин натрію нітриту, які є уніфікованими при виявленні зон алкалоїдів. Розроблено методику кількісного визначення суми алкалоїдів у перерахунку на вінкаміну гідрохлорид у досліджуваній сировині. Випробування проводили методом індикаторного титрування 0.05 М розчином хлорної кислоти. Вміст суми алкалоїдів відповідав вимогам специфікацій. На підставі проведених досліджень розроблено проект національної монографії «Барвінку трава» для введення до ДФУ другого видання. Запропоновано ввести до проекту національної монографії ДФУ «Барвінку трава» регламентацію вмісту суми алкалоїдів «не менше 0.4 %», втрати в масі при висушуванні — «не більше 14.0 %», вмісту загальної золи — «не більше 10.0 %».

Ключові слова: барвінку малого трави, ідентифікація, кількісне визначення, монографія, Державна Фармакопея України.

UDC 615.11: 615.322

Summary

Kotov A. G., Yurchenko T. V., Kotova E. E.

Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center for Quality of Medicines, Kharkiv, Ukraine

Issues of the introduction of the national monograph «*Vinca minor*» into the State Pharmacopoeia of Ukraine

The study aimed at the development of the national pharmacopoeial monograph «*Vinca minor*». A comparative analysis of approaches to quality standardization of *Vincae minoris herba* was conducted. Five batches of raw materials of *Vincae minoris herba* from various manufacturers of Ukraine were studied for compliance with the regulatory requirements. All samples tested demonstrated compliance with the requirements of the French Pharmacopoeia and manufacturers' specifications. For identification by thin-layer chromatography, a procedure harmonized with the requirements of manufacturers' specifications was developed with the use of a reference standard (RS) of vincamine and a pharmacopoeial RS of the State Pharmacopoeia of Ukraine (SPhU) of vinca extract for the further replacement of the former. The developer reagent (ammonium cerium sulfate solution) was replaced by those more affordable and unified in the development of alkaloids (potassium iodobismuthate solution and sodium nitrite solution). For quantification of the sum of alkaloids expressed as vincamine hydrochloride in raw materials, a procedure based on indicator titration using a 0.05 M perchloric acid solution has been developed. The content of vincamine hydrochloride met requirements of specifications. On the basis of the conducted research, a draft of the national monograph «*Vinca minor*» for introduction into SPhU (2nd edition) has been developed. The following requirements are proposed for inclusion in the SPhU draft monograph «*Vinca minor*»: the content of the alkaloid sum should be «not more than 0.4 %», *Loss on drying* should be «not more than 14.0 %», and *Total ash* should be «not more than 10.0 %».

Keywords: *vincae minor herba*, identification, quantitative determination, monograph, State Pharmacopoeia of Ukraine.

УДК 615.11: 615.322

Резюме

Котов А. Г., Юрченко Т. В., Котова Э. Э.

Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств», Харьков, Украина

Вопросы введения в Государственную Фармакопею Украины национальной монографии «Барвинка трава»

Целью исследования была разработка национальной фармакопейной монографии «Барвинка трава». Проведен сравнительный анализ подходов к стандартизации качества травы барвинка малого. Исследовано 5 серий сырья б. малого травы разных производителей Украины на соответствие требованиям нормативных документов. Все исследованные образцы продемонстрировали соответствие требованиям Французской Фармакопеи и спецификаций производителей. Для идентификации методом тонкослойной хроматографии разработана методика, гармонизированная с требованиями спецификаций производителей, с использованием стандартного образца винкамина и фармакопейного стандартного образца Государственной Фармакопеи Украины (ГФУ) барвинка экстракта для дальнейшего его использования вместо первого. Реактив для проявления (раствор аммония церия сульфата) изменен на более доступные реактивы, а именно — раствор калия йодовісмутата и раствор нитрита натрия, которые являются унифицированными при проявлении зон алкалоидов. Разработана методика количественного определения суммы алкалоидов в пересчете на винкамина гидрохлорид в исследуемом сырье. Испытание проводили методом индикаторного титрования 0.05 М раствором хлорной кислоты. Содержание суммы алкалоидов соответствовало требованиям спецификаций. На основании проведенных исследова-

ний розробтан проект національної монографії «Барвінка трава» для введення в ГФУ другого издания. Предложено ввести в проект національної монографії ГФУ «Барвінка трава» регламентацію содержания сумми алкалоидов «не менее 0.4 %», потери в массе при высушивании — «не более 14.0 %», содержания общей золы — «не более 10.0 %».

Ключевые слова: барвінка малого трава, идентификация, количественное определение, монография, Государственная Фармакопея Украины.

Для безпечного використання лікарських рослинних засобів (ЛРЗ) гарантією їх якості й ефективності є стандартизація лікарської рослинної сировини (ЛРС). У наш час якість ЛРС й ЛРЗ регламентує Державна Фармакопея України (ДФУ).

Барвінок (*Vinca L.*) — рід квіткових рослин із родини барвінкових або кутрових (*Aprocynaceae*), що охоплює близько 7 видів. Лікарське і декоративне значення має барвінок малий — *Vinca minor L.* Зростає в Україні в південних лісових і лісостепових, північних районах і в передгір'ях Криму й Карпат [1]. У медицині використовують траву б. малого, яка має широкий спектр лікувальної дії, застосовується як заспокійливий засіб, у разі головного болю та для зниження артеріального тиску. Галенові препарати б. малого проявляють гіпотензивну, в'язучу, протимікробну, протизапальну й кровоспинну дію [1, 2]. Вони знижують артеріальний тиск, розширюють венозні судини серця і судини головного мозку, розслабляють мускулатуру тонкого кишечника й стимулюють скорочення матки. З трави б. малого виготовляють досить відомі препарати, такі як «Вінкапан», «Девінкан», «Вінканор» і їх аналоги [1, 2].

Різні фармакологічні властивості ЛРС барвінку пов'язані з багатим складом біологічно активних речовин (БАР). З трави б. малого виділено 45 алкалоїдів, основні з яких містять похідні індоліну, індолу, оксиндолу й індоленіну (0.45-0.85 %), вінкамін (0.02-0.1 %), ізовінкамін (0.07 %) й інші. Серед інших БАР відомо про вміст тритерпеноїдів, зокрема урсолової кислоти (0.14-3.7 %), орнолу, каучуку (1.08 %), стероїдів (β -ситостерин) і флавоноїдів, зокрема робініну [2-4].

Якість сировини трави б. малого була регламентована вимогами ВФС 42-1728-87 «Трава барвінка малого» [5], яка містить такі числові показники: вміст суми алкалоїдів у перерахунку на вінкамін гідрохлорид (не менше 0.4 %), який визначається титриметрично; загальна зола (не менше 10 %); вміст сторонніх домішок: почорнілого листа (не більше 2 %), органічної домішки й інших частин неотруйної рослини (не більше 3 %), стебел і черешків (не більше 5 %), мінеральної домішки (не більше 1 %); втрата в масі при висушуванні (не більше 14 %). Ідентифікація методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) у цій ВФС не описана. На

сьогодні вимоги фармакопейної статті застаріли. В Україні розроблені й використовуються специфікації вітчизняних виробників на траву барвінку, згідно з якими сировину стандартизують за вмістом суми алкалоїдів у перерахунку на вінкамін і суху сировину (не менше 0.4 %) методом індикаторного титрування розчином хлорної кислоти. Ідентифікацію ЛРС б. малого проводять за макро- й мікроскопічними ознаками й методом ТШХ, де як розчин порівняння використовують вінкамін. Інші числові показники такі самі, як у ВФС 42-1728-87 «Трава барвінка малого». Сировина б. малого також описана у Французькій Фармакопеї (Ph. Fr.), у монографії «*Vinca minor*», де кількісне визначення не наведене. Ідентифікують сировину методами макро-, мікроскопії та ТШХ з використанням речовини-свідка вінкаміну. Визначають сторонні домішки (не більше 2.0 %), загальну золу (не більше 8.0 %) і втрату в масі при висушуванні (не більше 12.0 %) [6].

З огляду на те, що зараз відсутня національна нормативна документація (а саме монографія ДФУ) на лікарську рослинну сировину трави б. малого, а стандартизація за наведеною вище документацією відрізняється, актуальною є розробка сучасних методик контролю якості на цей вид сировини.

Метою цієї роботи є дослідження якості сировини барвінку малого трави, зібраної в різних регіонах України, для встановлення відповідності вимогам нормативних документів (НД) і подальшого введення розроблених методик до проекту монографії ДФУ.

Об'єктами дослідження були 5 зразків висушеної надземної частини б. малого різних виробників, які зібрані у 2017-2018 роках (усі зразки зареєстровані в ДП «Фармакопейний центр»).

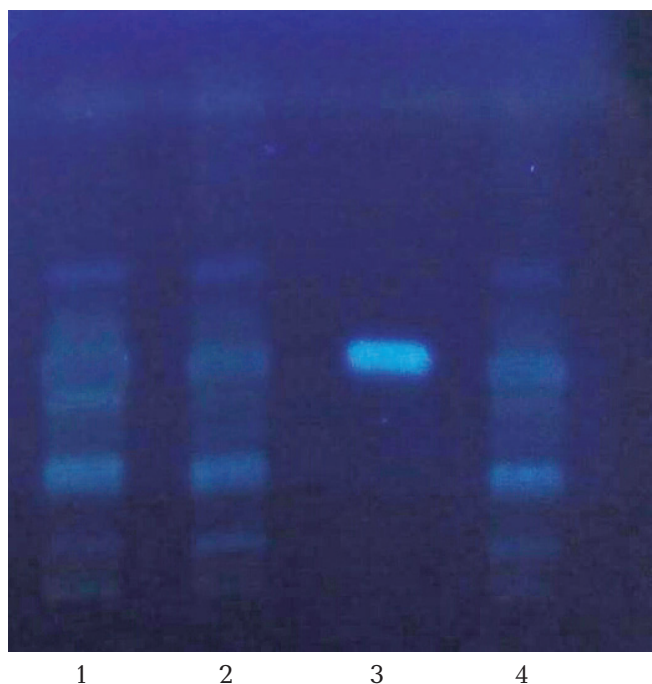
Результати аналізу досліджуваних зразків б. малого за деякими показниками якості, відповідно до вимог специфікацій вітчизняних виробників на траву барвінку, наведені в Табл. 1.

Усі проаналізовані зразки трави б. малого відповідали вимогам розділів монографії Ph. Fr. «*Vinca minor*» [6] і специфікацій на траву барвінку за показниками «Визначення», «Макроскопія та мікроскопія», тому на підставі отриманих даних розроблені відповідні розділи для введення до проекту монографії ДФУ.

Ідентифікація методом тонкошарової хроматографії. Після ретельного вивчення описаних у зазначених вище НД ТШХ-методик з'ясовано, що б. малий ідентифікують за наявністю зони вінкаміну. За основу була взята методика визначення за показником «Алкалоїди», описана в специфікаціях на траву барвінку. Приготування випробовуваного розчину й рухомої фази здійснювали, як описано в методиці. Як розчин порівняння замість вінкаміну

використовували напрацьований фармакопейний стандартний зразок Державної Фармакопеї України (ФСЗ ДФУ) — барвінку екстракт. За результатами випробування методом ТШХ на хроматограмі розчину порівняння ФСЗ ДФУ барвінку екстракту виявляється зона, за положенням і кольором відповідна зоні на хроматограмі розчину порівняння СЗ вінкаміну. За описаною методикою виявлення проводили 1% розчином амонію церію (IV) сульфату в орто-

Рисунок 1



Типова хроматограма після обприскування розчином амонію церію (IV) сульфату в ортофосфорній кислоті в УФ-світлі за 365 нм

Примітки.

- 1 — хроматограма випробовуваного розчину трави б. малого;
- 2 — хроматограма розчину ФСЗ ДФУ барвінку екстракту;
- 3 — хроматограма розчину порівняння вінкаміну;
- 4 — хроматограма розчину барвінку екстракту, використаного для приготування ФСЗ ДФУ барвінку екстракту.

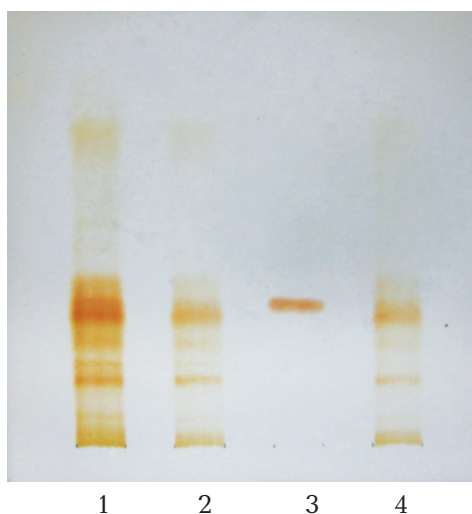
Таблиця 1

Результати аналізу зразків б. малого трави за вимогами специфікацій

Показники	Нормування	Номер зразка				
		1	2	3	4	5
Визначення	Відповідно до специфікації	+	+	+	+	+
Зовнішні ознаки — макроскопія	Відповідно до специфікації	+	+	+	+	+
Мікроскопія	Відповідно до специфікації	+	+	+	+	+
Сторонні домішки:						
— вміст почорнілого листя	Не більше 2.0 %	1.7 %	1.3 %	1.9 %	1.9 %	2.0 %
— вміст органічної домішки	Не більше 5.0 %	1.3 %	2.7 %	1.9 %	3.2 %	2.4 %
— вміст мінеральної домішки	Не більше 1.0 %	1.0 %	0.7 %	0.9 %	0.6 %	0.7 %
Втрата в масі при висушуванні	Не більше 14.0 %	5.9 %	7.4 %	7.7 %	6.2 %	8.3 %
Загальна зола	Не більше 10.0 %	0.5 %	0.6 %	0.7 %	0.6 %	0.8 %

Примітка. «+» — відповідає вимогам.

Рисунок 2



Типова хроматограма після обприскування розчином калію йодовісмутату P^N і розчином натрію нітриту P

Примітки.

- 1 — хроматограма випробовуваного розчину трави б. малого;
- 2 — хроматограма розчину ФСЗ ДФУ барвінку екстракту;
- 3 — хроматограма розчину порівняння вінкаміну;
- 4 — хроматограма розчину барвінку екстракту, використаного для приготування ФСЗ ДФУ барвінку екстракту.

фосфорній кислоті й переглядали в УФ-світлі за 365 нм. На Рис. 1 наведена типова хроматограма випробовуваного зразка трави б. малого, отримана за описаною методикою.

Після проведення аналізу в запропонованих умовах результат виявився недостовірним, тому що зони вінкаміну на хроматограмах усіх зразків сировини б. малого були нечіткі й слабкі. З огляду на це, а також те, що використовуваний проявник є досить рідкісним, запропоновано замінити методику виявлення зон на процедуру, яка є уніфікованою в ДФУ для ідентифікації зон алкалоїдів [7], а саме використовувати послідовне обприскування хроматограми розчином калію йодовісмутату P^N і розчином натрію нітриту P з подальшим перегляданням хроматограми за денного світла.

На Рис. 2 наведена типова хроматограма випробовуваного зразка трави б. малого, отримана в умовах розробленої методики.

Як видно з Рис. 2, на хроматограмі випробовуваного розчину трави б. малого й розчину

ФСЗ ДФУ барвінку екстракту виявлено зони вінкаміну, що за положенням і забарвленням відповідають зоні вінкаміну на хроматограмі розчину порівняння.

Випробування. За результатами визначення втрати в масі при висушуванні всі проаналізовані зразки трави б. малого відповідали вимогам усіх зазначених вище НД. Для розробки проекту монографії ДФУ використовували вимоги, описані в специфікаціях на траву барвінку, тому нормування втрати в масі при висушуванні запропоновано регламентувати на рівні «не більше 14.0 %».

У результаті аналізу визначено, що в усіх зразках б. малого вміст загальної золи лежить в діапазоні від 0.5 % до 0.6 %, що відповідало всім наявним вимогам. Згідно зі специфікаціями запропоновано встановити нормування вмісту загальної золи «не більше 10.0 %».

Кількісне визначення. У процесі відтворення методики кількісного визначення суми алкалоїдів у перерахунку на вінкаміну гідрохлорид за

Таблиця 2

Результати визначення суми алкалоїдів у зразках трави б. малого методом індикаторного титрування

Показник	Зразок $x \pm \Delta x, n = 3$				
	1	2	3	4	5
Вміст суми алкалоїдів у перерахунку на вінкаміну гідрохлорид, %	0.41 ± 0.017	0.39 ± 0.021	0.43 ± 0.013	0.39 ± 0.019	0.41 ± 0.011

специфікаціями на траву барвінку були внесені незначні зміни у методику, які спрощують пробопідготовку. Випробування проводили методом індикаторного титрування 0.05 М розчином хлорної кислоти. Результати визначення суми алкалоїдів у перерахунку на вінкаміну гідрохлорид у 5 зразках сировини наведені в Табл. 2.

В усіх зразках б. малого встановили вміст суми алкалоїдів на рівні 0.4 %, що відповідало вимогам специфікації.

На підставі проведених досліджень запропоновано ввести методику кількісного визначення суми алкалоїдів у перерахунку на вінкаміну гідрохлорид до проекту національної монографії ДФУ «Барвінку трава», з регламентацією «не менше 0.4 %».

Висновки

Проведено порівняльний аналіз підходів до стандартизації якості ЛРС трави барвінку малого, що описані у ВФС 42-1728-87 «Трава барвінка малого», специфікаціях на траву барвінку й монографії Французької Фармакопеї «Vinca minor», і розроблено параметри стандартизації вітчизняної ЛРС трави барвінку малого.

На підставі проведених досліджень розроблено проект національної монографії ДФУ «Барвінку трава».

ЛІТЕРАТУРА

1. Лікарські рослини : Енциклопедичний довідник / Л-56 Відп. ред. А.М. Гродзінський. Київ : Видавництво «Українська Енциклопедія» ім. М.П. Бажана, Український виробничо-комерційний центр «Олімп», 1992. 544 с.
2. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства Carifoliaceae — Plantaginaceae / Ленинград : Наука, 1990. 328 с.
3. Атлас лекарственных растений России / Москва : ВИЛАР, 2000. 647 с.
4. Лекарственное растительное сырье. Фармакогнозия : учеб. пособие / Я47 Под ред. Г.П. Яковлева и К.Ф. Блиновой. СПб : Спец. лит., 2004. 765 с.
5. Временная фармакопейная статья ВФС 42-1728-87 «Herba Vincae minoris, Трава барвінка малого» / Москва : Минздрав СССР, 1987. 6 с.
6. Pharmacopée française [Електронний ресурс]. Режим доступу : <https://ansm.sante.fr/Mediatheque/Publications/Pharmacopée-francaise-Preparations-homeopathiques-Anglais>, вільний (дата звернення 04.09.2018). Назва з екрана.

7. Державна Фармакопея України : у 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків : Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. Т. 3. С. 241-243, 490-492.

Котов Андрій Георгійович. Д. фарм. н. (2014). Ст. н. с. (2004). Начальник відділу ДФУ ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів».

Kotov Andrii Georgiiovich. Sc. D. in Pharmacy (2014). Senior Researcher (2004). Head of the Department of the State Pharmacopoeia at Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center for Quality of Medicines.

Котов Андрей Георгиевич. Д. фарм. н. (2014). Ст. науч. сотр. (2004). Начальник отдела ГФУ ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств».

Юрченко Тетяна Валеріївна. Інженер I категорії сектора експериментальної підтримки розробки монографій на ЛРС ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів».

Yurchenko Tatiana Valeryevna. 1St category Engineer of the Department for Experimental Support of the Development of Monographs on Herbal Drugs at Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center for Quality of Medicines.

Юрченко Татьяна Валерьевна. Инженер I категории сектора экспериментальной поддержки разработки монографий на ЛРС ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств».

Котова Еліна Едуардієвна. К. фарм. н. (2005). Завідувач сектора експериментальної підтримки розробки монографій на ЛРС ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів».

