

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

СМЕЛОВА НАТАЛІЯ МИКОЛАЇВНА

УДК: 547.455.65:615.32:658.562:615.07

**РОЗРОБКА МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ІНУЛІНУ У СУБСТАНЦІЯХ
РОСЛИННОГО ПОХОДЖЕННЯ ТА СИРОВИНІ *INULA HELENIUM L.***

15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

Автореферат

**дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фармацевтичних наук**

Харків – 2019

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Національному фармацевтичному університеті Міністерства охорони здоров'я України, м. Харків

Науковий керівник: доктор фармацевтичних наук, професор
ЄВТІФЄЄВА ОЛЬГА АНАТОЛІЇВНА,
Національний фармацевтичний університет,
професор кафедри фармацевтичної хімії

Офіційні опоненти: доктор хімічних наук, професор
СВЄЧНІКОВА ОЛЕНА МИКОЛАЇВНА,
Харківський національний педагогічний університет
імені Г. С. Сковороди, завідувач кафедри хімії

доктор фармацевтичних наук, професор
ВАСЮК СВІТЛАНА ОЛЕКСАНДРІВНА,
Запорізький державний медичний університет,
завідувач кафедри аналітичної хімії

Захист відбудеться «11» листопада 2019 р. о 12⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.01 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

Із дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Валентинівська, 4).

Автореферат розісланий «11» жовтня 2019 р.

В. о. вченого секретаря
спеціалізованої вченої ради,
професор

О. А. Рубан

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Щорічно на фармацевтичному ринку України спостерігається тенденція до розширення асортименту готових лікарських засобів (ГЛЗ), серед яких значну кількість складають препарати рослинного походження та лікарська рослинна сировина (ЛРС). Особливістю таких лікарських засобів (ЛЗ) є їх екологічність, полівалентність (різностороння спрямованість дії), м'яка дія, що досягається завдяки біологічній спорідненості до організму людини і, зі свого боку, зумовлює використання їх для профілактики та фармакотерапії багатьох захворювань.

Однак необхідною умовою для виробництва ефективних та безпечних ЛЗ є контроль якості усього життєвого циклу препарату, також і на етапі відбору активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) та вихідної сировини. На підставі рекомендацій ІСН Q8 на етапі розробки ЛЗ мають бути визначені фізико-хімічні та біологічні властивості лікарської речовини, які можуть впливати на функціональні характеристики ГЛЗ і можливість його виробництва. Гарантом якості використовуваних субстанцій є установлення і застосування єдиної системи показників та методів контролю.

Так, на сьогоднішній день поширення при виготовленні ЛЗ набув поліфруктозан інулін, який, по-перше, володіє низкою цінних фармакологічних ефектів та використовується для профілактики і комплексної фармакотерапії таких захворювань сучасності, як дисбактеріоз, цукровий діабет, атеросклероз тощо, а по-друге, виступає як допоміжна речовина при виробництві ЛЗ, виконуючи роль стабілізатора для вакцин, наповнювача, текстуроутворювача та забезпечуючи спрямовану (таргетну) доставку діючої речовини до дистальних відділів товстого кишечника. Окрім того, за межами України існує парентеральний препарат з інуліном, що використовується як еталон у лабораторній практиці для визначення швидкості клубочкової фільтрації при захворюванні нирок.

На вітчизняному фармацевтичному ринку існує значна кількість дієтичних добавок (ДД) з інуліном, їх кількість щороку зростає, значно поширена і сировинна база для його одержання на території України. Однак лише стандартизований продукт можна використовувати при створенні нових ЛЗ та / або ДД. Структура ж наведеного поліфруктану досить варіативна, до того ж, залежно від джерела отримання розрізняється і ступінь полімеризації інуліну, що, зрештою, ускладнює процес стандартизації.

У Державній фармакопеї України (ДФУ) на сьогоднішній день відсутня монографія, яка б регламентувала показники якості субстанції інуліну. Джерелами нормативної документації (НД) є лише монографії «Inulin» Британської (British Pharmacopoeia 2010, БФ) та Американської фармакопей (USP 38 – NF 33, АФ) і стаття у Кодексі харчових продуктів (Food Chemicals Codex 10, КХП). Таким чином, зазначені вище проблеми визначають актуальність дослідження за цим напрямком.