Kotova Elna Eduardivna. Ph. D. in Pharmacy (2005). Head of the Department for Experimental Support of the Development of Monographs on Herbal Drugs at Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center for Quality of Medicines.

Котова Элина Эдуардовна. К. фарм. н. (2005). Заведующая сектором экспериментальной поддержки разработки монографий на ЛРС ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств».

УДК 664.658

Котов А. Г., Суворова І. М., Тимченко О. В., Останіна Н. В.
Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», Харків, Україна
Державна служба України з лікарських засобів та контролю за наркотиками
Державна установа «Інститут громадського здоров'я ім. О. М. Марзєєва Національної академії медичних наук України»

Питання введення до Державної Фармакопеї України нової редакції статті «Дієтичні добавки»

Аналіз чинного законодавства України у сфері обігу дієтичних добавок (ДД) виявив обмеженість вимог до показників їх якості й безпеки. Це зумовлює актуальність посилення заходів щодо забезпечення якості цих продуктів й організацію ефективного ринкового нагляду. У 2019 р. ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів» у співпраці з Держлікслужбою України й Інститутом громадського здоров'я ім. О. М. Марзєєва НАМН України підготовлено нову редакцію статті «Дієтичні добавки» Державної Фармакопеї України (ДФУ), яка враховує досвід Європейського Союзу (ЄС) у сфері обігу цих продуктів. Одним із ключових моментів нової редакції статті є визначення терміну «дієтична добавка» відповідно до формулювання головного регуляторного документа ЄС у цій сфері — Директиви 2002/46/ЄС, яка поширюється на ДД, в яких поряд із поживними речовинами можуть бути компоненти з іншим, відмінним від поживного, фізіологічним ефектом. Згідно з розділом «Виробництво» ДД мають вироблятися в умовах, де впроваджено систему аналізу небезпечних факторів і контролю в критичних точках (НАССР). Особлива увага в статті приділена рослинній сировині, зокрема лікарській, і екстрактам із неї, і ризикам для безпеки, пов'язаним з їх застосуванням (вміст генотоксичних і канцерогенних сполук, мікробна контамінація, залишки пестицидів, важких металів тощо). Випробування згідно з розділами «Важкі метали», «Радіонукліди», «Афлатоксини», «Залишкові кількості пестицидів», «Мікробіологічна чистота» й «Додаткові випробування» можуть проводитися відповідно до однойменних статей ДФУ 2.0. Дослідження стабільності мають проводитися за всіма критичними показниками, які залежать від передбачуваного застосування ДД і тривалості терміну придатності. Випробування органолептичних властивостей ДД має проводитися згідно з вимогами статей ДФУ на відповідні лікарські форми (таблетки, капсули тощо). Визначення інгредієнтів і допоміжних речовин ДД може проводитися з використанням відповідних монографій ДФУ і Європейської Фармакопеї. Вимоги до упаковки (контейнерів) ДД відповідають розділу 3 ДФУ «Матеріали та контейнери». Маркування має відповідати вимогам чинного законодавства й не приписувати ДД лікувальних або профілактичних властивостей. Дотримання вимог статті ДФУ «Дієтичні добавки» під час виробництва ДД буде сприяти підвищенню якості й безпеки цих продуктів і зростанню довіри споживачів до них.

Ключові слова: дієтичні добавки, якість, законодавство України, Державна Фармакопея України.

UDC 664.658

Summary

Kotov A. G., Suvorova I. M., Tymchenko O. V., Ostanina N. V.
Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center for Quality of Medicines Kharkiv, Ukraine
State Service of Ukraine on Medicines and Drugs Control, Kyiv, Ukraine
State Institution «O. M. Marzиеv Institute for Public Health of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kyiv, Ukraine

Issues of the introduction of a new edition of the article «Food supplements» into the State Pharmacopoeia of Ukraine

An analysis of the legislation of Ukraine currently in force concerning food supplement (FS) turnover revealed the limited requirements for their quality and safety, which underpins the relevance of strengthening measures to FS quality assurance and organizing effective market surveillance. In 2019, Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center for Quality of Medicines, in collaboration with State Service of Ukraine on Medicines and Drugs Control and State Institution «O. M. Marzиеv Institute for Public Health of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», has prepared a new edition of the article «Food supplements» of the State Pharmacopoeia of Ukraine (SPhU), which takes into account the experience of the European Union (EU) in the FS turnover. One of the key points is that the new edition defines the term «food supplement» in accordance with Directive 2002/46/EC, the main EU legislation that regulates FS turnover, including both nutrients and ingredients with physiological, non-nutritional effects. According to section *Manufacturing*, the food safety management system based on HACCP should be implemented for FS manufacturing. Particular attention is paid to plant materials, including herbal drugs and herbal drug extracts and safety risks associated with their use (content of genotoxic and carcinogenic compounds, microbial contamination, residual amounts of pesticides, heavy metals, etc.). The tests on *Heavy metals*, *Radionuclides*, *Aflatoxins*, *Residues of pesticides*, *Microbiological purity*, and *Additional tests* can be carried out according to the relevant articles of SPhU 2.0. Stability tests have to be conducted on all critical parameters that depend on the intended use and expiry date of FS. FS organoleptic properties should be tested following the requirements for relevant dosage forms (tablets, capsules, etc.). For assays of the ingredients and excipients of FS, the appropriate monographs of SPhU and European Pharmacopoeia can be used. The requirements for the packaging of FS comply with Section 3 of SPhU *Materials and Containers*. The labelling must correspond to the legislation in force and must not attribute therapeutic or prophylactic properties to FS. Fulfilment of the requirements of the SPhU revised article «Food supplements» will contribute to the enhancement of the FS quality and safety as well as building consumer confidence in them.

Keywords: food supplements, quality, legislation of Ukraine, State Pharmacopoeia of Ukraine.

УДК 664.658

Резюме

Котов А. Г., Суворова И. Н., Тимченко О. В., Останина Н. В.

Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств», Харьков, Украина

Государственная служба Украины по лекарственным средствам и контролю за наркотиками, Киев, Украина

Государственное учреждение «Институт общественного здоровья им. А. Н. Марзеева Национальной академии медицинских наук Украины», Киев, Украина

Вопросы введения в Государственную Фармакопею Украины новой редакции статьи «Диетические добавки»

Анализ действующего законодательства Украины в сфере оборота диетических добавок (ДД) выявил ограниченность требований к показателям их качества и безопасности. Это обуславливает актуальность усиления мер обеспечения качества этих продуктов и организацию эффективного рыночного надзора. В 2019 г. ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств» в сотрудничестве с Гослекслужбой Украины и Институтом общественного здоровья им. А. Н. Марзеева НАМН Украины подготовлена новая редакция статьи «Диетические добавки» Государственной Фармакопеи Украины (ГФУ), которая учитывает опыт Европейского Союза (ЕС) в сфере оборота этих продуктов. Одним из ключевых моментов новой редакции статьи является определение термина «диетическая добавка» согласно соответствующей формулировке главного регуляторного документа ЕС в этой сфере — Директивы 2002/46/ЕС, распространяющейся на ДД, в которых наряду с питательными веществами могут присутствовать компоненты с другим, отличным от питательного, физиологическим эффектом. Согласно разделу «Изготовление» ДД должны производиться в условиях, где внедрена система анализа опасных факторов и контроля в критических точках (НАССР). Особое внимание в статье уделено растительному сырью, в т. ч. лекарственному, и экстрактам из него, и рискам для безопасности, связанным с его применением (содержание генотоксических и канцерогенных соединений, микробная контаминация, остаточные количества пестицидов, тяжелых металлов и др.). Испытания согласно разделам «Тяжелые металлы», «Радионуклиды», «Афлатоксины», «Остаточные количества пестицидов», «Микробиологическая чистота» и «Дополнительные испытания» могут проводиться в соответствии с одноименными статьями ГФУ 2.0. Исследования стабильности должны проводиться по всем критическим показателям, зависящим от предполагаемого применения ДД и длительности их срока годности. Испытания органолептических свойств ДД должны проводиться согласно требованиям статей ГФУ на соответствующие лекарственные формы (таблетки, капсулы и др.). Определение ингредиентов и вспомогательных веществ ДД может проводиться с использованием соответствующих монографий ГФУ и Европейской Фармакопеи. Требования к упаковке (контейнерам) ДД отвечают разделу 3 ГФУ «Материалы и контейнеры». Маркировка должна соответствовать требованиям действующего законодательства и не приписывать ДД лечебных или профилактических свойств. Выполнение требований статьи ГФУ «Диетические добавки» при производстве ДД будет способствовать повышению качества и безопасности этих продуктов и повышению доверия потребителей к ним.

Ключевые слова: диетические добавки, качество, законодательство Украины, Государственная Фармакопея Украины.

Динамічне зростання ринкової долі дієтичних добавок (ДД) є сучасним трендом у структурі роздрібних аптечних продажів [1], що загалом відповідає світовим тенденціям [2-4]. Так, за період з 1 кв. 2015 р. по 3 кв. 2019 р. доля продаж ДД зростає майже вдвічі — з 3.4 % до 5.9 % [1].

Аналіз сучасного законодавства України у сфері обігу ДД, вживання яких має на меті оптимізацію раціону харчування та збереження здоров'я людини, виявив обмеженість вимог до показників якості й безпечності ДД, що зумовлює актуальність посилення заходів щодо забезпечення якості цих продуктів й організацію ефективного ринкового нагляду. Так, проведений аналіз законодавчих актів України у сфері харчових продуктів виявив таке.

1) Закон України «Про основні принципи та вимоги до безпечності та якості харчових продуктів» № 771/97-вр (зі змінами згідно із Законом України № 1602-VII від 22.07.2014 р. «Про внесення змін до деяких законодавчих актів України щодо харчових продуктів») не містить конкретних вимог до показників якості й безпечності ДД.

2) Гігієнічні норми ГН 4.4.8.073-2001 «Тимчасові гігієнічні нормативи вмісту контамінан-

тів хімічної і біологічної природи у біологічно активних добавках» (Наказ МОЗ України № 73 від 2001 р.), які містили вимоги до показників якості й безпечності ДД, були введені в дію 18 років тому на 5-річний термін, посилюються на низку ДСТУ, дія яких припинена в минулому році, тому наразі легітимність цього документа загалом є дискусійною.

3) «Мікробіологічні критерії для встановлення показників безпечності харчових продуктів» (Наказ МОЗ України № 548 від 19.07.2012 р.) не містять конкретних вимог до показників якості й безпечності ДД.

4) Державні санітарні правила й норми «Медичні вимоги до якості та безпеки харчових продуктів та продовольчої сировини» (Наказ МОЗ України № 1140 від 29.12.2012 р.), які діяли до 01.03.2019 р., не містять конкретних вимог до показників якості й безпечності ДД.

5) «Гігієнічні вимоги до продуктів дитячого харчування, параметрів безпечності та окремих показників їх якості» (Наказ МОЗ України № 696 від 06.08.2013 р.) не містять конкретних вимог до показників якості й безпечності ДД.

6) «Гігієнічні вимоги до дієтичних добавок» (Наказ МОЗ України № 1114 від 19.12.2013 р.)

не містять конкретних вимог до показників якості й безпечності ДД.

7) Закон України № 2042 від 18.05.2017 р. «Про державний контроль за дотриманням законодавства про харчові продукти, корми, побічні продукти тваринного походження, здоров'я та благополуччя тварин» не містить конкретних вимог до показників якості й безпечності ДД.

8) Державні гігієнічні правила й норми «Регламент максимальних рівнів окремих забруднюючих речовин у харчових продуктах» (Наказ МОЗ України № 368 від 13.05.2013 р.), дійсні з 14.06.2016 р., містять вимоги до вмісту в ДД важких металів (свинцю, кадмію та ртуті).

Отже, обмеженість вимог до показників якості й безпечності ДД зумовлює актуальність як вдосконалення нормативної бази у сфері обігу ДД, так і посилення заходів із боку державного регулятора щодо контролю якості цих продуктів.

У 2019 р. ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів» у співпраці з Державною службою України з лікарських засобів та контролю за наркотиками й Інститутом громадського здоров'я ім. О. М. Марзєєва Національної академії медичних наук України підготовлено нову редакцію статті «*Дієтичні добовки*» Державної Фармакопеї України (ДФУ). Стаття розроблена з урахуванням досвіду Європейського Союзу (ЄС) у сфері обігу ДД і враховує головний регуляторний документ ЄС щодо ДД — Директиву 2002/46/ЄС [5], Методичні рекомендації ЄС до виробництва ДД [6-9] і низку Регламентів ЄС [10, 11].

Як було зазначено в наших попередніх роботах [12, 13], попри гармонізацію законодавства України і ЄС у сфері харчових продуктів у визначенні терміну «дієтична добовка» в Україні і ЄС збереглися певні розбіжності. Нова редакція статті ДФУ «*Дієтичні добовки*» визначає цей термін згідно з формулюванням Директиви 2002/46/ЄС задля ідентичності дефініцій в умовах гармонізації законодавства, що стало одним із ключових моментів нової редакції статті. Відповідно до зазначеної Директиви стаття ДФУ в новій редакції поширюється на ДД, в яких поряд із поживними речовинами можуть бути компоненти з іншим, відмінним від поживного, фізіологічним ефектом, що й зумовило перелік розділів нової редакції статті і їх зміст.

Так, у розділі «Виробництво» зазначено, що ДД мають вироблятися в умовах, які забезпечують якість і безпечність для здоров'я людини й гарантують відповідність вимогам чинних

нормативних документів, для чого визначальним є впровадження системи аналізу небезпечних факторів і контролю в критичних точках (НАССР — Hazard Analysis and Critical Control Points), що відповідає чинному законодавству України. Система гарантує безпечність продукції впродовж усього ланцюжка виробництва харчового продукту й надає змогу виявити всі критичні точки, які можуть вплинути на безпечність кінцевого продукту, усунути шкідливі фактори й контролювати повний процес виробництва. Система НАССР є обов'язковою в межах законодавства країн ЄС, США, Канади, Японії, Нової Зеландії тощо. Згідно із Законом України № 1602-VII від 22.07.2014 р., з 20 вересня 2019 р. система безпечності харчової продукції НАССР має бути впроваджена на всіх українських підприємствах, зокрема й малих потужностях, діяльність яких так або інакше пов'язана з харчовими продуктами, зокрема і ДД.

Особливу увагу в проєкті статті приділено лікарській рослинній сировині (ЛРС), рослинній сировині (РС) і екстрактам із неї, бо використання в ДД інгредієнтів цих категорій несе додаткові ризики, які мають бути враховані, а саме: вміст генотоксичних і канцерогенних сполук (піролізидинові алкалоїди, аристоклієва кислота, алкілбензоли), мікробна контамінація рослинної сировини, залишки пестицидів, важких металів, тощо [14-16, 19].

Вимоги до якості інгредієнтів ДД, зокрема ЛРС і РС, зазначені в розділах «Склад» і «Критерії якості інгредієнтів та допоміжних речовин ДД». Склад ДД, який загалом є відповідальністю виробника, за вмістом окремих речовин має відповідати затвердженим нормам їх споживання. Так, переліки вітамінів і мінералів, які можуть міститися в ДД, наведені відповідно в Додатку 1 і Додатку 2 до статті, відповідають як «Гігієнічним вимогам до дієтичних добовок» (Наказ МОЗ України № 1114 від 19.12.2013 р.) [17], так і Директиви 2002/46/ЄС [5]. Допустимі норми інших інгредієнтів (білків, жирів, вуглеводів, вітамінів, мінералів і деяких біологічно активних речовин із встановленою фізіологічною дією на організм) зазначені в «Нормах фізіологічних потреб населення України в основних харчових речовинах і енергії» (Наказ МОЗ України № 1073 від 03.09.2017 р.) [18]. Щодо вмісту інших інгредієнтів стаття зазначає, що якщо чинним законодавством не встановлені вимоги до мінімального й максимального вмісту інгредієнта, така речовина може додаватися в ДД тільки після затвердження відповідних показників уповноваженим органом.

Критерії якості інгредієнтів ДД мають витримувати вимоги відповідних загальних монографій і статей ДФУ або інших чинних нормативних документів, а РС, що не є лікарською, але широко використана як поживна речовина, може додаватися в ДД тільки після затвердження відповідних критеріїв якості уповноваженим органом або має бути введена до ДФУ як інгредієнт для використання в ДД.

Відбір проб ЛРС і пробопідготовка для виробництва ДД здійснюється згідно зі статтею ДФУ «Лікарська рослинна сировина: відбір проб і пробопідготовка» (2.8.20), стандартизація процесу виробництва екстрактів із РС — згідно зі статтею ДФУ «Екстракти» тощо.

Розділ «Упаковка» містить вимоги до контейнерів для ДД, які мають відповідати вимогам чинних нормативних документів і/або відповідним вимогам ДФУ (розділ 3 «Матеріали та контейнери»).

Дослідження стабільності ДД мають проводитися за всіма критичними показниками, які залежать від передбачуваного застосування та тривалості терміну придатності продукту.

Залежно від форми виготовлення ДД визначення їх органолептичних властивостей (зовнішній вигляд, запах, смак, колір тощо) можуть бути проведені відповідно до вимог статей ДФУ «Таблетки», «Гранули», «Капсули», «Порошки для орального застосування», «Рігкі лікарські засоби для орального застосування» тощо, як це зазначено в розділі «Випробування. Органолептичні властивості».

Ідентифікація інгредієнтів і допоміжних речовин ДД може проводитися з використанням відповідних монографій ДФУ, Євр. Ф. або інших авторитетних міжнародних джерел.

Використання відповідних монографій ДФУ під час ідентифікації ЛРС дозволить дотримуватися належної якості ДД, гарантувати вміст саме заявлених рослинних інгредієнтів і перешкоджати використанню у виробництві ДД ЛРС невідомого походження.

Кількісний аналіз заявлених інгредієнтів ДД має виконуватися валідованим методом кількісного визначення. Критерії якості інгредієнтів мають витримувати вимоги ДФУ, Євр. Ф. або інших чинних нормативних документів.

Для ДД, які містять живі мікроорганізми, їх ідентифікація може бути проведена згідно зі статтею Євр. Ф. 3053 «Live biotherapeutic products for human use», введеною в дію у квітні 2019 р. Відповідна стаття ДФУ планується до введення в наступне доповнення ДФУ (Доповнення 2.5), проте зазначена стаття Євр. Ф., з урахуванням її паритетної правової сили з ДФУ, наразі вважається діючою і в Україні.

Випробування згідно з розділами «Важкі метали», «Радіонукліди», «Афлатоксини», «Залишкові кількості пестицидів», «Мікробіологічна чистота» й «Додаткові випробування» можна проводити відповідно до однойменних статей ДФУ 2.0. Так, випробування щодо вмісту важких металів можна проводити відповідно до статей «Важкі метали» (2.4.8) або «Важкі метали у лікарській рослинній сировині та лікарських рослинних засобах» (2.4.27), радіонуклідів — відповідно до статті «Реєстрація та вимірювання радіоактивності» (2.2.66), афлатоксинів — відповідно до вимог статті «Визначення афлатоксину В₁ у лікарській рослинній сировині» (2.8.18), залишкових кількостей пестицидів — відповідно до вимог статті «Залишкові кількості пестицидів» (2.8.13).

З урахуванням даних щодо токсичного впливу деяких компонентів лікарської рослинної сировини, а саме — аристоксієвої кислоти, охратоксинів, ерукової кислоти, на організм людини, незважаючи на відсутність відповідних нормативних вимог, додатково можна проводити випробування відповідно до вимог статей «Випробування на вміст аристоксієвих кислот у лікарській рослинній сировині» (2.8.21), «Визначення охратоксину А у лікарській рослинній сировині» (2.8.22), «Сторонні олії у жирних оліях методом тонкошарової хроматографії» (2.4.21), «Сторонні олії у жирних оліях методом газової хроматографії» (2.4.22). Для олієвмісних продуктів можливе додаткове проведення інших випробувань згідно з ДФУ.