Одним із розповсюджених джерел для одержання інуліну є кореневища та корені оману високого (*Inula helenium* L.). Цей вид ЛРС зазвичай стандартизують лише за одним класом сполук – ефірними оліями (вміст яких, за літературними

джерелами, варіює від 1 до 3 %). Однак, враховуючи, що хімічний склад кореневищ та коренів оману до 40 % може бути представлений полісахаридом інуліном, все більше наукових досліджень присвячено питанню стандартизації сировини за двома класами сполук, оскільки вони виявляють різну фармакологічну активність та застосовуються для фармакотерапії принципово відмінних патологічних станів.

Актуальність дослідження пов'язана також з тим, що оман високий – поширена на території України рослина, яка здавна використовується як в офіциналній, так і в народній медицині. Однак для контролю якості сировини також відсутня сучасна НД у ДФУ, що зумовлює науковий інтерес за цим напрямком.

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

Дисертаційна робота є фрагментом комплексних науково-дослідних робіт Національного фармацевтичного університету «Розробка та валідація методів контролю якості лікарських засобів аптечного та промислового виробництва» (№ державної реєстрації 0114U000949), «Фармакогностичне дослідження лікарської рослинної сировини та розробка фітотерапевтичних засобів на її основі» (№ державної реєстрації 0114U000946). Дисертантом особисто виконані дослідження щодо розробки методик контролю якості інуліну у субстанціях рослинного походження та сировині *Inula helenium* L.

Мета і завдання дослідження. Метою дисертаційної роботи було проведення дослідження субстанцій інуліну рослинного походження та ЛРС оману високого відповідно до вимог провідних фармакопей; визначення показників якості для субстанцій інуліну та ЛРС оману високого за вмістом інуліну; розробка та вивчення валідаційних характеристик методик контролю якості; розробка проектів монографії ДФУ на субстанцію інуліну для фармацевтичного використання та субстанцію, що призначена для виготовлення ДД, ЛРС оману високого.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

- проаналізувати та узагальнити сучасні літературні дані щодо синтезу, хімічної структури, загальних фізико-хімічних властивостей, джерел добування та фармакологічних властивостей інуліну, а також дані щодо ботанічної характеристики, географічного розповсюдження, хімічного складу та застосування в медицині ЛРС *Inula helenium* L.;

- провести аналітичний огляд сучасних ЛЗ та ДД, до складу яких входять субстанції інуліну рослинного походження та сировина оману високого;

- провести порівняльний аналіз підходів до контролю якості субстанції інуліну та ЛРС оману високого за вимогами існуючої НД; обґрунтувати необхідність розробки сучасних критеріїв стандартизації субстанції інуліну та вітчизняної ЛРС оману високого;

- провести дослідження щодо оцінки якості АФІ інуліну за фізико-хімічними показниками; ідентифікувати структурні компоненти поліфруктозану хімічними реакціями ідентифікації й установити чистоту субстанції відповідно до вимог провідних фармакопей;

- розробити сучасні методики ідентифікації та кількісного визначення субстанції інуліну методами тонкошарової хроматографії (ТШХ), високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) та дослідити їх валідаційні характеристики;

- оптимізувати існуючу методику кількісного визначення інуліну методом абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій та видимій областях (СФ) для її використання у рутинному аналізі, провести ревалідацію методики;
- визначити основні діагностичні морфолого-анатомічні ознаки оману високого та визначити показники якості для стандартизації вітчизняної сировини за вмістом інуліну;
- розробити методики ідентифікації та визначення кількісного вмісту інуліну у ЛРС оману високого методами ТШХ та ВЕРХ; визначити їх валідаційні характеристики;
- дослідити кількісний вміст інуліну у ЛРС оману високого методом гравіметрії;
- розробити проекти монографій ДФУ на субстанцію інуліну для фармацевтичного використання та субстанцію, що призначена для виготовлення ДД, а також на ЛРС оману високого.

Об'єкт дослідження – контроль якості субстанцій інуліну рослинного походження та ЛРС оману високого за вмістом інуліну;

Предмет дослідження – розробка методик ідентифікації, встановлення чистоти та кількісного визначення інуліну у субстанціях рослинного походження та сировині *Inula helenium* L.; вивчення валідаційних характеристик методик; розробка проектів національних монографій на субстанцію інуліну для фармацевтичного використання, інуліну для виготовлення дієтичних добавок та ЛРС оману високого.

Методи дослідження. Для вирішення поставлених завдань були використані такі методи: фізико-хімічні, фармако-технологічні, методи фармакогнозії, ідентифікації структурних компонентів інуліну, випробування на вміст домішок.

Фізико-хімічні методи дослідження застосовували для визначення прозорості, ступеня каламутності рідин, ступеня забарвлення рідин, потенціометричного визначення рН та кислотності розчинів, оптичного обертання, втрати в масі при висушуванні, арсену, розчинності та ступеня гігроскопічності субстанцій інуліну; фармако-технологічні – для визначення морфологічних властивостей АФІ.

Хроматографічні методи аналізу (ТШХ, ВЕТШХ, ВЕРХ) використовували для розробки та вивчення валідаційних характеристик методик контролю якості інуліну у субстанціях та інуліну у ЛРС оману високого; метод ексклюзивної хроматографії – для визначення молекулярної маси субстанцій інуліну.

Спектральні методи аналізу (СФ) були використані для кількісного визначення інуліну у субстанціях рослинного походження; хімічні методи аналізу – для ідентифікації компонентів поліфруктозану, визначення домішок; методи комплексонометричного титрування – для кількісного визначення домішки кальцію у субстанціях інуліну.

Методи фармакогнозії застосовували для макро- та мікроскопічного дослідження ЛРС оману високого; методи гравіметрії – для кількісної оцінки водорозчинних полісахаридів у сировині *Inula helenium* L.

Статистичну обробку результатів експерименту, визначення валідаційних характеристик методик виконували відповідно до вимог діючого видання ДФУ.

Наукова новизна отриманих результатів. Уперше проведено аналітичний огляд сучасних ЛЗ та ДД з інуліном та ЛРС оману високого, що представлені на фармацевтичному ринку України.

Уперше проведено аналіз сучасних фармакопейних підходів щодо контролю якості АФІ інуліну рослинного походження та ЛРС оману високого.

Уперше розроблено методику ідентифікації та одночасного визначення чистоти АФІ інуліну, а також методику виявлення інуліну у ЛРС оману високого методом ТШХ, вивчено їх валідаційні характеристики, проведено апробацію методик для їх застосування методом високоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ).

Уперше розроблено методику кількісного визначення інуліну у субстанціях рослинного походження та інуліну в оману високого кореневищах та коренях методом ВЕРХ із випарним детектором світлорозсіювання (ВДС-детектор), визначено їх валідаційні характеристики.

Оптимізовано методику кількісного визначення інуліну в субстанціях рослинного походження в перерахунку на фруктозу методом СФ у варіанті питомого показника поглинання (ППП), визначено її ревалідаційні характеристики.

Оптимізовано методику визначення водорозчинних полісахаридів (у перерахунку на інулін) методом гравіметрії, розраховано метрологічні характеристики методики.

Уперше розроблено національні проекти монографій «Інулін^N», «Інулін для виготовлення дієтичних добавок^N» та «Оману кореневища та корені^N» для їх впровадження до ДФУ.

Практичне значення отриманих результатів. За результатами експериментальних досліджень розроблено проекти монографій ДФУ «Інулін^N» «Інулін для виготовлення дієтичних добавок^N» та «Оману кореневища та корені^N».

Розроблено та валідовано сучасну методику ідентифікації та визначення чистоти АФІ інуліну рослинного походження для здійснення вхідного контролю якості субстанції. За результатами проведених досліджень оформлено інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я «Ідентифікація та визначення чистоти рослинних активних фармацевтичних інгредієнтів інуліну методом тонкошарової хроматографії» № 205 – 2018 (рішення ЕПК «Фармація», Протокол № 104 від 24.10.2018 р.). Методику запроваджено у роботу Державної науково-дослідної лабораторії з контролю якості ЛЗ Національного фармацевтичного університету (ДНДЛ з КЯЛЗ НФаУ), Державної служби з лікарських засобів та контролю за наркотиками у Харківській області, ПАТ «Хімфармзавод «Червона зірка», ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я», АТ «Стома», ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів» (ДП УНФЦЯЛЗ).

Результати дослідження щодо контролю якості субстанцій інуліну та оману високого кореневищ та коренів упроваджено в науково-дослідну роботу кафедри фармацевтичної хімії та фармакогнозії ДЗ «Луганський державний медичний університет», кафедри фармації та фармакології Донецького національного медичного університету.