Випробування мікробіологічної чистоти можуть бути проведені відповідно до статей ДФУ «Мікробіологічна чистота нестерильних лікарських засобів: визначення числа мікроорганізмів» (2.6.12), «Мікробіологічна чистота нестерильних лікарських засобів: випробування на окремі види мікроорганізмів» (2.6.13), «Випробування мікробіологічної чистоти рослинних лікарських засобів для орального застосування та екстрактів, що використовують для їх виготовлення» (2.6.31). Де можливо застосувати, ДД мають відповідати вимогам статей ДФУ «Мікробіологічна чистота нестерильних фармацевтичних препаратів та субстанцій для фармацевтичного застосування» (5.1.4) і «Мікробіологічна чистота готових лікарських рослинних засобів для орального застосування та екстрактів, що використовують для їх виготовлення» (5.1.8). Для ДД, які містять живі мікроорганізми, випробування мікробіологічної чистоти можуть бути проведені відповідно до статей Євр. Ф. «Microbiological examination of live biotherapeutic products: tests for enumeration of microbial contaminants» (2.6.36), «Microbiological

examination of live biotherapeutic products: tests for specified microorganisms» (2.6.38), введених у дію у квітні 2019 р. Відповідні статті ДФУ плануються до введення в наступне доповнення ДФУ (Доповнення 2.5).

Розділ «Маркування» містить орієнтовний перелік інформації, яку має містити етикетка ДД. Також зазначено, що маркування ДД має відповідати вимогам чинного законодавства, зокрема Закону України № 2639-VIII від 06.08.2019 р. «Про інформацію для споживачів щодо харчових продуктів». Окремо слід наголосити, що згідно з вимогами зазначеного закону інформація про харчові продукти не має приписувати будь-яким харчовим продуктам, крім природних мінеральних вод і харчових продуктів для спеціальних медичних цілей, властивостей, що сприяють запобіганню чи лікуванню захворювань, або посилається на такі властивості. Ті самі вимоги містяться і в діючих «Гігієнічних вимогах до дієтичних добавок» (Наказ МОЗ України № 1114 від 19.12.2013 р.), згідно з якими «етикетування і реклама дієтичних добавок не повинні містити вислови щодо можливої лікувальної дії, втамування болю; листи подяки, визнання, поради, якщо вони пов'язані з лікуванням чи полегшенням умов перебігу захворювань, а також посилення на таку інформацію; вислови, які спричиняють чи сприяють виникненню відчуття негативного психологічного стану» [17]. Приписування ДД лікувальних і профілактичних властивостей є, на жаль, поширеною практикою, яка, проте, є одним із порушень законодавства, а в ЄС подібні заяви щодо лікувальних або профілактичних властивостей ДД можуть навіть призводити до зарахування продукту до категорії лікарських засобів [14, 20, 21].

Загалом, дотримання вимог статті ДФУ «*Дієтичні добавки*» під час виробництва ДД буде сприяти підвищенню якості й безпечності цих продуктів і зростанню довіри споживачів до них.

Проте у сфері обігу ДД, як в Україні, так і у країнах ЄС, залишається ще багато проблемних питань, невирішення яких несе великі ризики здоров'ю споживача. Серед цих ризиків можна назвати недотримання зазначеного складу й використання незаявлених у складі активних фармацевтичних інгредієнтів [22-24], оцінювання безпечності використання в складі ДД певної рослинної сировини [10, 19, 25-27] тощо. Вочевидь, для ефективного вирішення зазначених проблем актуальним є не лише посилення державного контролю у сфері обігу ДД, а й удосконалення законодавства із залученням фахівців сфери охорони здоров'я.

Ці питання були розглянуті під час медико-правового форуму «Конституційні засади медичної реформи в Україні» (Харків, 06.12.2019) [28]. Як було зазначено директором Департаменту контролю якості лікарських засобів Державної служби України з лікарських засобів та контролю за наркотиками Суворовою І. М. та завідувачкою лабораторії контролю якості та безпеки продукції ДУ «Інститут громадського здоров'я ім. О. М. Марзєєва НАМН України» Останіною Н. В., законодавчі зміни у сфері харчових продуктів призвели до суттєвого послаблення контролю якості ДД. Зокрема, аналіз якості 150 випадкових зразків ДД, проведений лабораторією контролю якості та безпеки продукції ДУ «Інститут громадського здоров'я ім. О. М. Марзєєва НАМН України», виявив, що третина з них не відповідає вимогам. Зокрема, фактичний склад ДД не відповідав зазначеному на упаковці й містив активні фармацевтичні інгредієнти, проте в складі були заявлені лише рослинні компоненти. Зарахування ДД, виготовлених із зазначеними порушеннями, до категорії незареєстрованих лікарських засобів чи фальсифікованих лікарських засобів потребує консультації фахівців із фармацевтичного права, проте очевидно, що такі ДД можуть викликати небезпечні побічні ефекти, а їх вживання несе значні ризики для споживачів. Попри те, що наразі в Україні посилена відповідальність за фальсифікацію лікарських засобів, потрібне певне вдосконалення законодавства для створення умов для її реалізації [28].

ЛІТЕРАТУРА

1. Аптечный рынок Украины по итогам 9 мес. 2019 г.: Helicopter View. *Аптека*. 2019. № 41 (1212). URL: <https://www.apteka.ua/article/519677> (дата звернення 10.01.2020).
2. Usage of Plant Food Supplements across Six European Countries: Findings from the PlantLIBRA Consumer Survey / Garcia-Alvarez A. et al. *PLoS ONE*. 2014. № 9 (3). URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0092265> (дата звернення 20.01.2020).
3. Nicoletti M. Nutraceuticals and botanicals: overview and perspectives *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2012. Vol. 63, № S1. P. 2-6.
4. Dietary Supplement Use in the United States, 2003-2006 / Bailey R. et al. *J. Nutr.* 2011. Vol. 141. P. 261-266.
5. Directive 2002/46/EC of the European Parliament and of the Council of 10 June 2002 on the approximation of the laws of the Member States relating to food supplements. *Official Journal of the European Communities*. 2002. L183. P. 51-57. URL: https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Consol2002_46.pdf (дата звернення 10.01.2020).
6. European Federation of Associations of Health Product Manufacturers (EHPM). Quality guide for food supplements Guidance for the manufacture of safe and consistent supplements across the EU. URL: http://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/File/Publikace/EHPM_quality.pdf (дата звернення 10.01.2020).
7. Quality guide. European Federation of Associations of Health Product Manufacturers. URL: <https://www.ehpm.org/>

- attachments/article/117/EHPM%20Quality%20Guide%20101214.pdf (дата звернення 10.01.2020).
8. Quality of Botanical Preparations. Specific Recommendations for the Manufacturing of Botanical Preparations, Including Extracts as Food Supplements. URL: <http://www.foodsupplementseurope.org/sites/0023/uploads/content/publications/qualityofbotanicalpreparations.pdf?1418124068> (дата звернення 10.01.2020).
9. Good Manufacturing Practice for Manufacturers of Food Supplements. URL: <http://www.foodsupplementseurope.org/sites/0023/uploads/content/publications/good-manufacturing-practice-for-manufacturers-of-food-supplements.pdf?1407341246> (дата звернення 10.01.2020).
10. Regulation 2073/2005: On microbiological criteria for foodstuffs. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:02005R2073-20140601&from=EN> (дата звернення 10.01.2020).
11. Regulation 1881/2006: Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. URL: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:EN:PDF> (дата звернення 10.01.2020).
12. Тимченко О.В., Котов А.Г. Питання законодавчого забезпечення якості дієтичних добавок у Європейському союзі. *Фармаком*. 2018. № 3. С. 19-29.
13. Тимченко О.В., Котов А.Г. Огляд законодавчих змін у сфері забезпечення якості дієтичних добавок в Україні. *Фармаком*. 2018. № 4. С. 15-24.
14. Use of botanicals in food supplements. Regulatory scope, scientific risk assessment and claim substantiation / Coppens P. et al. *Ann. Nutr. Metab.* 2006. Vol. 50, № 6. P. 538-554.
15. The European Role on Traditional Herbal Medicinal Products and Traditional Plant Food Supplements / Serafini M. et al. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2012. Vol. 46. P. 93-94.
16. Oelker L. Quality control in herbal supplements. *Ann. Ist. Super Sanita*. 2005. Vol. 41, № 1. P. 43-48.
17. Гігієнічні вимоги до дієтичних добавок (Наказ МОЗ України № 1114 від 19.12.2013 р.). URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z2231-13> (дата звернення 20.01.2020).
18. Норми фізіологічних потреб населення України в основних харчових речовинах і енергії (Наказ МОЗ України № 1073 від 03.09.2017 р.). URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z1206-17>, вільний. — Загол. з екрана (дата звернення 20.01.2020).
19. Risk assessment of herbal supplements containing ingredients that are genotoxic and carcinogenic / Prinsloo G. *Critical Reviews in Toxicology*. 2019. P. 1-13.
20. Kusar A., Pravst I. Quality and safety of botanicals food products and their labelling. *Agro FOOD Industry Hi Tech*. 2014. Vol. 25, № 2. P. 33-36.
21. Regulation (EC) № 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on food. URL: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:404:0009:0025:EN:PDF> (дата звернення 17.01.2020).
22. Польша: только ¼ часть добавок соответствовала спецификациям. *Аптека*. 2019. URL: <https://www.apteka.ua/article/528959> (дата звернення 17.01.2020).
23. Pharma.net. Анализ: Восемь из десяти БАДов для полового влечения содержат лекарственные вещества. URL: <http://pharma.net.ua/news/world/22407-analiz-vosem-iz-desjati-badov-dlja-polovogo-vlechenija-soderzhat-lekarstvennye-veschestva> (дата звернення 17.01.2020).
24. Phytosterols in supplements containing *Serenoa repens*: an example of variability of active principles in commercial plant based products / Giammarioli S. et al. *Natural Product Research*. 2019. Vol. 33, № 15. P. 2257-2261.
25. Puglia C., Lauro M. Botanicals: Innovative Tools for Pharmaceutical, Cosmetic and Nutraceutical. *Curr. Med. Chem.* 2019. Vol. 26, № 24. P. 4504-4505.
26. Functional foods and dietary supplements: Products at the interface between pharma and nutrition / Eussen S. et al. *European Journal of Pharmacology*. 2011. Vol. 668. P. 2-9.
27. Gulati O., Ottaway B. Legislation relating to nutraceuticals in the European Union with a particular focus on botanical-sourced products. *Toxicology*. 2006. Vol. 221, № 1. P. 75-87.
28. Актуальні питання галузі обговорено під час Медико-правового форуму. *Аптека*. 2019. № 50 (1221). URL: <https://www.apteka.ua/article/527749> (дата звернення 03.01.2020).
- Котов Андрій Георгійович**. Д. фарм. н. (2014). Ст. н. с. (2004). Начальник відділу ДФУ ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів».
- Kotov Andrii Georgiiovich**. Sc. D. in Pharmacy (2014). Senior Researcher (2004). Head of the Department of the State Pharmacopoeia at Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center for Quality of Medicines.
- Котов Андрей Георгиевич**. Д. фарм. н. (2014). Ст. науч. сотр. (2004). Начальник отдела ГФУ ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств».
- Суворова Ирина Николаевна**. К. б. н. (2005). Директор Департаменту контролю якості лікарських засобів Державної служби України з лікарських засобів та контролю за наркотиками.
- Suvorova Iryna Mykolaivna**. Ph. D. in Biology (2005). Director of Department of the Medicines Quality Control at State Service of Ukraine on Medicines and Drugs Control.
- Суворова Ирина Николаевна**. К. б. н. (2005). Директор Департамента контроля качества лекарственных средств Государственной службы Украины по лекарственным средствам и контролю за наркотиками.
- Тимченко Ольга Володимирівна**. К. фарм. н. (2016). Ст. н. с. відділу ДФУ ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів».
- Tymchenko Olga Volodymyrivna**. Ph. D. in Pharmacy (2016). Senior Researcher of the Department at the State Pharmacopoeia of Ukraine at Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center for Quality of Medicines.
- Тимченко Ольга Владимировна**. К. фарм. н. (2016). Ст. науч. сотр. отдела ГФУ ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств».
- Останіна Наталія Вадимівна**. К. е. н. (2000). Завідувачка Державної науково-дослідної лабораторії з контролю якості лікарських засобів ДУ «Інститут громадського здоров'я ім. О.М. Марзеєва НАМНУ».
- Ostanina Nataliia Vadymivna**. Ph. D. in Economy (2000). Head of the State Scientific Research Laboratory for Quality Control of Medicines at State Institution «O.M. Marzieiev Institute for Public Health of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine».
- Останина Наталия Вадимовна**. К. э. н. (2000). Заведующая Государственной научно-исследовательской лабораторией контроля качества лекарственных средств ГУ «Институт общественного здоровья им. А.Н. Марзеева НАМНУ».

УДК 615.07

Кишинець Н. В., Тимченко О. В., Котляр В. О., Меркулова Ю. В., Яворський В. В., Малігон О. І., Безбородова І. А., Кононюк Ю. В., Мойсеєнко М. О.

Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», Харків, Україна

Комунальний заклад охорони здоров'я Харківський обласний центр служби крові, Харків, Україна

ТОВ «Лакс Системи Європа», Київ, Україна

Technopath Clinical Diagnostics, Ірландія

«Плазма для лабораторної діагностики *in vitro*» — нова національна індивідуальна монографія Державної Фармакопеї України

З огляду на жорсткі критерії до якості й умов зберігання свіжозамороженої плазми, призначеної для терапевтичного застосування, і більш лояльні вимоги до реактивів для лабораторної діагностики на основі плазми та її дериватів, розробка й введення до Державної Фармакопеї України національної індивідуальної монографії «Плазма для лабораторної діагностики *in vitro*» є цілком доречними й науково обґрунтованими. Монографія «Плазма для лабораторної діагностики *in vitro*» розроблена для регламентації показників якості плазми, яка не призначена для застосування людиною з лікувальною метою та для виробництва лікарських засобів для застосування людиною. У статті зазначено, що плазму для лабораторної діагностики *in vitro* застосовують для виготовлення медичних виробів для *in vitro* діагностичних цілей (тест-системи, тест-набори, тест-смужки, експрес-тести, діагностикуми, калібратори, контрольні речовини тощо). Для виробництва плазми для лабораторної діагностики *in vitro* можуть використовуватись продукти донорської крові, непридатні для терапевтичного застосування людиною, наприклад плазма, яка пройшла цикл(и) замороження-розмороження, в якій закінчився термін придатності, яка за будь-якими іншими показниками якості (окрім наявності інфекційних маркерів) не відповідає вимогам до лікарських засобів для застосування людиною; це продукти, зазначені в «Порядку контролю за дотриманням показників безпеки та якості донорської крові та її компонентів» (Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 09.03.2010 № 211) або інших чинних законодавчих актах. До них належать: плазма заморожена, плазма свіжозаморожена, плазма, збіднена кріопреципітатом, плазма лейкофільтрована, кріопреципітат заморожений. Уперше розроблена й науково обґрунтована класифікація плазми для лабораторної діагностики *in vitro*, в якій врахована ціла низка параметрів (активність фактора згортання крові VIII, вміст загального білка, дані візуальної оцінки тощо) і регламентовані термін і умови зберігання.

Ключові слова: Державна Фармакопея України, національна індивідуальна монографія ДФУ, продукти крові, компоненти крові, плазма людини, плазма для фракціонування, плазма свіжозаморожена, показники якості.

UDC 615.07

Summary

Kyshynets N. V., Tymchenko O. V., Kotlyar V. O., Merkulova Yu. V., Yavorskyi V. V.,

Malyhon O. I., Bezborodova I. A., Kononyuk Yu. V., Moysyenko M. O.

Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center for Quality of Medicines, Kharkiv, Ukraine

Kharkiv Regional Blood Center, Kharkiv, Ukraine

LAQC Systems Europe LLC, Kyiv, Ukraine

Technopath Clinical Diagnostics, Ireland

A new national individual monograph «Plasma for Laboratory Diagnostics *in vitro*» of the State Pharmacopoeia of Ukraine

Development of the national individual monograph «Plasma for laboratory diagnostics *in vitro*» and its inclusion in the State Pharmacopoeia of Ukraine is an urgent and scientifically reasonable task in view of the strict criteria for quality and storage conditions for fresh frozen plasma intended for therapeutic use and less stringent requirements for reagents for laboratory diagnostics based on plasma and its derivatives. The monograph «Plasma for laboratory diagnostics *in vitro*» is designed for standardization of quality attributes of plasma not intended for therapeutic use in humans or the manufacture of medicines for human use. The article notes that plasma for laboratory diagnostics *in vitro* is intended for the manufacture of medical devices for *in vitro* diagnostic purposes (test-systems, test-kits, test-strips, express-tests, diagnosticums, calibrators, reference substances, etc.). For manufacture of plasma for laboratory diagnostics *in vitro*, products of donor blood that are not acceptable for therapeutic use in humans can be used, for example, plasma that has undergone a freeze-thaw cycle, plasma whose shelf life has expired or plasma not meeting the requirements for medicines for human use by any quality attributes other than the presence of infectious markers. Such products are mentioned either in *The procedure for monitoring over safety and quality compliance of donor blood and its components* (Order of the Ministry of Health of Ukraine № 211 from 09.03.2010) or other legislative acts in force and include frozen plasma, fresh frozen plasma, cryoprecipitate-depleted plasma, leukoreduced plasma, frozen cryoprecipitate. For the first time, taking into account an array of parameters (activity of blood clotting factor VIII, total protein, visual assessment, etc.), the classification of plasma for laboratory diagnostics *in vitro* and its storage terms and conditions have been developed and scientifically substantiated.

Keywords: State Pharmacopoeia of Ukraine, national individual monograph, blood products, blood components, human plasma, plasma for fractionation, plasma fresh frozen, quality attributes.

УДК 615.07

Кишинец Н. В., Тимченко О. В., Котляр В. А., Меркулова Ю. В., Яворский В. В., Малигон О. И., Безбородова И. А., Кононюк Ю. В., Мойсеенко М. А.

Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств», Харьков, Украина

Коммунальное учреждение здравоохранения Харьковский областной центр службы крови, Харьков, Украина

ООО «Лакс Системы Европа», Киев, Украина

Technopath Clinical Diagnostics, Ирландия

«Плазма для лабораторной диагностики *in vitro*» — новая национальная индивидуальная монография Государственной Фармакопеи Украины

Учитывая жесткие критерии, предъявляемые к качеству и условиям хранения свежзамороженной плазмы, предназначенной для терапевтического применения, и более лояльные требования к реактивам для лабораторной диагностики на основе плазмы и ее дериватов, разработка и введение в Государственную Фармакопею Украины национальной индивидуальной монографии «Плазма для лабораторной диагностики *in vitro*» являются актуальными и научно обоснованными. Монография «Плазма для лабораторной диагностики *in vitro*» разработана с целью регламентации показателей качества плазмы, не предназначенной для применения человеком с лечебной целью и для производства лекарственных средств для применения человеком. В статье отмечено, что плазму для лабораторной диагностики *in vitro* применяют для изготовления медицинских изделий для *in vitro* диагностических целей (тест-системы, тест-наборы, тест-полоски, экспресс-тесты, диагностикумы, калибраторы, контрольные вещества и т. д.). Для производства плазмы для лабораторной диагностики *in vitro* могут использоваться продукты донорской крови, непригодные для терапевтического применения у человека, например плазма, которая прошла цикл(ы) замораживания-размораживания, у которой истек срок годности или которая по каким-либо другим показателям качества (кроме наличия инфекционных маркеров) не соответствует требованиям к лекарственным средствам для применения человеком; это продукты, указанные в «Порядку контролю за дотриманням показників безпеки та якості донорської крові та її компонентів» (Приказ Минздрава Украины от 09.03.2010 № 211) или других действующих законодательных актах. К ним относятся: плазма замороженная, плазма свежзамороженная, плазма обедненная криопреципитатом, плазма лейкофильтрованная, криопреципитат замороженный. Впервые разработана и научно обоснована классификация плазмы для лабораторной диагностики *in vitro*, в которой учтен целый ряд параметров (активность фактора свертывания крови VIII, содержание общего белка, данные визуальной оценки и т. д.) и регламентируется срок и условия хранения.

Ключевые слова: Государственная Фармакопея Украины, национальная индивидуальная монография ГФУ, продукты крови, компоненты крови, плазма человека, плазма для фракционирования, плазма свежзамороженная, показатели качества.

Клінічне застосування донорської крові та її препаратів відіграє значну роль у сучасній системі охорони здоров'я, тому питання заготівлі, переробки, забезпечення інфекційної безпеки й контролю якості донорської крові становлять одну з важливих ланок системи національної безпеки держави. Плазма крові людини є унікальним біологічним матеріалом і містить велику кількість різних за складом і властивостями біологічно активних сполук, що відіграють важливу роль у виконанні ряду життєвих функцій і процесів в організмі. Лікарські препарати з плазми крові людини введені до Національного переліку основних лікарських засобів (*Свіжозаморожена плазма, Препарати на основі (похідні) плазми крові*). Ця група лікарських засобів належить до категорії життєво необхідних [1, 2].

Плазма крові людини може бути використана як терапевтичний засіб (відома як свіжозаморожена плазма), а також як вихідна сировина для отримання фармацевтичних препаратів після фракціонування. Донорська плазма — це комплексний біологічний матеріал, який містить велику кількість білків, що охоплюють широкий спектр фізіологічних функцій. Білки — найбільш цінні складові плазми крові, деякі з них отримують промисловим способом і використовують як лікарські засоби для ліку-

вання важких захворювань, пошкоджень, що пов'язані з кровотечею та тромботичними розладами, імунологічними, інфекційними й дегенеративними захворюваннями [1, 3].

Для підвищення рівня забезпечення високоякісними й безпечними препаратами крові в Україні має бути створена сучасна індустрія переробки крові, що дозволить виробляти вітчизняні препарати з фракцій крові: альбумін, імуноглобулін, антирезусний імуноглобулін, фактор VIII, які використовують для рятування життя під час значних крововтрат і для корекції низки успадкованих патологій.

Наразі нормативно-законодавча база, яка регулює обіг і використання продуктів крові, застаріла, більшість її положень і вимог втратили актуальність. Станом на сьогодні в Україні відсутня єдина загальнонаціональна злагоджена система заготівлі крові та гемотерапії, що так само негативно впливає на забезпечення населення якісними, безпечними й ефективними як компонентами, так і препаратами крові.

Як кожний біологічний продукт, плазма має суворо визначений термін використання та зберігання і не може бути використана після їх закінчення, оскільки втрачаються її лікувальні властивості.

У лікувальній практиці широко застосовують свіжозаморожену плазму, криопреципітат

і препарати плазми: альбумін, імуноглобуліни, концентрати факторів згортання крові, фізіологічні антикоагулянти (антитромбін III, білки C і S), компоненти фібринолітичної системи. Альбумін й імуноглобуліни класів G (*IgG*), M (*IgM*) і A (*IgA*) становлять більше 80 % від усіх білків плазми крові [4].

У свіжозамороженій плазмі в оптимальному співвідношенні зберігаються лабільні (V і VIII) і стабільні (I, II, VII, IX) фактори згортання крові. У технологічно правильно приготуваній свіжозамороженій плазмі рівень фактора VIII має становити не менше 70 % від початкового. Відокремлену від еритроцитів плазму потрібно заморожувати так, щоб у процесі охолодження температура впродовж однієї години знизилась до мінус 70 °С. Зберігають свіжозаморожену плазму за температури мінус 30 °С та нижче протягом 3 років, а за температури мінус 18-25 °С — не більше трьох місяців. Такі технологічні вимоги до свіжозамороженої плазми є обов'язковими, адже саме від якості свіжозамороженої плазми залежить її ефективність. Саме тому Радою Європи рекомендовано через кожні два місяці перевіряти якість свіжозамороженої плазми в партії за рівнем фактора VIII. Його рівень постійно має перевищувати 70 % [4, 5].

Потрібно, щоб свіжозаморожена плазма відповідала таким *стандартним критеріям якості*: білка — не менше 50 г/л, гемоглобіну — не більше 0.05 г/л, калію — не більше 5 ммоль/л. Рівень трансаміназ має бути в межах фізіологічної норми, результати аналізів на маркери сифілісу, гепатитів В і С, ВІЛ-інфекцію — негативні. Після розморожування свіжозаморожена плазма має бути використана впродовж однієї години. Повторне її заморожування неприпустиме. Свіжозаморожена плазма застосовується у випадках розладів згортання крові, особливо в тих клінічних ситуаціях, коли існує множинний дефіцит факторів згортання. Свіжозаморожена плазма може використовуватись під час лікування тромбцитопенічної пурпури [3].

Компонент донорської плазми, отриманий із свіжозамороженої плазми преципітацією білків методом заморожування-розморожування з подальшим концентруванням і ресуспендуванням осаджених білків у малому об'ємі плазми, називають *кріопреципітатом*. Кріопреципітат — білковий препарат ізогенної плазми крові людини, який має у своєму складі антигемофільні фактори — нерозчинна на холоді фракція донорської плазми, що залишається після розморожування свіжозамороженої плазми за тем-

ператури від 1 до 6 °С. Цей осад кріоглобулінів містить близько 50 % фактора VIII, 20-40 % фібриногену, домішки фактора XIII, фібрoneктин. Антигемофільний фактор VIII може бути у формі VIII:С й у формі VIII:ФВ (фактор Віллебранда) [4, 5]. Кріопреципітат виявляє антигеморагічну дію за умов підвищеної кровоточивості, пов'язаної зі зниженням активності вмісту антигемофільного глобуліну (фактор VIII:С), фактора Віллебранда (фактор VIIIvW), фібринстабілізуючого фактора (фактор XIII) та фібриногену (фактор I) [4, 5].

У лабораторній діагностиці *in vitro* для контролю правильності визначення параметрів гемостазу людини за норми й патології застосовують реагент «Плазма контрольна» (пульована контрольна плазма, зібрана від 20 донорів віком 20-40 років, стабілізована НЕРЕС-цитратним буфером і ліофільно висушена). Плазма контрольна використовується для визначення параметрів системи згортання (протромбіновий час, тромбіновий час, АЧТЧ, вміст фібриногену, активність факторів внутрішнього шляху згортання VIII, IX, XI і XII, активність факторів зовнішнього шляху згортання II, VII і X, активність фактора XIII, активність фактора Віллебранда), протизгортальної системи (активність антитромбіну III, активність протеїну С) і фібринолітичної системи (активність плазміногену, активність інгібітора плазміну). Плазма контрольна також може застосовуватись для проведення контролю якості реагентів, що використовуються під час дослідження системи гемостазу [6].

Для проведення контролю якості лікарських засобів, які впливають на гемостаз людини, використовують цілу низку біологічних стандартних препаратів (*БСП*), які містять різні фактори згортання крові (наприклад, *БСП плазми факторів згортання крові V, VIII, XI та XIII, БСП плазми фактора згортання крові VIII, БСП плазми фактора згортання крові IX, БСП анти-D-імуноглобуліну людини* тощо), і реактивів, виготовлених із плазми крові (наприклад, *антитромбіну III розчин, субстрат плазми дефіцитної за фактором V, ліофілізовані концентрати факторів згортання крові людини* тощо) [7-9].

У різних країнах світу для переробки використовується 18.5 млн літрів плазми на рік, зокрема в Європі — 7.7 млн літрів. Відповідно до рекомендацій ВООЗ, з огляду на кількість населення, службі крові України потрібно за рік переробляти на препарати не менш ніж 141 тис. літрів плазми крові. Проте в Україні за останні 15 років відбулось радикальне скорочення ви-

робничих потужностей закладів служби крові: у 2016-2017 роках всі обласні установи служби крові припинили власне виробництво препаратів крові, виведені з експлуатації потужні виробництва Донецької та Луганської областей.

У зв'язку із закінченням дії сертифіката про державну реєстрацію медичного імунобіологічного препарату альбуміну й зміною вимог до виробництва препаратів крові, відсутністю урегульованих питань на рівні держави й відсутністю можливостей самостійної переробки донорської плазми на препарати крові установи служби крові України накопичують значні об'єми плазми, яка непридатна для лікувальних цілей за своїми показниками якості, що зумовлює додаткові витрати бюджетних коштів на її зберігання та утилізацію. Але нагальним залишається питання щодо реалізації плазми, яка не відповідає вимогам якості монографії ДФУ «Плазма людини для фракціонування». На сьогодні установи служби крові України зберігають плазму, яка може бути використана не тільки для виробництва препаратів крові, а й для виробництва діагностичних стандартів *in vitro*. Через відсутність наразі нормативної документації щодо плазми для виробництва діагностичних стандартів *in vitro* така сировина підлягає утилізації по закінченню терміну зберігання.

Плазма, яка непридатна для лікувальних цілей, може бути використана тільки через передачу суб'єктам господарювання для виробництва препаратів крові на договірних умовах.

Для раціонального й бережливого використання донорської плазми й уникнення накопичення закладами служби крові України значних її залишків потрібна своєчасна реалізація плазми, яка непридатна для переливання та подальшого використання з лікувальною метою, але може використовуватися для виробництва діагностичних стандартів *in vitro*. Це може бути реалізовано фракціонуванням із використанням виробничих потужностей як усередині країни, так і за її кордоном. Проте перед використанням плазма потребує оцінювання її якості.

З огляду на жорсткі вимоги до зберігання та якості свіжозамороженої плазми в разі терапевтичного застосування та більш лояльні критерії в разі виготовлення реактивів для лабораторної діагностики, надзвичайно актуальним й економічно обґрунтованим є введення до Державної Фармакопеї України (ДФУ) національної індивідуальної монографії «Плазма для лабораторної діагностики *in vitro*».

Монографія «Плазма для лабораторної діагностики *in vitro*» розроблена для встановлення критеріїв якості плазми, яка не призначена

для застосування людиною з лікувальною метою або для виробництва лікарських засобів, які застосовуються людиною.

Плазма для лабораторної діагностики *in vitro* — це рідка частина крові людини, яка залишається після відокремлення клітинних елементів крові, зібрана в контейнер, що містить антикоагулянт, або розділена безперервною фільтрацією або центрифугуванням під час аферезу. У замороженому стані це щільна затверділа маса від прозорої до злегка каламутної, без видимих ознак гемолізу; від світло-жовтого до зеленуватого кольору.

Плазма для лабораторної діагностики *in vitro* призначена для виготовлення медичних виробів для *in vitro* діагностичних цілей (тест-системи, тест-набори, тест-смужки, експрес-тести, діагностикуми, калібратори, контрольні речовини тощо) та не призначена для застосування людиною з лікувальною метою або для виробництва лікарських засобів, які застосовуються людиною.

Для виробництва плазми для лабораторної діагностики *in vitro* можуть використовуватися продукти донорської крові, непридатні для терапевтичного та ін'єкційного застосування людиною, наприклад плазма, яка пройшла цикл(и) замороження-розмороження, в якій закінчився термін придатності, яка за будь-якими іншими показниками якості (окрім наявності інфекційних маркерів) не відповідає вимогам до лікарських засобів для застосування людиною, і продукти, зазначені в «Порядку контролю за дотриманням показників безпеки та якості донорської крові та її компонентів» (Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 09.03.2010 № 211) або в подальших переглядах чи інших діючих законодавчих актах. Це такі продукти донорської крові:

- плазма заморожена;
- плазма свіжозаморожена;
- плазма, збіднена кріопреципітатом (кріосупернатантна плазма);
- плазма лейкофільтрована;
- кріопреципітат заморожений.

Плазма для лабораторної діагностики *in vitro* може містити антикоагулянт (наприклад, ACDA, CPD, CPDA-1, CP2D, CPD2 тощо).

Щодо донорів, забору крові та ведення записів плазма для лабораторної діагностики *in vitro* має відповідати вимогам індивідуальної монографії «Плазма людини для фракціонування».

Для збирання та зберігання використовують контейнери, які мають відповідати вимогам ДФУ щодо скляних контейнерів або пласт-

масових контейнерів для крові та компонентів крові. Контейнери закривають так, щоб запобігти забрудненню.

Для продуктів крові, які використовують для виготовлення плазми для лабораторної діагностики *in vitro*, обов'язково мають бути продемонстровані негативні результати лабораторних випробувань щодо блідої спірохети (*Treponema pallidum*) і щодо кожного з таких вірусних маркерів:

- антитіла до 1-го типу вірусу імунодефіциту людини (anti-HIV-1) або геном;
- антитіла до 2-го типу вірусу імунодефіциту людини (anti-HIV-2) або геном;
- поверхневий антиген гепатиту В (HBsAg);
- антитіла до вірусу гепатиту С (anti-HCV) або геном.

За потреби демонструють також відсутність таких вірусних маркерів:

- внутрішній антиген гепатиту В (HBcAb);
- антитіла до 1-го типу Т-лімфотропного вірусу людини (anti-HTLV 1);
- антитіла до 2-го типу Т-лімфотропного вірусу людини (anti-HTLV 2).

Методи, які використовують під час лабораторних випробувань, мають бути достатньо чутливими, специфічними й відповідати чинним вітчизняним і ратифікованим в Україні міжнародним нормативним документам.

Окрім випробування на інфекційні маркери, обов'язковими є випробування на визначення кількісного вмісту загального білка й фактора згортання крові VIII.

Випробування можна проводити одним із наведених нижче методів, допускається проводити іншим придатним валідованим методом.

Загальний білок. Відповідний об'єм лікарського засобу розводять розчином 9 г/л *натрію хлориду Р* до одержання розчину з концентрацією білка близько 15 мг у 2 мл. 2.0 мл одержаного розчину поміщають у круглодонну центрифужну пробірку, додають 2 мл розчину 75 г/л *натрію молібдату Р* і 2 мл суміші *сірчаної кислоти, вільної від азоту, Р* і *води Р* (1:30), струшують і центрифугують протягом 5 хв. Відбирають надосадову рідину, пробірку перевертають на фільтрувальний папір для видалення рідини. Визначають азот у залишку методом мінералізації сірчаною кислотою. Вміст білка обчислюють, помноживши одержаний результат на 6.25.

Також допускається проводити випробування методом, який наведено в статті «*Загальний білок*» (2.5.33) діючої редакції ДФУ.

Фактор згортання крові VIII. Розморожують зразки, якщо потрібно, за температури 37 °С. Кількісне визначення фактора згортання крові VIII проводять, використовуючи стандартну плазму, калібровану за міжнародним стандартом фактора згортання крові VIII у плазмі відповідно до вимог статті ДФУ («*Кількісне визначення фактора згортання крові VIII*» (2.7.4)).

Залежно від терміну зберігання, та/або кількісного вмісту загального білка, та/або активності фактора згортання крові VIII, та/або змін зовнішнього вигляду (ідентифікації) плазму для лабораторної діагностики *in vitro* зараховують до того чи іншого класу:

1 клас — термін зберігання до 12 місяців включно та/або активність фактора згортання крові VIII — не менше 0.5 МО/мл; вміст загального білка — не менше 45 г/л;

2 клас — термін зберігання до 24 місяців включно та/або активність фактора згортання крові VIII — не менше 0.4 МО/мл; вміст загального білка — не менше 45 г/л;

3 клас — або термін зберігання 36 місяців і більше та/або активність фактора згортання крові VIII — не менше 0.3 МО/мл; вміст загального білка — не менше 45 г/л;

4 клас — плазма, що пройшла цикл(и) розморожування/заморожування, термін зберігання не регламентується; активність фактора згортання крові не регламентується; вміст загального білка — 45 г/л і менше; зміни зовнішнього вигляду тощо.

Заморожену плазму зберігають і транспортують за умов, що забезпечують температуру – 20 °С або нижче; під час зберігання та транспортування випадково температура зберігання може піднятися вище – 20 °С один або більше разів, але плазма вважається придатною для застосування, якщо її можливо зарахувати до того чи іншого класу.

Одним із важливих етапів виготовлення плазми є маркування, яке має відповідати вимогам нормативної документації щодо маркування продуктів крові. У маркуванні плазми має бути зазначене таке:

- дата заготівлі (де доцільно, час заготівлі);
- назва закладу, що здійснивав заготівлю/виготовлення;
- назва продукту згідно зі встановленим переліком;
- індивідуальний номер і штрих-код донорської, передбачений автоматизованою комп'ютерною системою;
- об'єм;
- назва й склад консервувального розчину;

- група крові за системою АВ0, Rh, де доцільно;
- позначка про результати випробувань щодо інфекційних маркерів;
- позначка щодо карантинізації;
- індивідуальний номер і штрих-код продукту, передбачений автоматизованою комп'ютерною системою;
- клас, до якого зараховано плазму;
- позначка «Не для терапевтичних цілей»;
- позначка «Не для застосування людиною!»;
- умови зберігання;
- термін придатності.

Висновки

Реалізована нагальна потреба розробки національної монографії «Плазма для лабораторної діагностики *in vitro*», що є важливим і невід'ємним доповненням до загальної системи контролю якості й безпеки донорської крові та її компонентів, а також фармацевтичних препаратів, які з них виготовлені.

Уперше розроблена й науково обґрунтована класифікація плазми для лабораторної діагностики *in vitro*, яка враховує цілу низку показників, зокрема активність фактора згортання крові VIII, вміст загального білка, дані візуального оцінювання, і регламентує термін і умови зберігання.

Національна монографія «Плазма для лабораторної діагностики *in vitro*» є особливою серед індивідуальних монографій ДФУ, тому що встановлює критерії якості продуктів крові людини, які не призначені для застосування людиною або для виробництва лікарських засобів.

Національна монографія «Плазма для лабораторної діагностики *in vitro*» містить критерії якості плазми, яку використовують для виготовлення медичних виробів для *in vitro* діагностичних цілей (тест-системи, тест-набори, тест-смужки, експрес-тести, діагностикуми, калібратори, контрольні речовини тощо), стандартизує термін і умови її зберігання.

ЛІТЕРАТУРА

1. Зубкова Н.В. Биотехнологические аспекты эффективной и безопасной переработки донорской плазмы: проблемы и перспективы. *Биопрепараты*. 2014. 1 (49). С. 4-10.
2. Національний перелік основних лікарських засобів. Перше видання (листопад 2016). Адаптований на основі Базового переліку основних лікарських засобів ВООЗ, 19-е видання, 2015 р. С. 25. URL: https://moz.gov.ua/uploads/0/290-nacionalnij_perelik_osnovnih_likarskih_zasobiv.pdf (дата звернення 14.11.2019).
3. Волкова Л.В., Шульц Е.В. Перспективы использования побочных продуктов фракционирования донорской плазмы. *Химическая технология и биотехнология*. 2015. № 4. С. 49–62.
4. Компоненти крові та їх застосування : навч. посіб. / Павлов О.О. та ін. Харків, 2015. 65 с. URL: <http://transfusiology.com.ua/wp-content/uploads/2018/12/Komponenty-krovy.pdf> (дата звернення: 10.11.2019).

com.ua/wp-content/uploads/2018/12/Komponenty-krovy.pdf (дата звернення: 10.11.2019).

5. Клінічне застосування компонентів та препаратів з донорської крові : Клінічна настанова, заснована на доказах. 2017. С. 31-46. URL: http://mtd.dec.gov.ua/images/dodatki/KN/KN_Transf.pdf (дата звернення 10.11.2019).
6. Інструкція по застосуванню набору Плазма-У-20 контрольна. URL: plazma-kontrolna-u-20.pdf (дата звернення: 10.11.2019).
7. Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 2-е вид. Харків : Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2015. Т. 1. 1128 с.
8. Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 2-е вид. Харків : Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2014. Т. 2. С. 538-543.
9. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 10th Edition (Supplement 10.1). URL: [https://pheur.edqm.eu/app/10-1/search?chapter=11396&title=European%20Pharmacopoeia%2010.1, обмежений](https://pheur.edqm.eu/app/10-1/search?chapter=11396&title=European%20Pharmacopoeia%2010.1,обмежений).

Кишинець Неля Віталіївна. Ст. н. с. відділу Державної Фармакопеї України ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів».