Особистий внесок здобувача. Усі наведені у роботі експериментальні дослідження виконані дисертантом особисто: проведено інформаційно-патентний

пошук джерел літератури, що присвячений питанню стандартизації та контролю якості; аналіз сучасного фармацевтичного ринку ЛЗ, ДД з інуліном та з ЛРС оману високого; виконано експериментальну частину дисертації; проведено статистичну обробку результатів; оформлено всі наведені розділи дисертаційної роботи; на основі одержаних експериментальних даних сформульовано загальні висновки.

Автором безпосередньо взято участь у розробці та оформленні патенту України на корисну модель, інформаційного листа про нововведення у сфері охорони здоров'я, наукових статей і тез доповідей для участі у науково-практичних конференціях. Персональний внесок в опублікованих наукових працях зі співавторами (О. А. Євтіфеєвою, С. М. Губарь, В. А. Георгіянц, Е. Е. Котовою, А. Г. Котовим, Л. В. Вепрецькою, К. І. Проскуріною, О. М. Безчаснюк, А. І. Крюковою, К. В. Динник, І. Ю. Петуховою, О. Г. Кизим та ін.) наведений за текстом дисертації та в авторефераті у списку фахових публікацій.

Більшість експериментальних досліджень було виконано на базі ДНДЛ з КЯЛЗ НФаУ за консультуванням завідувача лабораторії, к. фарм. н. Губарь Світлани Миколаївни. Решту досліджень проводили на базі Науково-дослідної лабораторії парентеральних та оральних рідких лікарських засобів НФаУ за консультуванням завідувача лабораторії, д. фарм. н., проф. Алмакаєвої Людмили Григорівни, де були визначені морфологічні властивості (форми і розміру порошку) субстанцій інуліну; на базі Державної служби з лікарських засобів та контролю за наркотиками у Харківській області за консультуванням завідувача лабораторії Вепрецької Людмили Володимирівни було проведено визначення показника «Оптичне обертання» для субстанцій інуліну рослинного походження; на базі ДУ «Інституту монокристалів НАН України» у відділі аналітичної хімії ім. А. Б. Бланка за консультуванням Шеїної Тетяни Володимирівни проведено вивчення кількісного вмісту арсену у субстанціях інуліну; на базі кафедри ботаніки НФаУ за консультуванням д. фарм. н., проф. Гонтової Тетяни Миколаївни досліджені макро- та мікроскопічні показники якості ЛРС оману високого; в межах співробітництва з Литовським університетом наук про здоров'я (м. Каунас) на базі кафедри аналітичної та токсикологічної хімії за консультуванням проф. Людаса Іванаускаса виконано дослідження щодо розробки та визначення валідаційних характеристик методик контролю якості інуліну у субстанціях та у ЛРС оману високого.

Дослідження щодо впровадження методик контролю якості до монографій «Інулін^N», «Інулін для виготовлення дієтичних добавок^N» та «Оману високого кореневища та корені^N» до ДФУ проводились під керівництвом начальника відділу ДФУ ДП УНФЦЯЛЗ д. фарм. н, с. н. с. Котова Андрія Георгійовича та завідувача сектору Експериментальної підтримки розробки монографій на ЛРС ДП УНФЦЯЛЗ, с. н. с. Котової Еліни Едуардівни.

Апробація результатів дисертації. Основний зміст дисертаційної роботи викладено та обговорено на таких науково-практичних конференціях: VIII науково-практична конференція з міжнародною участю «Управління якістю в фармації» (Харків, 23 травня 2014 р.); VI Міжнародна науково-практична конференція «Перспективи розвитку наукових досліджень в 21 столітті» (Махачкала, 31 жовтня 2014 р.); Міжвузівська конференція молодих вчених та студентів

«Медицина третього тисячоліття» (Харків, 20 січня 2015 р.); Научно-практическая конференция молодых ученых и студентов ТГМУ им. Абуали ибни Сино с международным участием, посвящённая 25-летию государственной независимости Республики Таджикистан «Медицинская наука: достижения и перспективы» (Душанбе, 29 квітня 2016 р.); II Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Аналітична хімія у фармації» (Харків, 17 березня 2016 р.); II Міжнародна науково-практична internet-конференція «Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин» (Харків, 21-23 березня 2016 р.); XXIII Міжнародна науково-практична конференція молодих вчених та студентів «Topical issues of new drugs development» (Харків, 21 квітня 2016 р.); XXIV Міжнародна науково-практична конференція молодих вчених та студентів «Topical issues of new drugs development» (Харків, 20 квітня 2017 р.); Chemistry Conference for Young Scientists (Бланкенберг, 21-23 лютого 2018 р.); II Міжнародна науково-практична конференція «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів» (Харків, 28-29 березня 2018 р.); XXV Міжнародна науково-практична конференція молодих вчених та студентів «Topical issues of new drugs development» (Харків, 18-20 квітня 2018 р.); I Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження» (Харків, 5 квітня 2018 р.); VII науково-практична конференція з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (Харків, 27-28 вересня 2018 р.); 9-та міжнародна конференція з фармації «Science and practice» (Каунас, 9 листопада 2018 р.); 66 научно-практическая конференция с международным участием «Роль и место инновационных технологий в современной медицине» ТГМУ им. Абуали ибни Сино (Душанбе, 23 листопада 2018 р.).