Kyshynets Nelya. Senior Researcher of the Department of the State Pharmacopoeia of Ukraine at Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Centre for Quality of Medicines.

Кишинець Неля Витальевна. Ст. науч. сотр. отдела Государственной Фармакопеи Украины ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств».

Тимченко Ольга Володимирівна. К. фарм. н. (2016). Ст. н. с. відділу ДФУ ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів».

Tymchenko Olga Volodymyrivna. Ph. D. in Pharmacy (2016). Senior Researcher of the Department of the State Pharmacopoeia of Ukraine at Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center for Quality of Medicines.

Тимченко Ольга Владимировна. К. фарм. н. (2016). Ст. науч. сотр. отдела ГФУ ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств».

Котляр Валентина Олександрівна. Ст. н. с. відділу Державної Фармакопеї України ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів».

Kotlyar Valentina. Senior Researcher of the Department of the State Pharmacopoeia of Ukraine at Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Centre for Quality of Medicines.

Котляр Валентина Александровна. Ст. науч. сотр. отдела Государственной Фармакопеи Украины ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств».

Меркулова Юлія Вадимівна. К. б. н. (2002), провідн. н. с. Лабораторії фармакопейного аналізу ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів».

Merkulova Yuliya. Ph. D. in Biology (2002), Leading Researcher of the Laboratory of Pharmacopoeial Analysis at Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Centre for Quality of Medicines.

Меркулова Юлія Вадимовна. К. б. н. (2002), ведущ. науч. сотр. Лаборатории фармакопейного анализа ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств».

Яворський Вадим Володимирович. К. мед. н. (2014), доцент кафедри анестезіології, інтенсивної терапії, трансфузіології та гематології ХМАПО, голов. лікар Комунального закладу охорони здоров'я Харківського обласного центру служби крові, лікар-трансфузіолог.

Yavorskyi Vadym. Ph. D. in Medicine (2014), Chief Physician at Kharkiv Regional Blood Center, transfusiologist.

Яворский Вадим Владимирович. К. мед. н. (2014), доцент кафедры анестезиологии, интенсивной терапии, трансфузиологии и гематологии ХМАПО, гл. врач Коммунального учреждения здравоохранения Харьковского областного центра службы крови, врач-трансфузиолог.

Малігон Олена Іванівна. К. мед. н. (2014), асистент кафедри анестезіології, інтенсивної терапії, трансфузіології та гематології ХМАПО, заст. голов. лікаря з медичних питань Комунального закладу охорони здоров'я Харківського обласного центру служби крові, лікар-трансфузіолог.

Malyhon Olena. Ph. D. in Medicine (2014), Deputy Chief Physician at Kharkiv Regional Blood Center, transfusiologist.

Малигон Елена Ивановна. К. мед. н. (2014), ассистент кафедры анестезиологии, интенсивной те-

рапии, трансфузиологии и гематологии ХМАПО, зам. гл. врача по медицинской части Коммунального учреждения здравоохранения Харьковского областного центра службы крови, врач-трансфузиолог.

Безбородова Ірина Анатоліївна. Начальник відділу управління та забезпечення якості Комунального закладу охорони здоров'я Харківського обласного центру служби крові.

Bezborodova Iryna. Head of Management and Quality Assurance Department at Kharkiv Regional Blood Center.

Безбородова Ирина Анатольевна. Начальник отдела управления и обеспечения качества Коммунального учреждения здравоохранения Харьковского областного центра службы крови.

Кононюк Юрій Володимирович. Директор з інформаційних технологій компанії Technopath Clinical Diagnostics (Ірландія).

Kononyuk Yuriy. Chief Informatics Officer at Technopath Clinical Diagnostics (Ireland).

Кононюк Юрий Владимирович. Директор по информационным технологиям компании Technopath Clinical Diagnostics (Ирландия).

Мойсеєнко Марина Олександрівна. Заступник директора, представник з контролю якості ТОВ «Лакс Системи Європа».

Moiseyenko Maryna. Deputy Director, Quality Control Representative at LAQC Systems Europe LLC.

Мойсеенко Марина Александровна. Заместитель директора, представитель по контролю качества ООО «Лакс Системы Европа».

Фітохімічні дослідження

УДК 615.451.1+582.943

Сас І. А.

Івано-Франківський національний медичний університет, Україна

Дослідження седативної активності екстрактів видів роду Буквиця — *Betonica* (L.)

Наявність у траві видів роду Буквиця певного складу біологічно активних речовин (фенілетаноїдні глікозиди (бетоніозиди А-Ф), флавоноїди, іридоїди, амінокислоти, алкалоїд стахидрин та ін.), а також напрями її використання в народній медицині, зокрема для терапії захворювань нервової системи (неврози, запаморочення, безсоння, неврастенія, мігрень), вказують на перспективність дослідження седативної активності цієї лікарської рослинної сировини. Раніше нами були отримані й стандартизовані сухі екстракти трави буквиці перебільшеної (*Betonica perauca* Klokov) та б. короткозубої (*B. brachydonta* Klokov), род. Губоцвіті — *Lamiaceae* (екстрагенти — вода очищена й спирт етиловий 70%), а також досліджено їх безпечність для живих організмів. У цій статті представлено результати вивчення седативної активності сухих екстрактів трави б. перебільшеної та б. короткозубої. Для вивчення седативної активності екстрактів використано стандартний скринінговий поведінковий тест «Відкрите поле», який дає змогу виявити характер впливу досліджуваного комплексу на центральну нервову систему. В процесі тесту оцінювали локомоторну активність мишей (кількість перетнутих квадратів арени), орієнтовно-дослідницьку активність (кількість вертикальних стійок без опори й з опорою і кількість обстежених отворів арени), активність вегетативного супроводу емоційного стану тварин (кількість актів дефекації, уринації і грумінгу). У результаті проведених досліджень встановлено, що внутрішньошлункове введення екстрактів в умовно ефективній дозі 100 мг/кг маси тіла викликало зниження активності мишей порівнюючи з контролем (екстракт кропиви собачої). Найбільш суттєве зниження активності мишей викликало введення екстракту трави б. перебільшеної (екстрагент — вода очищена) — на 47.62%; крім того, активність цього екстракту в досліді перевищує активність екстракту кропиви собачої в 1.83 рази; найменше зниження активності мишей викликало введення екстракту трави б. короткозубої (екстрагент — спирт етиловий 70%) — на 13.10%. Отримані результати свідчать про перспективність проведення додаткових досліджень у цьому напрямі й подальшого створення нового лікарського засобу із седативною дією на основі трави б. перебільшеної.

Ключові слова: седативна активність, тест «Відкрите поле», екстракт трави, буквиця перебільшена, буквиця короткозуба.

UDC 615.451.1 + 582.943

Summary

Sas I. A.

Ivano-Frankivsk National Medical University

Research of the sedative activity of extracts of the genus *Betonica* (L.) species

The prospects of studying the sedative activity of the herb of the species of the genus *Betonica* (L.) are evident due to the presence of certain biologically active substances (phenylethanol glycosides (betonicosides A-F), flavonoids, iridoids, amino acids, alkaloid of stachidrine, etc.) in this herbal drug and its widespread use in alternative medicine, in particular for therapy of neuroses, vertigo, insomnia, neurasthenia and migraines. Earlier, we have obtained and standardized the dry extracts of the herb of *Betonica perauca* and *Betonica brachydonta* (extractants — purified water and ethanol 70 %) and investigated their safety for living organisms. This article presents the results of the study of sedative activity of the dry extracts of the herb of *Betonica perauca* Klokov and *Betonica brachydonta* Klokov of *Lamiaceae* family. To study the sedative activity of the extracts, a conventional Open Field screening behavioural test was used, which allows determining the effect of the complex being studied on the central nervous system. The locomotor activity, orienting-research activity and activity of vegetative support of the emotional state of mice were studied during the test. Studies have shown that intragastric administration of extracts at a relatively effective dose of 100 mg/kg body weight causes a decrease in the activity of mice compared to the reference drug (*Leonurus cardiaca* extract). The most considerable decrease detected in the mice activity (by 47.62 %) was caused by the administration of *Betonica perauca* herb extract (extractant — purified water), which exceeded the activity of *Leonurus cardiaca* extract by 1.83 times, and the slightest decrease (by 13.10 %) was observed after the administration of *Betonica brachydonta* herb extract (extractant — 70 % ethanol). The results obtained are a rationale for further research aimed at the development of a new sedative herbal drug containing *Betonica perauca* herb.

Keywords: sedative activity, open field test, herb extract, *Betonica perauca*, *Betonica brachydonta*.

УДК 615.451.1 + 582.943

Резюме

Сас І. А.

Івано-Франківський національний медичний університет, Україна

Исследование седативной активности экстрактов видов рода Буквица — *Betonica* (L.)

Наличие в траве видов рода Буквица определенного состава биологически активных веществ (фенилэтанойдные гликозиды (бетониозиды А-Ф), флавоноиды, иридоиды, аминокислоты, алкалоид стахидрин и др.), а также пути ее использования в народной медицине, в частности для терапии заболеваний нервной системы (неврозы, головокружение, бессонница, неврастения, мигрени), указывают на перспективность исследования седативной активности данного лекарственного растительного сырья. Ранее нами были получены и стандартизованы сухие экстракты травы буквицы переувеличенной (*Betonica perauca* Klokov) и б. короткозубой (*Betonica brachydonta* Klokov), сем. Губоцветные (*Lamiaceae*)

(экстрагенты — вода очищенная и спирт этиловый 70%), а также исследована их безопасность для живых организмов. В этой статье представлены результаты изучения седативной активности сухих экстрактов травы б. преувеличенной и б. короткозубой. С целью изучения седативной активности экстрактов использован стандартный скрининговый поведенческий тест «Открытое поле», позволяющий выявить характер влияния исследуемого комплекса на центральную нервную систему. В процессе теста оценивали локомоторную активность мышей (количество пересеченных квадратов арены), ориентировочно-исследовательскую активность (количество вертикальных стоек без опоры и с опорой и количество обследованных отверстий арены), активность вегетативного сопровождения эмоционального состояния животных (количество актов дефекации, урикации и груминга). В результате проведенных исследований установлено, что внутрижелудочное введение экстрактов в условно эффективной дозе 100 мг/кг массы тела вызвало снижение активности мышей по сравнению с контролем (экстракт пустырника). Наиболее существенное снижение активности мышей вызвало введение экстракта травы б. преувеличенной (экстрагент — вода очищенная) — на 47.62 %; кроме того, активность данного экстракта в опыте превышает активность экстракта пустырника в 1.83 раза; наименьшее снижение активности мышей вызвало введение экстракта травы б. короткозубой (экстрагент — спирт этиловый 70%) — на 13.10 %. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности проведения дополнительных исследований в этом направлении и последующей разработки нового лекарственного средства с седативным действием на основе травы б. преувеличенной.

Ключевые слова: седативная активность, тест «Открытое поле», экстракт травы, буквица преувеличенная, буквица короткозубая.

Аналіз літературних джерел вказує на те, що трава буквиці чинить заспокійливу дію на центральну нервову систему (ЦНС). Наявність у досліджуваній рослинній сировині таких біологічно активних речовин, як фенілетаноїдні глікозиди (бетоніозиди А-Ф), флавоноїди й іридоїди, також створює підґрунтя для прогнозування психотропних властивостей екстрактів, отриманих із трави б. перебільшеної та б. короткозубої. Зокрема, апігенін є флавоноїдом, що міститься в рослинах роду Буквиця. Встановлено, що апігенін проявляє анксиолітичні властивості, конкурентно інгібує зв'язування флунітразепаму з мозковими мембранами, не впливаючи на зв'язування мусцимолу з рецепторами ГАМК_A. Вплив апігеніну на рецептори ГАМК_A є складним і охоплює як флумазенілочутливі, так і флумазенілочутливі компоненти. Крім того, й інші рецептори можуть бути задіяні в поведінковому ефекті апігеніну [1, 2]. Іридоїди (гарпагід, ацетилгарпагід тощо) й алкалоїд стахідрин також зумовлюють седативну дію витягів із рослин, що їх вміщують. Стахідрин у досліді на серці жаби сповільнює частоту серцевих скорочень, прискорює відновлення рефлексів ЦНС, паралізованих зупинкою кровообігу [3].

Трава буквиці є компонентом біологічно активних добавок закордонного виробництва, які випускають у формі капсул і настоянок і рекомендують вживати як заспокійливі засоби [4-7]. Також нами було проаналізовано склад 104 зборів народної медицини, які містять траву б. лікарської. З них 7 (6.73 %) зборів були призначені для терапії захворювань нервової системи (неврози, запаморочення, безсоння, неврастениї, мігрені) [8-10].

Усе це вказує на актуальність вивчення седативної активності екстрактів сухих із трави видів роду Буквиця для подальшого створення

стандартизованих лікарських засобів на основі досліджуваної сировини.

Метою роботи було дослідження впливу на рухову активність мишей екстрактів сухих трави видів роду Буквиця — *Betonica* (L.), род. Губоцвіті (*Lamiaceae*), що зростають на території України, а саме б. перебільшеної (*Betonica perauca* Klokov) і б. короткозубої (*Betonica brachydonta* Klokov).

Матеріали й методи досліджень

Об'єктами цього дослідження були сухі екстракти трави б. перебільшеної та б. короткозубої, отримані за допомогою води очищеної та 70% етанолу. Попередньо було встановлено, що ці екстракти нетоксичні для живих організмів [11].

Вивчення психотропних властивостей досліджуваних екстрактів було проведено за допомогою стандартного скринінгового поведінкового тесту «Відкрите поле», що дає змогу виявити характер впливу комплексу на ЦНС і широко використовується вченими для вивчення нейротропних властивостей екстрактів із лікарської рослинної сировини [12-16].

Отримання екстрактів і дослідження їх седативної активності проводили на базі кафедри фармації та віварію Івано-Франківського національного медичного університету (ІФНМУ) під керівництвом проф. Грицика А. Р. й за консультативної допомоги завідувача кафедри біологічної та медичної хімії ім. акад. Г. О. Бабенка д. б. н., проф. Ерстенюк Г. М. і доцента кафедри анатомії людини, к. мед. н. Іваночка В. М.

Для дослідження використовували білих нелінійних статевозрілих мишей-самців масою 18-22 г, які були вирощені у віварії ІФНМУ й стандартизовані за фізіологічними й біохімічними показниками. Тварини перебували в умовах віварію з дотриманням вимог санітарно-гігієнічних норм у пластикових клітках на стан-

дартному харчовому раціоні. Утримання тварин і маніпуляції з ними проводили відповідно до міжнародних і вітчизняних вимог щодо гуманного ставлення до тварин, що узгоджуються з положеннями Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986 р.), Директиви Ради Європи 86/609/ЕЕС (1986 р.), Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження», загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених першим Національним конгресом України з біоетики (2001 р.) [17-19].

Тварини були розділені на 6 груп по 6 тварин у кожній. Тваринам першої та другої груп вводили екстракти сухі з трави б. перебільшеної, отримані водою очищеною (БПВ) і 70% етанолом (БПС) відповідно; тваринам третьої та четвертої груп — екстракти сухі з трави б. короткозубої, отримані водою очищеною (БКВ) і 70% етанолом (БКС) відповідно; тваринам п'ятої групи вводили препарат порівняння — екстракт кропиви собачої (КС); тваринам шостої (контрольної) групи вводили розчинник (вода очищена). Як препарат порівняння обрано екстракт кропиви собачої (пустирника), оскільки ця рослина належить до тієї самої родини (*Lamiaceae*), що й досліджувані види, містить подібний склад

БАР, а також є препаратом із доведеною седативною дією.

Досліджувані екстракти й препарат порівняння вводили у формі розчинів внутрішньошлунково в дозі 100 мг/кг протягом 3 діб (востаннє за 30 хв до проведення тесту).

Експериментальна установка «Відкрите поле» — це арена з діаметром дна 63 см і висотою стінок 32 см. Дно арени поділене на 3 ряди секторів однакової площі з 13 отворами діаметром 1 см. Колір арени сірий, оскільки є найбільш комфортним для тварин. Після перебування в затемненому місці протягом 3 хв мишу залишали в центрі поля та спостерігали за її поведінкою протягом 3 хв. Оцінювали локомоторну активність (кількість перетнутих квадратів, або горизонтальна активність), орієнтовно-дослідницьку активність (кількість вертикальних стійок без опори й з опорою, або вертикальна активність, та кількість обстежених отворів), активність вегетативного супроводу емоційного стану тварин (кількість актів дефекації, уринації та грумінгу).

Отримані результати пройшли статистичну обробку з використанням t-критерію Стьюдента й вважалися статистично значущими за $p < 0.05$.

Таблиця 1

Показники тесту «Відкрите поле»

Показники	Досліджувані групи тварин, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, $n = 6$					
	Контроль	КС	БПВ	БПС	БКВ	БКС
Локомоторна активність						
Перетнуті квадрати, шт	112.67 ± 6.12	84.00 ± 4.51*	60.50 ± 3.22*/**	66.67 ± 4.03*/**	74.00 ± 5.64*/**	101.50 ± 6.12
Орієнтовно-дослідницька активність						
Стійки, шт	12.50 ± 0.97	8.33 ± 0.64*	4.00 ± 0.32*/**	4.17 ± 0.48*/**	6.83 ± 0.80*	8.33 ± 0.64*
Обстежені отвори, шт	8.33 ± 0.48	6.83 ± 0.32*	4.33 ± 0.48*/**	8.33 ± 0.64	6.33 ± 0.80	7.00 ± 0.48
Сума	20.83	15.16	8.33	12.5	13.16	15.33
Вегетативний супровід емоційних реакцій						
Акти дефекації, шт	0.83 ± 0.16	0.67 ± 0.16	0.83 ± 0.32	1.00 ± 0.32	1.17 ± 0.48	1.00 ± 0.32
Акти уринації, шт	0.67 ± 0.16	0.17 ± 0.16*	0.00	0.17 ± 0.16	0.33 ± 0.16	0.00
Акти грумінгу, шт	1.17 ± 0.16	0.83 ± 0.32	1.67 ± 0.16	1.67 ± 0.48	1.00 ± 0.48	0.50 ± 0.32
Сума	2.67	1.67	2.50	2.84	2.50	1.50
Сума всіх видів активності	136.17	100.83	71.33	82.01	89.66	118.33
Зниження активності, %		25.95	47.62	39.77	34.16	13.10

Примітки:

* — відхилення показника достовірне стосовно даних контрольної групи ($p \leq 0.05$);

** — відхилення показника достовірне стосовно групи тварин, які отримували препарат порівняння ($p \leq 0.05$);

n — кількість тварин у групі.

Результати досліджень і їх обговорення

Результати проведеного дослідження наведено в Табл. 1.

Отримані результати вказують на те, що в тесті «Відкрите поле» введення досліджуваних екстрактів в умовно ефективній дозі 100 мг/кг маси тіла викликало зниження активності мишей порівнюючи з контролем. Найбільш суттєве зниження активності мишей викликало введення екстракту БПВ — на 47.62 %; найменше зниження активності викликало введення екстракту БКС — на 13.10 %. Екстракти БПС і БКВ викликали зниження активності мишей на 39.77 % і 34.16 % відповідно. Водночас у разі введення екстрактів спостерігалось зниження як горизонтальної (кількість перетнутих квадратів), так і вертикальної (кількість стійок) активності. Кількість обстежених отворів суттєво знизилась (майже удвічі) тільки в групі, якій було введено екстракт БПВ. Сума емоційних реакцій (уринації, дефекації та грумінг) в 1.6 разу знижувалась у групі мишей, яким вводили препарат порівняння, і в 1.5 разу — у групі мишей, яким вводили екстракт БКС; у разі введення інших досліджуваних екстрактів сума емоційних реакцій залишалась на рівні контролю.

Під час порівняння отриманих результатів із даними, отриманими після введення препарату порівняння (екстракт кропиви собачої), виявляється, що екстракти БПВ, БПС і БКВ в тій самій дозі чинять більш активний вплив на поведінку мишей — в 1.83, 1.53 й 1.32 разу відповідно. І тільки екстракт БКС поступається за своєю активністю екстракту кропиви собачої.

Висновки

Отримані результати вивчення впливу сухих екстрактів трави видів роду Буквиця на активність мишей у тесті «Відкрите поле» вказують на те, що в разі їх введення спостерігається чітка тенденція до зниження рухової активності піддослідних тварин. В умовно ефективній дозі 100 мг/кг найбільш суттєве зниження активності мишей викликало введення сухого екстракту трави б. перебільшеної (екстрагент — вода очищена) — 47.62 %, водночас емоційні реакції тварин залишались незмінними; найменше зниження активності викликало введення сухого екстракту трави б. короткозубої (екстрагент — спирт етиловий 70%) — 13.10 %, що супроводжувалось зниженням суми емоційних реакцій в 1.6 разу.

Встановлено, що введення препарату порівняння — екстракту кропиви собачої (пустирника) — викликало зниження активності мишей на 25.95 %. Отже, можна зробити висновок, що досліджувані екстракти (крім БКС) чинять

більш активний вплив на поведінку мишей, ніж екстракт кропиви собачої — препарат із доведеною снодійною та седативною дією. Зокрема, активність екстракту БПВ в цьому досліді перевищує активність екстракту кропиви собачої в 1.83 разу.

Зважаючи на отримані результати, найбільш перспективним для подальших досліджень і розробки рослинного лікарського засобу із седативною дією є екстракт сухої трави б. перебільшеної (екстрагент — вода очищена).

ЛІТЕРАТУРА

- Herbal Products and GABA Receptors / G.A.R. Johnston et al. *Encyclopedia of Neuroscience*. 2009. Vol. 4. P. 1095-1101.
- Hanrahan J.R., Chebib M., Johnston G.A.R. Flavonoid modulation of GABA(A) receptors. *British Journal of Pharmacology*. 2011. Vol. 163, № 2. P. 234-245.
- Данилов С.А., Штрыголь С.Ю., Степанова С.И. Пустырник: фитохимические особенности и новые грани фармакологических свойств. *Провізор*. 2011. № 9. URL: http://www.provisor.com.ua/archive/2011/N09/pust_0911.php?part_code=35&art_code=8011.
- Wood Betony (*Betonica officinalis*) [Електронний ресурс]. URL: <http://store.newwayherbs.com/wood-betony-betonica-officinalis-p322.aspx>.
- Wood Betony [Електронний ресурс]. URL: <https://www.herb-pharm.com/products/product-detail/wood-betony>.
- Viridian Wood Betony Tincture Organic [Електронний ресурс]. URL: <http://www.earthfare.co.uk/viridian-wood-betony-tincture-organic-5260-p.asp>.
- Wood Betony Capsules — 400 mg, 60 Vcaps™ each (*Betonica officinalis*) [Електронний ресурс]. URL: <http://www.pennherb.com/wood-betony-capsules-400-mg-P460x>.
- Розповсюдження, заготівля та раціональне використання лікарських рослин: [методичні рекомендації] / І.А. Сас та ін. Івано-Франківськ : ЛІК, 2014. 87 с.
- Передирий В.А. Рецептурный справочник фитотерапевта. Київ : АО «Обереги», 1995. 432 с.
- Грицик А.Р., Сас І.А. Аналіз складу зборів лікарських рослин, що вміщують буквицю лікарську. *Вога і здоров'я людини (До 150-річчя з дня народження В.І. Вернадського)*: мат. міжнар. міждисциплінарної наук.-практ. конф., сан. «Квітка полонини», 19—20 квіт. 2013 р. Ужгород, 2013. С. 173-175.
- Грицик А.Р., Сас І.А. Гостра токсичність та антиексудативна активність екстрактів трави буквиці перебільшеної (*Betonica perauca* Klok.) та буквиці короткозубої (*Betonica brachydonta* Klok.). *Фармаком*. 2017. № 4. С. 29-33.
- Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общ. ред. чл. кор. РАМН проф. Р.У. Хабриева. 2-е изд., перераб. и доп. Москва : Медицина, 2005. 832 с.
- Цивунін В.В., Штрыголь С.Ю., Загинайченко Б.А. Дослідження психотропних властивостей потенційних рослинних антиконвульсантів. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2014. № 2 (38). С. 30-35.
- Романенко Є.А., Кошовий О.М., Комісаренко А.М. Фітохімічне вивчення рідкого екстракту трави кропиви собачої та дослідження його психотропної активності. *Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П.Л. Шуплика*. 2015. Вип. 24 (5). С. 212-218.
- Ibironke G.F., Ugege O.G. Effects of the Extract of *Calophyllum inophyllum* on Behavioral Indices in Rodents. *Neurophysiology*. 2015. Vol. 47, № 1. P. 40-45.
- Марчишин С.М., Зарічанська О.В., Чолач С.Ю. Дослідження гострої токсичності та нейротропних властивостей густих екстрактів квіток ліліяника буро-жовтого

(*Hemerocallis fulva* L.) і лілійника гібридного (*Hemerocallis hybrida* Var. «Stella De Oro»). *Фармацевтичний часопис*. 2016. № 1. С. 79-84.

17. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council of Europe, Strasbourg, 1986. 53 p.

18. Про захист тварин від жорстокого поводження: Закон України № 3447-IV від 07.07.2006 р. Відомості Верховної Ради України. 2006 р., № 27. С. 990.

19. Біоетична експертиза доклінічних та інших наукових досліджень, що виконуються на тваринах: методичні рекомендації / О.Г. Резніков та ін. Київ, 2006. 28 с.

Сас Ірина Анатоліївна. К. фарм. н. (2018). Асистент кафедри фармації Івано-Франківського національного медичного університету.

Sas Iryna Anatoliivna. Ph. D. in Pharmacy (2018). Assistant of Pharmacy Department at Ivano-Frankivsk National Medical University.

Сас Ирина Анатольевна. К. фарм. н. (2018). Асистент кафедри фармації Івано-Франківського національного медичного університету.

Фармакологічні дослідження

УДК [633.853.494:577.15]:613.292

Крусир Г. В., Бельтюкова С. В., Ливенцова О. О., Прилуцький В. П.
Одеська національна академія харчових технологій, Одеса, Україна

Виділення та фізико-хімічні властивості протеази насіння томатів

Функціональні порушення травлення посідають друге місце після серцево-судинних захворювань, тому дослідження нових профілактичних біологічно-активних добавок із фітоферментною складовою для нормалізації функціонування системи травлення є особливо актуальним. Дослідження рослинної сировини на вміст протеолітичних ферментів свідчить про значний вміст протеаз у насінні томатів. Природні високомолекулярні речовини, які присутні в біологічних матеріалах, одержуються з них як багатокомпонентні розчини й дисперсії. Виділення цих речовин (харчових білків, ферментів, інгібіторів ферментів білкової природи) пов'язане з їх концентруванням та часто фракціонуванням із розбавлених водних систем. Протеази з м'якоти й насіння томатів отримували екстракцією з рослинної сировини. Показано, що насіння томатів характеризуються підвищеною протеолітичною активністю порівнюючи з м'якоттю плодів томатів. Під час дозрівання плодів протеолітична активність як насіння, так і м'якоти зростає. Для характеризування протеази насіння томатів провели її очищення фракціонуванням екстракту на колонці. Експеримент дозволив встановити наявність у препараті неоднорідного спектра білків із молекулярною масою 17-20 кД. Була виділена протеаза з протеолітичною активністю 68.8 ПО/г. Важливе значення для ферментів має субстрат і його концентрація, рН середовища і його температура. Були визначені рН- і термооптимум, а також рН- і термостабільність препарату протеази з насіння томатів: рН-оптимум активності ферменту спостерігався в межах 5.0 од. рН, що свідчить про його приналежність до групи кислих протеаз. рН-Стабільність досліджувалась за оптимального значення рН (5.0), а також за кислого (2.5) і лужного (8.0) значень рН (середовище шлунка та кишківника, відповідно) за температури 37 °С протягом 1-6 год. У разі кислого значення рН середовища активність швидко знижується протягом 20 хв. У разі лужних значень рН середовища спостерігається більш уповільнена інактивація, а повна втрата активності відбувається через 1.5 год інкубації ферменту. Визначено рН-оптимум дії протеази, який становить 8.0 од. рН, а також термооптимум — 37 °С.

Ключові слова: протеолітична активність, насіння, томати, протеаза, ферменти, білки, термооптимум, рН-оптимум.

UDC [633.853.494:577.15]:613.292

Summary

Krusir G. V., Belyukova S. V., Liventsova O. O., Prylutskiy V. P.
Odessa National Academy of Food Technologies, Odessa, Ukraine

Isolation and physicochemical properties of tomato seed protease

Functional digestive disorders rank second after cardiovascular diseases; therefore, the research of new preventive food supplements with a phyto-enzyme component for the normalization of the functioning of the digestive system is especially urgent. Studies of herbal drugs on the content of proteolytic enzymes indicate a significant number of proteases in tomato seeds. Isolation of natural macromolecular substances (food proteins, enzymes, proteinase enzyme inhibitors) extracted as multicomponent solutions and dispersions from biological materials is associated with their concentration and often fractionation from dilute aqueous systems. A study of seeds and flesh of tomatoes obtained by extraction has shown that the former possess a higher proteolytic activity compared to the latter. During the fruit ripening, the proteolytic activity of both the seeds and flesh increases. For characterization, the protease of tomato seeds was purified by fractionating the extract on a column. The experiment made it possible to establish the presence of an inhomogeneous spectrum of proteins with the molecular weight of 17-20 kDa in the preparation. A protease with the proteolytic activity of 68.8 PU/g was isolated. As the substrate, its concentration, pH, and the temperature of the medium are of great importance to enzymes, the pH and thermo-optimum and pH and thermo-stability of the protease preparation obtained from tomato seeds were determined. The optimum pH for the enzyme activity was observed in the region of 5.0, which indicates the belonging of the protease to the acidic group. pH stability was studied at pH values of 5.0 (optimum pH), 2.5 (gastric medium), and 8.0 (intestinal medium), at 37 °C for 1-6 hours. The activity has shown to decrease rapidly in the acidic medium (within 20 min) as opposed to the alkaline medium, where gradual inactivation was observed with complete inactivation in 1.5 h of enzyme incubation. The optimum pH for the protease activity (8.0) and thermo-optimum (37 °C) were established.

Keywords: proteolytic activity, seeds, tomatoes, protease, enzymes, proteins, thermo-optimum, pH optimum.

УДК [633.853.494:577.15]:613.292

Резюме

Крусир Г. В., Бельтюкова С. В., Ливенцова О. О., Прилуцький В. П.
Одеська національна академія харчових технологій, Одеса, Україна

Выделение и физико-химические свойства протеазы семян томатов

Функциональные нарушения пищеварения занимают второе место после сердечно-сосудистых заболеваний, поэтому исследование новых профилактических биологически-активных добавок с фитоферментной составляющей для нормализации функционирования системы пищеварения является особенно актуальным. Исследование растительного сырья на содержание протеолитических ферментов свидетельствует о значительном содержании протеаз в семенах томатов. Природные высокомолекулярные вещества, присутствующие в биологических материалах, получают из них в виде многокомпонентных растворов и дисперсий. Выделение этих веществ (пищевых белков, ферментов, ингибиторов ферментов белковой природы) связано с их концентрированием и часто фракционированием из разбавленных водных систем. Протеазы из мякоти и семян томатов получали экстракцией из растительного сырья. Показано, что семена томатов характеризуются повышенной протеолитической активностью по сравнению с мякотью плодов томатов. При дозрева-

нии плодов протеолитическая активность как семян, так и мякоти возрастает. С целью характеристики протеазы семян томатов провели ее очищение путем фракционирования экстракта на колонке. Эксперимент позволил установить присутствие в препарате неоднородного спектра белков с молекулярной массой 17-20 кД. Была выделена протеаза с протеолитической активностью 68.8 ПО/г. Важное значение для ферментов имеет субстрат и его концентрация, рН среды и ее температура. Были определены рН- и термооптимум, а также рН- и термостабильность препарата протеазы из семян томатов: рН-оптимум активности фермента оказался в области 5.0 ед. рН, что свидетельствует о его принадлежности к группе кислых протеаз. рН-Стабильность исследовалась при оптимальном значении рН (5.0), а также при кислом (2.5) и щелочном значениях рН (среда желудка и кишечника, соответственно) при температуре 37 °С на протяжении 1-6 ч. При кислом значении рН среды активность быстро снижается в течение 20 мин. При щелочных значениях рН среды наблюдается более замедленная инактивация, а полная потеря активности происходит через 1.5 ч инкубации фермента. Определен рН-оптимум действия протеазы, который составил 8.0 ед. рН, а также термооптимум — 37 °С.

Ключевые слова: протеолитическая активность, семена, томаты, протеаза, ферменты, белки, термооптимум, рН-оптимум.

Ферменти останнім часом знаходять усе більш широке застосування у медицині й нутриціології в разі розладів травлення, пов'язаних із захворюваннями печінки й підшлункової залози, а також у літньому й похилому віці. Джерелом для одержання ферментних лікарських засобів слугують здебільшого тканини тваринного походження і мікроорганізми [1]. Однак тривале приймання таких ферментних препаратів призводить до феномену «звикання», тобто до припинення секреції власних ферментів організму. Рослинні ферменти очікувано позбавлені такого недоліку у використанні й мають м'який природний фізіологічний вплив на організм [2]. Тому останніми роками рослинні ферменти розглядають як альтернативу ферментам тваринного й мікробного походження під час терапії вад шлунково-кишкового тракту, а також у складі біологічно активних добавок, які сприяють перетравлюванню їжі [3]. Крім того, вони здатні функціонувати не тільки в кишківнику, а й у кислому середовищі шлунка.

Кінець ХХ — початок ХХІ сторіччя ознаменувався широким використанням ферментних рослинних біологічно активних добавок (БАД), що містять гідролітичні ферменти й застосовуються для корекції розладів травлення, а також у лікувально-профілактичному харчуванні. Розробка технологій таких БАД і пошук нових перспективних джерел рослинних гідролаз є актуальними [4].

Метою дослідження є виділення та характеристика протеази насіння томатів — фітоферментної складової біологічно активних добавок для покращення функціонування системи травлення. Функціональні порушення травлення за частотою виникнення посідають сьогодні друге місце після серцево-судинних захворювань, тому дослідження нових профілактичних БАД з фітоферментною складовою для нормалізації функціонування системи травлення особливо актуальне.

Пошук нових рослинних ферментів, що отримуються з доступної і економічно вигід-

ної сировини й одержання на їх основі високоефективних, конкурентоспроможних препаратів для харчової промисловості й медицини є актуальною проблемою в Україні.

Скринінг рослинної сировини на вміст протеолітичних ферментів свідчить про значний вміст протеаз у насінні томатів і зелених рослинах люцерни. Вибір джерел протеолітичних ферментів ґрунтується як на їх значній протеолітичній активності, так і на доцільності використання сировини, яку можна переробляти протягом року, яка є дешевою і доступною через значні запаси [5].

Матеріали і методи досліджень

Природні високомолекулярні сполуки, які є в біологічних матеріалах, одержують із них як багатокомпонентні розчини й дисперсії у відносно низьких концентраціях. Виділення цих сполук (харчових білків, ферментів, інгібіторів ферментів білкової природи, полісахаридів, нуклеїнових кислот та ін.) пов'язане з їх концентруванням і часто з фракціонуванням із розбавлених водних систем. З огляду на величезні в низці випадків масштаби вихідної сировини, що переробляється, методи виділення біополімерів мають бути економічними й високопродуктивними [2-5].

Нині для концентрування біокоректорів білкової природи використовують методи осадження кислотами [1, 6], солями [4] й органічними розчинниками [3, 4], різноманітні варіанти теплової обробки білків, які охоплюють методи термокоагуляції [1, 7], і різні види сушіння з рідких і заморожених систем [8, 9], а також мембранні методи [10].

Осадження білка в ізоелектричній точці (ІЕТ) внаслідок різкого зниження його сумарного заряду є одним із найпростіших і найекономічніших прийомів у біотехнології [1, 6]. Проте осадження білка в цих умовах може призводити до зниження його розчинності в результаті незворотної взаємодії однотипних макромолекул або взаємодії з іншими компонентами системи

і до втрати біологічної активності. Цей метод не забезпечує осадження альбумінів, вміст яких становить від 10 % до 30 % маси білка в багатьох природних сполуках.

Вилучення

Досліджувані об'єкти були промиті спочатку проточною, а потім дистильованою водою і охолоджені до 0-4 °С протягом 12 год.

Потім плоди звільняли від шкірки і піддавали механічному подрібненню, відокремлюючи ділянку плодоніжки, м'якоть і насіння.

М'якоть суспендували в двох об'ємах від її маси охолодженим розчином NaCl (0.2 моль/дм³) і гомогенізували в системі скло — тефлон 10 ходами поршня за 1000 об/хв, підтримуючи температуру гомогенізатора в бані з подрібненим льодом.

Отриманий гомогенат відокремлювали від грубих фрагментів, фільтруючи його крізь 4 шари медичної марлі в хімічну склянку, що охолоджувалась в бані з подрібненим льодом.

Фільтрат центрифугували за 0-4 °С (1000 обертів протягом 30 хв).

Супернатант використовували як джерело ферменту, що досліджувався.

Відібране насіння промивали дистильованою водою, суспендували у двох об'ємах від їх маси зазначеного вище розчину NaCl, а потім розтирали у фарфоровій ступці, що охолоджувалась у бані з подрібненим льодом, з кварцевим піском, що за масою відповідав кількості насіння.

Отриманий гомогенат обробляли, як зазначено вище, а супернатант після центрифугування також використовували як джерело ферменту, що вивчався (шар олії, що плавав на поверхні супернатанта, відокремлювали за допомогою смужок фільтрувального паперу).

Супернатанти зберігали за 0 °С.

Очищення

Для очищення протеолітичних ферментів після гомогенізації насіння томатів сорту «Харківський» фракціонували отриманий супернатант на колонці з ДЕАЕ-целюлозою, що урівноважена трис-НСІ буферним розчином концентрацією 0.01 моль/дм³, рН 7.4.

Колонку промивали 450 мл зазначеного буферного розчину за швидкості промивання 20 мл на годину і збирали фракції по 7.5 мл. Потім проводили елюювання колонки тим самим буферним розчином, але який додатково містить 0.15 М розчин NaCl у згаданому вище режимі. В отриманих фракціях визначали вміст білка й протеолітичну активність.

Фракції, що виявляли максимальну питому ферментативну активність, об'єднували.

Виділені препарати ферменту знесолювали шляхом їх діалізу проти дистильованої води й піддавали ліофільному сушінню (активність препарату становила 68.8 ПО/г ліофілізованого препарату).

Препарат зберігали в ексікаторі за температури 0-4 °С.

Електрофорез

Демінералізований і знесолений препарат (3 фракції) з характерною протеолітичною активністю був підданий електрофорезу на системі Laemli у 10% поліакриламідному гелі й в 0.1% розчині додецилсульфату натрію протягом 6 год за сили струму 20 мА. Фіксування проводили 12% розчином трихлороцтової кислоти й забарвлювали стандартним Coomassie R-250. Для визначення молекулярної маси застосовували такі білки-маркери: фосфорилаза В — 92.5 кДа, бичачий сироватковий альбумін — 37 кДа, карбогідраза — 29 кДа, ячний альбумін — 15 кДа, цитохром С — 12 кДа, інгібітор трипсину з легень великої рогатої худоби — 6 кДа, соєвий інгібітор трипсину — 2.1 кДа.

Білок визначали за методом Лоурі в модифікації Хартрі [11].

Визначення протеолітичної активності

Протеолітичну активність визначали модифікованим методом Ансона [12]. У пробірку, що містить 1 мл 1% розчину ферменту, через 5 хв інкубації за 37 °С додавали 2 мл 1% розчину казеїну в 0.1 М фосфатному буфері рН 7.4, термостатованому за 37 °С. Через 10 хв інкубації з казеїном до інкубованої суміші додавали 5 мл 5% розчину трихлороцтової кислоти (ТХО) й інкубували ще 20 хв.

Контрольний розчин отримували додаванням до 1 мл 1% розчину ферменту 5 мл 5% розчину ТХО й інкубацією впродовж 10 хв, а потім вже 2 мл 1% розчину казеїну в 0.1 М фосфатному буфері рН 7.4 й інкубацією протягом 20 хв.

Розчини доводили до об'єму 10 мл 0.1 М фосфатним буфером рН 7.4. Отриманий розчин центрифугували протягом 10 хв (6000 об/хв) і фільтрували крізь складчастий паперовий фільтр.

Від фільтрату відбирали 1 мл розчину й додавали до нього 5 мл 0.5 М розчину Na₂CO₃ й 1 мл розчину реактиву Фоліна. Інкубували 20 хв до зміни забарвлення від жовтого до синього. Вимірювали оптичну густину контрольного й дослідного зразків розчинів за довжини хвилі 670 нм у кюветі з товщиною шару 0.5 см.

Протеолітичну активність розраховували за формулою:

$$ПА = \frac{D \times 5}{TE \times n \times 10},$$

- де D — оптична густина дослідного розчину навпроти контрольного розчину;
 5 — коефіцієнт загального об'єму розчину в пробірці;
 10 — час інкубації, у хвилинах;
 TE — тирозиновий еквівалент — оптична густина одного мікромоля тирозину в одному мілілітрі;
 n — маса наважки препарату, у грамах.

За одиницю протеолітичної активності брали таку кількість ферменту, яка за 1 хв за температури 37 °С каталізує розщеплення казеїну (у нейтральному й лужному середовищі) або гемоглобіну (у кислому середовищі) до продуктів, що не осаджуються ТХО, вміст яких виражається в мікромолях тирозину.

Визначення ізоелектричної точки

У пробірки наливали по 1 мл розчину казеїну й додавали в певних співвідношеннях розчини оцтової кислоти для утворення різної реакції середовища. Пробірки витримували за кімнатної температури протягом 30 хв. Визначали ізоелектричну точку за максимальним ступенем помутніння (максимальним значенням оптичної густини).

pH-Стабільність

Рівні за активністю проби ферменту інкубували за різних значень рН (від 2.5 до 9.0) (викорис-

товували 0.1 М цитратний буфер (рН = 1.1-4.5); 1/15 М Na-фосфатний буфер (рН = 4.5-8.0); 0.05 М тетраборатний буфер (рН = 8.0-9.0)) протягом 0-360 хв, потім доводили рН розчину до оптимального значення і визначали ферментативну активність.

Термостабільність

Рівні за активністю проби ферменту у відповідному буферному розчині, який відповідає рН-оптимуму, інкубували за 20, 37, 45 і 60 °С протягом 0-360 хв, потім доводили температуру до 37 °С і визначали активність ферменту.

pH-Оптимум

До рівних за активністю проб ферменту додавали буферний розчин із різними значеннями рН у діапазоні 2.5-12.0 і визначали ферментативну активність.

Термооптимум

В однакових пробах ферменту визначали активність за температури 20-80 °С у відповідному буфері, що відповідає рН-оптимуму цього ферменту.

Результати експериментів обробляли методами математичної статистики. Значення показника достовірності знаходили за таблицею Стьюдента за довірчої вірогідності P = 0.95. Допустимою величиною відносною помилки вважали її значення, що не перевищує 5 %.

Результати досліджень та їх обговорення

Експериментальні дані визначення вмісту білка й протеолітичної активності (ПА) у досліджуваних сортах томатів наведені в Табл. 1.

Таблиця 1

Протеолітична активність насіння та м'якоті томатів (n = 3, P ≥ 0.95)

Джерело ферменту (сорт томата)	Вміст білка, мг/г сировини		Протеолітична активність, од/г сировини	
	Технічний ступінь зрілості	Споживчий ступінь зрілості	Технічний ступінь зрілості	Споживчий ступінь зрілості
Київський 139				
насіння	0.100	0.150	—	0.0200
м'якоть	0.002	0.003	—	0.0015
Машинний				
насіння	0.125	0.17	0.320	0.3900
м'якоть	0.0025	0.0045	0.001	0.0017
Маяк 12/20-4				
насіння	0.0900	0.1100	0.0180	—
м'якоть	0.0017	0.0023	0.0005	—
Харківський				
насіння	0.150	0.210	—	—
м'якоть	0.003	0.005	—	—
Одеський				
насіння	0.1300	0.1400	—	—
м'якоть	0.001	0.0017	—	—

Згідно з наведеними в таблиці даними насіння томатів характеризується підвищеною протеолітичною активністю порівнюючи з такою м'якоті плодів.

Серед вивчених сортів томатів найбільшою протеолітичною активністю характеризується насіння сорту «Харківський» споживчого ступеня зрілості.

Для характеристики протеази насіння томатів провели її очищення фракціонуванням екстракту на колонці з ДЕАЕ-целюлозою.

В отриманих фракціях визначали вміст загального білка й протеолітичну активність. Фракції, що виявляли ферментативну активність, об'єднували. Результати наведені в Табл. 2.

Як видно з наведених експериментальних даних, під час промивання колонки виявляються два максимуми елюації білка, які не мають протеолітичної активності; хроматографування розчином NaCl призводить до виходу трьох приблизно однакових за кількістю білка й активністю фракцій. Вихід розраховували відповідно до загальної протеолітичної активності.

Демінералізований і знесолений препарат (3 фракції) з характерною протеолітичною активністю був підданий електрофорезу на системі Laemli (Рис. 1).

Рисунок 1

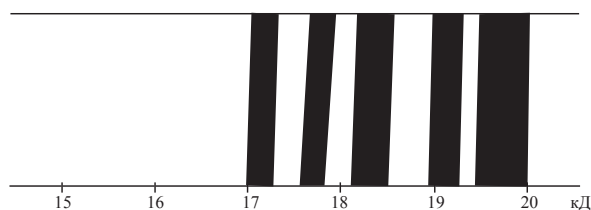


Схема електрофорезу

Експеримент дозволив встановити наявність у препараті неоднорідного спектра білків із молекулярною масою 17-20 кД.

Виділений препарат ферменту знесолювали його діалізом проти дистильованої води й ліофільно висушували. Активність препарату становила 68.8 ПО/г ліофілізованого препарату.

Таблиця 2

Фракціонування протеазного комплексу насіння томатів сорту «Харківський» (n = 3, p ≥ 0.95)

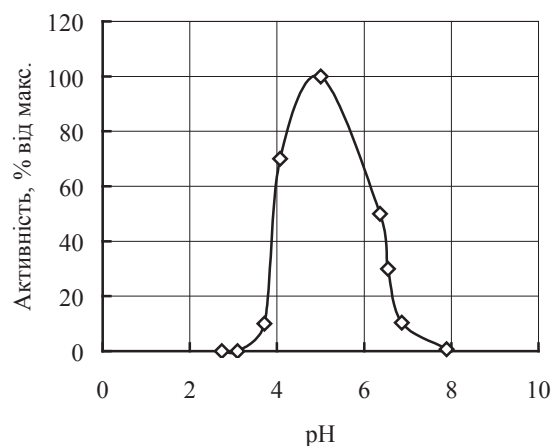
Етап очищення	Білок, мг	Активність, ПЕ		Коефіцієнт очищення	% виходу
		питома / мг білка	загальна		
Вихідний супернатант	350.0	0.012	4.23	1	100
ДЕАЕ-целюлоза:					
1-а фракція		—		—	—
2-а фракція		—		—	—
3-я фракція	9.5	0.086	0.817	7.2	50.9
4-а фракція	8.7	0.084	0.731	7.0	
5-а фракція	6.8	0.089	0.605	7.4	

Для ефективного здійснення процесу ферментативного перетворення потрібно не лише мати активний препарат, але й знати, в яких умовах проявляється його максимальна ферментативна активність і які чинники і як впливають на фермент.

Визначено рН- і термооптими й рН- і термостабільності препарату протеази з насіння томатів (Рис. 2-5).

рН-Оптимум активності ферменту спостерігається в зоні 5.0 (Рис. 2), що свідчить про його належність до групи кислих протеаз, на що додатково вказує швидке зниження активності за вищих за оптимальне значення рН середовища (6.0) значень і її повна втрата в лужному середовищі (рН 8.0).

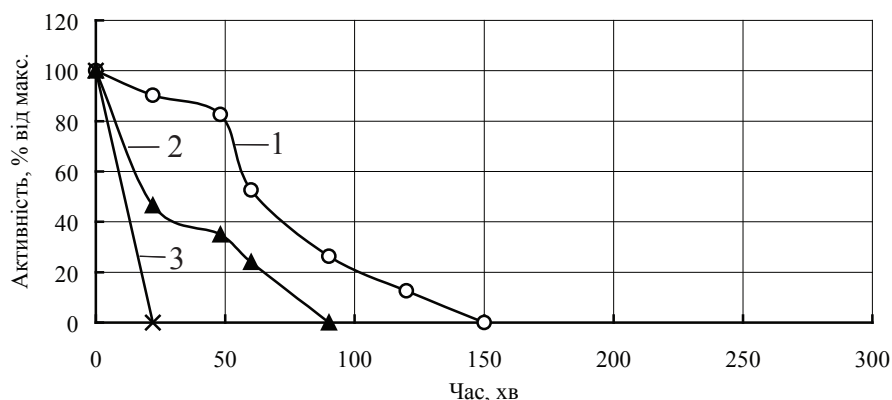
Рисунок 2



рН-Оптимум фітопротеази з насіння томатів

рН-Стабільність (Рис. 3) досліджувалась за оптимального значення рН (5.0), за кислого значення рН (середовище шлунка) і за лужного значення рН (середовище кишківника) за температури 37 °С протягом 1-6 год. За кислого значення рН середовища активність швидко втрачається протягом 20 хв. За лужних значень рН середовища спостерігається більш повільна інактивація — повна втрата активності відбувається через 1.5 год інкубації ферменту за цих

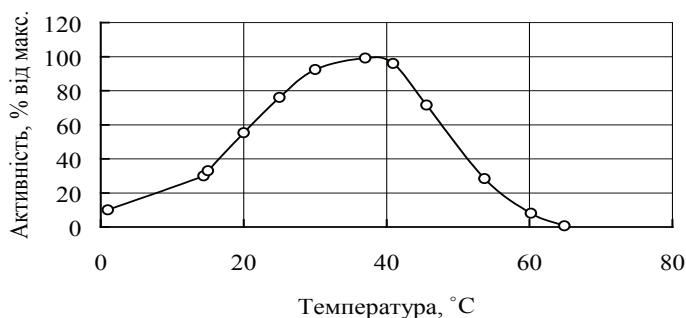
Рисунок 3



pH-Стабільність фітопротеази з насіння томатів (за 37 °С)

- 1 — pH 8.0;
- 2 — pH 2.5;
- 3 — pH 5.0.

Рисунок 4



Термооптимум фітопротеази з насіння томатів

умов. За оптимальних умов функціонування ферменту активність стабільна протягом перших 50 хв, а потім різко знижується і повністю втрачається через 2.5 год, що може бути обумовлено як денатураційними змінами молекули білка, так і процесами автолізу, характерними для водних розчинів протеаз.

Вплив температури на швидкість ферментативних реакцій може бути обумовлений дією різних чинників. Температура впливає на стабільність ферменту, швидкість розпаду фермент-субстратного комплексу, спорідненість ферменту до субстрату тощо.

Відомо, що ферменти як клас біологічних молекул мають дуже низьку стабільність. Навіть невеликі відхилення зовнішніх умов від тих, які характерні для мікрооточення ферментів у клітині, можуть виявитися достатніми, щоб порушити структуру й функцію ферментів, тобто інактивувати їх.

Під час проведення ферментативної реакції одночасно діють два різні чинники, що визначають вплив температури: з одного боку, збільшення початкової швидкості, з іншого —

денатурація ферменту під дією температури, яка зумовлює безперервне зменшення концентрації активного ферменту. Оптимальна температура залежить від співвідношення між впливом температури на швидкість ферментативної реакції і її впливом на швидкість денатурації ферменту.

Положення термооптимуму ферментативної активності препарату з насіння томатів визначали за оптимального значення pH (5.0) і зміни температури в діапазоні 20-70 °С. Максимальна активність ферменту (Рис. 4) спостерігається в зоні фізіологічних значень температури з її швидким зниженням у разі подальшого підвищення температури, причиною якого є теплова денатурація нативної молекули білка, зміна природи мікрооточення нативного ферменту.

Термостабільність визначали за оптимального значення pH (5.0) і за значень температур 37, 60, 80 і 100 °С, що відповідають температурі функціонування ферменту в ШКТ (37 °С) і можливим температурам сушіння ферменту (60, 80 і 100 °С) протягом 1-6 год.

Як видно з наведених даних визначення впливу температури на стабільність препарату протеази з насіння томатів (Рис. 5), за оптимального значення рН за температури 100 °С повна втрата протеолітичної активності спостерігається вже через 10 хв інкубації ферменту за цих умов, за 80 °С — через 20 хв, за 60 °С — у разі витримування ферменту протягом 60 хв за цієї температури. За фізіологічної температури час повної втрати ферментативної активності становить 150 хв. Причому фермент майже не змінює своєї активності протягом першої години інкубації з її швидкою втратою протягом наступних 90 хв. Вірогідними причинами втрати ферментом активності, не зважаючи на оптимальне значення рН середовища, можуть бути зміни характеру денатурації нативної білкової глобули ферменту, а також процеси автолізу, що з часом набувають все більш вираженого характеру.

Вивчення впливу 2-меркаптоетанолу і *n*-хлормеркурибензоату, що є активатором й інгібітором відповідно тіолових протеаз (типу папаїназ), за їх концентрації 5 ммоль/дм³ не виявило достовірних ознак зміни ферментативної активності препарату з насіння томатів за наявності й за відсутності зазначених сполук, що свідчить про те, що ця протеаза не належить до групи тіолових.

Висновки

1. Провели очищення протеази насіння томатів фракціонуванням екстракту на колонці з ДЕАЕ-целюлозою.

2. Експеримент дозволив встановити наявність у препараті неоднорідного спектра біл-

ків із молекулярною масою 17-20 кД. Була виділена протеаза з протеолітичною активністю 68.8 ПО/г.

3. Ізоелектрична точка протеази становить 5.0 од. рН.

4. Визначено рН-оптимум дії протеази, який становить 8.0 од. рН, а також термооптимум — 37 °С.

5. рН-Стабільність досліджувалась за оптимального значення рН (5.0) і за лужного значення рН (середовище кишківника) за температури 37 °С протягом 1-6 год. За кислого значення рН середовища активність швидко знижується протягом 20 хв. За лужних значень рН середовища спостерігається більш уповільнена інактивація, а повна втрата активності відбувається через 1.5 год інкубації ферменту.

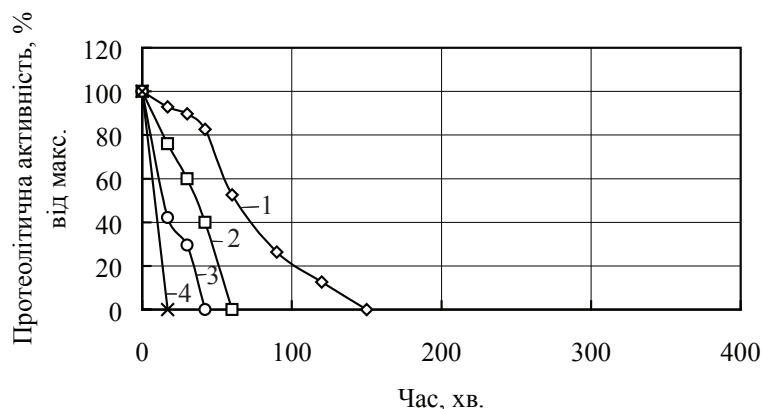
6. Термостабільність визначали за оптимального значення рН (5.0) і за значень температур 37, 60, 80 і 100 °С, що відповідають температурі функціонування ферменту в ШКТ (37 °С) і можливим температурам сушіння ферменту (60, 80 і 100 °С) протягом 1-6 год. За оптимального значення рН за температури 100 °С повна втрата протеолітичної активності спостерігається вже через 10 хв інкубації ферменту за цих умов.

7. Виділена протеаза насіння томатів належить до кислих протеаз і не є тіоловою протеазою.

ЛІТЕРАТУРА

1. Скоупс Р. Методы очистки белков: Пер. с англ., М.: Мир, 1985. 358 с.
2. Антонов Ю.А. Применение безмембранного осмоса для концентрирования белков из молекулярно-дисперсных и коллоидно-дисперсных растворов (Обзор). *Прикладная биохимия и микробиология*. Т. 36. № 4. 2000. С. 380-394.

Рисунок 5



Термостабільність фітопротеази з насіння томатів (рН 5.0)

- 1 — 37 °С;
 2 — 60 °С;
 3 — 80 °С;
 4 — 100 °С.

3. Применение «Юнионзима с МПС» в комплексном лечении хронических заболеваний органов пищеварения / Н.Ф. Дейнеко та ін. *Сучасна гастроентерологія*. 2005. № 5 (25). С. 45-49.
4. Antonov Yu.A., Grinberg V.Ya., Zhuravskaya N.A., V.B. Tolstoguzov V.B. *Carbohydr. Polymers*. V. 2. 1982. — P. 81 — 90.
5. Черно Н.К., Крусір Г.В., Коваленко О.О. Біокоректори процесів травлення: монографія. Одеса: Астрапринт, 2010. 236 с.
6. Кантор Ч., Шиммел П. Биофизическая химия. М.: Мир, Т. 1, 1984. 333 с.
7. Tolstoguzov V.B. Funktional properties of food proteins. *Food Hydrocolloids*. 1991. V. 4. № 3. — P. 429 — 436.
8. Третьяков Ю.Д., Олейников Н.Н., Можаяев А.П. Основы криохимической технологии. М.: Наука, 1987. 362 с.
9. Tolstoguzov V.B. Concentration and purification of proteins by means of two-phase systems. *Food Hydrocolloids*. 1988. V. 2. № 3. P. 195 — 207.
10. Черно Н.К., Севастьянова О.В., Крусір Г.В. Фітоферментна добавка на основі томатів Обладнання та технології харчових виробництв: зб. наук. праць. Донецьк: ДонДУЕТ, 2003. Вип. 9. С. 172-178.
11. Hartree E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*. 1972. V. 48. P. 422-427.
12. Польшгаліна Г.В., Чердниченко В.С., Римарев Л.В. Определение активности ферментов. Справочник. М.: Де-Ли принт, 2003. 375 с.

Крусір Галина Всеволодівна. Д. т. н. (2009), професор (2013), завідувачка кафедри екології та природоохоронних технологій Одеської національної академії харчових технологій. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6464-5754>, Scopus Author ID: 6503971536, Researcher ID: F-1312-2016.

Krusir Galyna Vsevolodivna. Sc. D. in Biotechnology (2009), Full Professor (2013). Head of the Department of Ecology and Environmental Technologies at Odessa National Academy of Food Technologies. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6464-5754>, Scopus Author ID: 6503971536, Researcher ID: F-1312-2016.

Крусір Галина Всеволодовна. Д. т. н. (2009), професор (2013), заведуюча кафедрою екології та природоохоронних технологій Одеської національної академії харчових технологій. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6464-5754>, Scopus Author ID: 6503971536, Researcher ID: F-1312-2016.

Бельтюкова Світлана Вадимівна. Д. х. н. (1972), професор (1991), професор кафедри харчової хімії та експертизи Одеської національної академії харчових технологій. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2784-6095>, Scopus Author ID: 6603939604, Researcher ID: F-5505-2016.

Beltiukova Svitlana Vadymivna. Sc. D. in Analytical Chemistry (1972), Full Professor (1991). Professor of the Department of Food Chemistry and Expertise at Odessa National Academy of Food Technologies. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2784-6095>; Scopus Author ID: 6603939604; Researcher ID: F-5505-2016.

Бельтюкова Светлана Вадимовна. Д. х. н. (1972), професор (1991), професор кафедри харчової хімії та експертизи Одеської національної академії харчових технологій. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2784-6095>, Scopus Author ID: 6603939604, Researcher ID: F-5505-2016.

Ливенцова Олена Олегівна. К. х. н. (2013), доцент (2015), доцент кафедри харчової хімії та експертизи Одеської національної академії харчових технологій. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7409-874X>; Scopus Author ID 6507262177; Researcher F-6366-2016.

Liventsova Olena Olehivna. Ph. D. in Analytical Chemistry (2013), Associate Professor of the Department of Food Chemistry and Expertise at Odessa National Academy of Food Technologies. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7409-874X>; Scopus Author ID 6507262177; Researcher ID: F-6366-2016.

Ливенцова Елена Олеговна. К. х. н. (2013), доцент (2015), доцент кафедри харчової хімії та експертизи Одеської національної академії харчових технологій. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7409-874X>; Scopus Author ID 6507262177; Researcher F-6366-2016.

Прилуцький Володимир Петрович. Магістр факультету нафти, газу та екології Одеської національної академії харчових технологій (2019).

Prylutskyi Volodymyr Petrovych. Magistr faculty of Oil, Gas and Ecology of Odessa National Academy of Food Technologies (2019).

Прилуцький Владимир Петрович. Магістр факультета нафти, газу та екології Одеської національної академії харчових технологій (2019).

УДК 616.322+616–092.9+615.451.1+582.688.33

Старченко Г. Ю.

Івано-Франківський національний медичний університет, Україна

Гістологічне дослідження мигдалеподібного комплексу мишей після введення екстрактів *Calluna vulgaris* L. (Hull.)

Для підтвердження протитривожної та антидепресивної дії вересу звичайного (*Calluna vulgaris* L. (Hull.)) було проведене гістологічне дослідження мигдалеподібного комплексу мишей після введення екстрактів із цієї рослини. У статті представлено результати дослідження мигдалеподібного комплексу. Фронтальними зрізами скроневої частки видаляли мигдалеподібний комплекс; для гістологічного дослідження матеріал фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну й після гістологічного проведення заливали в парафінові блоки. Робили гістологічні зрізи, які забарвлювали гематоксилином й еозином і вивчали під світлооптичним мікроскопом Leika DM 750. Під час мікроскопічного дослідження компонентів мигдалеподібного комплексу після введення екстракту звіробоя, екстракту вересу водно-спиртового морфологічний стан структур мигдалеподібного тіла відповідає такому, що характерний для інтактної групи.

Ключові слова: верес звичайний, мигдалеподібний комплекс, екстракт водний і водно-спиртовий, гістологічне дослідження, анксиолітичні властивості.

UDC 616.322+616–092.9+615.451.1+582.688.33

Summary

Starchenko G. Yu.

Ivano-Frankivsk National Medical University, Ukraine

Histological examination of the almond-shaped mouse complex after administration of extracts from *Calluna vulgaris* L. (Hull.)

To confirm the anti-anxiety and antidepressant effect of *Calluna vulgaris* L., histological examination of the almond-shaped complex of mice was performed after administration of extracts of *Calluna vulgaris* L. (Hull.). The almond-shaped complex was removed by frontal sectioning of the temporal lobe. The material was fixed in 10% neutral buffered formalin for histological examination, after which it was poured into paraffin blocks. The histological sections were stained with hematoxylin and eosin and studied under a Leika DM 750 optical microscope. The study of anti-anxiety and antidepressant effect of herb extracts of *Calluna vulgaris* (L.) was carried out in tests *Elevated cross-maze test*, *Cube*, *Tail suspension test*, *Porsolt test* (forced swim test), *Black and white camera*. In the optical examination of the almond-shaped complex of intact animals, there is a uniform distribution of medium-sized neurocytes. Nuclei of rounded shape are with clear contours. There are small neuroglia cells with a small number of narrow capillaries, with a light ventricular space. Nerve fibers are distinct. A microscopic examination of components of the almond-shaped complex after the introduction of a St. John's wort extract and a water-alcohol extract of *Calluna vulgaris* (L.) has shown that a morphological state of the structures of the almond-shaped body corresponds to that characteristic of the intact group.

Keywords: *Calluna vulgaris* (L.), water and water-alcohol extract, histological examination, anxiolytic properties.

УДК 616.322+616–092.9+615.451.1+582.688.33

Резюме

Старченко Г. Ю.

Івано-Франківський національний медичний університет

Гістологічне дослідження мигдалевидного комплексу мишей після введення екстрактів *Calluna vulgaris* L. (Hull.)

Для підтвердження протитривожного та антидепресивного действия вереска обыкновенного (*Calluna vulgaris* L. (Hull.)) было проведено гістологічне дослідження мигдалевидного комплексу мишей після введення екстрактів із даного рослини. В статті представлені результати дослідження мигдалевидного комплексу. Путем фронтальних срезов височной доли удаляли мигдалевидный комплекс; для гістологічного дослідження матеріал фіксували в 10% розстворі нейтрального формаліну і після гістологічного проведення заливали в парафінові блоки. Делали гістологічні зрізи, которые окрашивали гематоксилином і еозином і изучали под светооптическим микроскопом Leika DM 750. При микроскопическом исследовании компонентов мигдалевидного комплекса после введения экстракта зверобоя, водно-спиртового экстракта вереска морфологическое состояние структур мигдалевидного тела соответствует таковому, которое характерно для интактной группы.

Ключевые слова: вереск обыкновенный, экстракт водный и водно-спиртовой, гистологическое исследование, анксиолитические свойства.

Хронічна перенапруга й внутрішня психологічна конфліктність є повсякденністю сучасної людини, що відчуває на собі постійний тиск із боку соціальних й економічних інститутів [1]. Усе це є причиною значного підвищення числа хронічних захворювань, етіологія яких тісно пов'язана з особливостями психологічної сфери; за деякими даними, поширеність психосо-

матичних розладів в індустріальних країнах становить від 20 % до 30 % населення [2]. Одним з актуальних завдань сучасної фармації є пошук і створення нових анксиолітичних препаратів рослинного походження, які не будуть викликати серйозних побічних ефектів і матимуть м'яку фармакологічну дію на організм. Перспективною рослиною є верес звичайний (*Calluna*

vulgaris L. (Hull.)), водний екстракт якого має заспокійливу, протизапальну, сечогінну й антисептичну дію [3, 4]. Об'єктом дослідження був обраний мигдалеподібний комплекс, оскільки цей орган залучений у центральні механізми регуляції широкого кола фізіологічних процесів, починаючи від діяльності окремих органів і систем до цілісних поведінкових актів, які визначають адаптацію організмів, їх статево, харчову й агресивно-оборонну поведінку [5]. Зміна об'ємних характеристик мигдалеподібного комплексу, виявлена за допомогою новітніх методів дослідження мозку — комп'ютерної томографії та ядерно-магнітного резонансу — є ранньою діагностичною ознакою хвороби Альцгеймера, шизофренії, скроневої епілепсії [6].

Метою роботи було проведення гістологічного дослідження мигдалеподібного комплексу мишей після введення екстрактів із трави вересу звичайного для підтвердження їх протитривожної та антидепресивної дії.

Матеріали і методи досліджень

Розроблено параметри одержання екстрактів із трави вересу звичайного. Умовами виділення біологічно активних речовин (БАР) з трави є подрібнення сировини до розміру частинок 0.25-2.5 мм, екстрагування водою очищеною та 70% етанолом за температури 80-90 °С протягом 30 хв. Оптимальне співвідношення між сировиною та екстрагентами становило 1:10. Повнота виділення БАР досягалася за трикратної екстракції. З огляду на встановлені параметри, методом мацерації за температури 80-90 °С протягом 30 хв і сублімаційним висушуванням одержано сухі екстракти з трави вересу звичайного: ЕТВ-В (екстрагент — вода очищена), ЕТВ-Вс (екстрагент — 70% етанол). Максимальний вихід екстрактивних речовин (16.64 %) спостерігали за екстракції 70% етанолом [7].

Дослідження мигдалеподібного комплексу мишей з оцінювання протитривожних й антидепресивних властивостей екстрактів проведене на 35 білих нелінійних статевозрілих мишах-самцях масою 18-20 г, вирощених у розпліднику віварію ІФНМУ, які були стандартизовані за фізіологічними й біохімічними показниками й утримувались згідно з вимогами санітарно-гігієнічних норм на стандартному раціоні й з дотриманням гуманного ставлення до лабораторних тварин. Тварин утримували в стандартних санітарних умовах за температури 20-24 °С і вологості 50-55 % у природному світловому режимі «день — ніч» у пластикових клітках по 7 тварин у кожній на збалансованому харчовому раціоні відповідно до діючих норм.

Дослідження проводили в літній період з 10:00 по 19:00 год. Дослідження, догляд за тваринами й маніпуляції проведені одним постійним експериментатором. За годину до дослідження тварин позбавляли їжі й води. Експерименти проводили відповідно до методичних рекомендацій «Доклінічні дослідження лікарських засобів» [8]. Тварини були розділені на 5 груп, по 7 тварин у кожній. Тварини I, II і III групи одержували ЕТВ-Вс, ЕТВ-В й препарат порівняння — спиртовий екстракт звіробою — внутрішньоочеревинно в дозі 50 мг/кг маси тіла. Екстракти розчиняли у воді очищеній. Введення фітопрепаратів починали за 5 діб до дослідження, на 5-у добу — за 30 хв до експерименту. Тварини контрольної групи (IV група) отримували еквів'ємну кількість води очищеної. Інтактні тварини (V група) були взяті в експеримент для морфолого-анатомічного дослідження.

Дослідження протитривожної та антидепресивної дії екстрактів трави вересу звичайного проводили відповідно до «Інструкції з експериментального (доклінічного) вивчення нових фармакологічних речовин» у тестах «Піднятий хрестоподібний лабіринт», «Кубик», «Підвішування за хвіст», «Тест Порсолта», «Чорно-біла камера» [9-11] за консультативної допомоги зав. кафедри фармації, д. фарм. н, проф. Грицика А. Р., зав. кафедри психіатрії, наркології з курсом медичної психології, д. мед. н., професора Винника М. І. та к. мед. н., доцента кафедри анатомії людини Іваночка В. М.

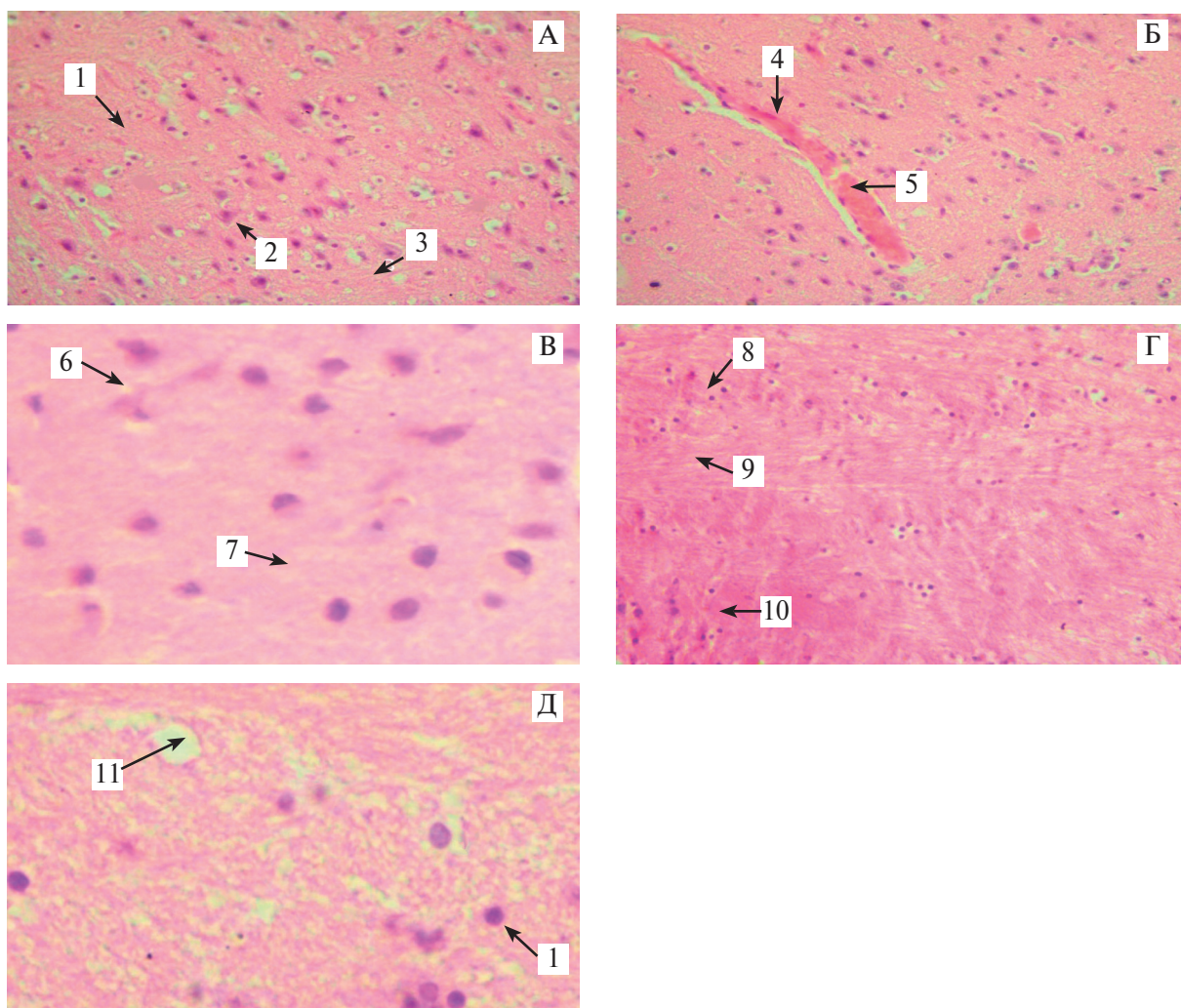
Після декапітації під тіопенталовим наркозом забирали головний мозок тварин. Фронтальними зрізами скроневої частки видаляли мигдалеподібний комплекс. Для гістологічного дослідження матеріал фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну й після гістологічного проведення заливали в парафінові блоки. Робили гістологічні зрізи, які фарбували гематоксилином і еозином і вивчали під світлооптичним мікроскопом Leika DM 750.

Результати досліджень та їх обговорення

Під час світлооптичного дослідження мигдалеподібного комплексу інтактних тварин (Рис. 1.А) спостерігається рівномірне розподілення середніх за розміром нейроцитів (Рис. 1.А2). Ядра нервових клітин округлої форми із чіткими контурами. Наявні невеликі клітини нейроглії (Рис. 1.А1) з незначною кількістю вузьких капілярів, зі світлим перевакулярним простором. Виражені нервові волокна (Рис. 1.А3).

Світлооптичне вивчення в умовах експериментального введення досліджуваних екстрактів показало певні особливості морфологічної реакції складових мигдалеподібного комплексу.

Рисунок



Гістоструктура мигдалоподібного комплексу:

А — інтактних тварин;

Б — після експериментального введення води очищеної;

В — після експериментального введення екстракту звіробою;

Г — після експериментального введення екстракту вересу ЕТВ-Вс;

Д — після експериментального введення екстракту вересу ЕТВ-В.

1 — нейроглія; 2 — нейроцити; 3 — нервові волокна (зб. $\times 400$); 4 — запальна інфільтрація судин і глії; 5 — повнокрів'я судин (зб. $\times 400$); 6 — нейрони; 7 — глія (зб. $\times 400$); 8 — нейрони; 9 — глія; 10 — нервові волокна (зб. $\times 200$); 11 — вакуолі; 12 — нейроцити (зб. $\times 400$).

Забарвлення — гематоксилін і еозин.

Так, під час дослідження матеріалу в групі, якій вводили воду (Рис. 2.Б), спостерігається делятація судин ГМЦ із заповненням просвіту форменими елементами, видимі ознаки запальної паравазальної інфільтрації судин і глії (Рис. 2.Б4). Цитоплазма різко просвітлена, ядра блідофіолетові, відмічається ефект «розрідження» пласта нейроцитів у результаті її набряку. Під час аналізу гістопрепаратів після експериментального введення водного екстракту вересу спостерігається незначна вакуолізація цитоплазми (Рис. 1.Д11).

Під час мікроскопічного дослідження компонентів мигдалеподібного комплексу після введення екстракту звіробою та екстракту вересу водно-спиртового морфологічний стан структур мигдалеподібного тіла відповідає такому, що характерний для інтактної групи.

Висновки

Дослідження психофармакологічних властивостей екстрактів трави вересу звичайного виявили їх протитривожну активність. Отримані дані гістологічного дослідження вказують на те, що в

разі введення екстракту звіробою та екстракту вересу водно-спиртового нервові клітини й глія зберігають сталу структурно-функціональну активність, що вказує на адаптаційно-захисний вплив складових цих екстрактів, тоді як введення екстракту вересу водного обумовлює певні компенсаторні зміни, вплив води на структурні компоненти обумовлює появу дистрофічних змін, що є морфологічним проявом на стресову ситуацію.

ЛІТЕРАТУРА

1. The powers of flowers: Evaluating the impact of floral therapy on pain and psychiatric symptoms in fibromyalgia / Yavne, Y. et al. // *Israel Medical Association Journal*. Volume 21, Issue 7, July 2019. P. 449-453.
2. 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*, Princeton University Press, 2016. № 1 (21). P. 1055-1059.
3. Пат. на корисну модель 124993 Україна, МПК (2018.01), А61К 36/00, А61Р 25/00. Засіб з протитривожною активністю / Старченко Г.Ю., Грицик А.Р., Винник М.І., Іваночко В.М. № у 2017 11809; заявл. 04.12.17; опубл. 25.04.18, Бюл. № 8.
4. Телішевська Г.Ю., Грицик А.Р. Верес звичайний — перспективна лікарська рослина. *Український медичний альманах*, 2012. Т. 15, № 1. С. 37-38.
5. Ахмадеев А.В., Калимуллина Л.Б. Миндалевидный комплекс как нейроэндокринный репродуктивный центр мозга: фундаментальные закономерности структурно-функциональной организации как основа для развития прикладных разработок и новых инновационных технологий // *Научное обозрение. Медицинские науки*. 2016. № 6. С. 15-31.
6. Ахмадеев А.В., Калимуллина Л.Б. Миндалевидный комплекс — ядерно-палеокортикальный компонент мозга // *Успехи современного естествознания*. 2007. № 11. С. 11-14.
7. Телішевська Г.Ю., Грицик А.Р. Одержання і стандартизація екстрактів вересу звичайного. *Український вісник психоневрології*. 2012. Т. 20, вип. 2 (71). С. 63-64.
8. Доклінічні дослідження лікарських засобів / [за ред. член. кор. АНУ України О.В. Стефанова]. Київ, 2001. С. 334-339.
9. Дослідження взаємозв'язків між вмістом основних груп БАР у настійці собачої кропиви (*Leonurus cardiaca*) трави та її психотропною активністю / Є.А. Романенко та ін. *Український біофармацевтичний журнал*. Харків, 2018. № 4 (57). С. 69-74.
10. Фітохімічне вивчення рідкого екстракту трави кропиви собачої та дослідження його психотропної активності / Є.А. Романенко та ін. // *Зб. наук. пр. співробітників НМАПО ім. П.Л. Шупика*. Київ, 2015. Вип. 24, № 5. С. 212-217.
11. Цеменко К.В., Кіреев І.В., Кошовий О.М. Оцінка емоційно-поведінкової реактивності у щурів після введення комплексу брусниці звичайної в комбінації з аргініном. *Український біофармацевтичний журнал*. 2019. № 1 (58). С. 50-54.

Старченко Галина Юрївна. К. фарм. н., асистент кафедри фармації Івано-Франківського національного медичного університету.

Starchenko Galyna Yuriivna. Ph. D. Assistant Professor of the Department of Pharmacy at Ivano-Frankivsk National Medical University.

Старченко Галина Юрєвна. К. фарм. н., асистент кафедри фармації Івано-Франківського національного медичного університету.

ISSN 2414-9195



9 772414 919001



15