Публікації. За матеріалами дисертації опублікована 21 наукова праця: 6 статей у фахових виданнях, з яких 1 стаття у виданні, що індексується у наукометричній базі Scopus, 1 інформаційний лист про нововведення у сфері охорони здоров'я, 15 тез доповідей на науково-практичних конференціях; отримано 1 патент України на корисну модель.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 276 сторінках машинописного тексту, складається зі вступу, 4 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел літератури та 6 додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає 168 сторінок друкованого тексту. Робота ілюстрована 65 таблицями та 64 рисунками. Список використаних джерел містить 255 найменувань, з них 175 кирилицею та 80 латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Розділ 1. Інулін – представник фруктанів – перспективне джерело для створення нових лікарських засобів (Огляд літератури). В огляді літератури представлено критичний аналіз наукових даних щодо особливостей синтезу, хімічної структури та загальних фізико-хімічних властивостей інуліну, охарактеризовано

існуючі джерела його добування, наводиться перелік інуліновмісної ЛРС, що поширена на території України. Надано ботанічну характеристику, хімічний склад оману високого як одного із розповсюдженого джерела одержання інуліну. Установлено, що поліфруктозан знаходить своє застосування у харчовій промисловості, косметології та медицині. У медицині та фармації інулін використовується як еталонний препарат для визначення швидкості клубочкової фільтрації при захворюваннях нирок, для виготовлення ДД (як активний інгредієнт та допоміжна речовина). Досліджено, що серед основних фармакологічних ефектів інуліну є гіпоглікемічний, пробіотичний, гіпохолестеринемічний, імуномодулювальний, а також вплив на обмін кальцію та магнію. Тому розробка методик контролю якості інуліну у субстанціях рослинного походження та сировині *Inula helenium* L. є актуальним завданням.

Розділ 2. Сучасні підходи до контролю якості субстанцій інуліну рослинного походження та ЛРС оману високого. Обґрунтування вибору об'єктів та методів дослідження. З урахуванням відомостей, наведених у розділі 1, проведено аналіз сучасних ЛЗ, ДД з інуліном та з ЛРС оману високого, що присутні на фармацевтичному ринку України. Установлено, що значна кількість ДД з інуліном представлена засобами вітчизняного виробництва (73,81 %), які є комбінаціями з іншими активними компонентами (пробіотиками, ЛРС, солями кальцію, вітамінами) у вигляді твердих лікарських форм (таблеток, капсул, саше) та загалом використовуються в комплексній фармакотерапії цукрового діабету II типу, дисбактеріозу, атеросклерозу тощо. Субстанції інуліну, що входять до складу ДД, одержані з таких рослинних джерел, як цикорій, топінамбур, оман, агава тощо. Серед ЛЗ із сировини оману високого на вітчизняному ринку представлені як подрібнена ЛРС, так і комбіновані ЛЗ, що використовуються як відхаркувальні, тонізувальні та противиразкові засоби.

Об'єктами дисертаційного дослідження були обрані субстанції інуліну рослинного походження, що одержані з *Cichorium intybus* L., *Agave americana* L., *Helianthus tuberosus* L., *Dahlia pinnata* L. та ЛРС оману високого, що була заготовлена протягом 2017-2018 рр. на території України.

Для вибору стратегії дослідження було проведено порівняльний аналіз підходів до контролю якості субстанцій інуліну за вимогами монографій «Inulin» БФ, АФ, КХП, а також ЛРС оману високого за вимогами відповідних монографій, що наведені у Французькій фармакопеї (ФФ), Британській рослинній фармакопеї (БРФ), Державній фармакопеї Республіки Казахстан (ДФ РК), Державній фармакопеї Республіки Білорусь (ДФ РБ), Державній фармакопеї СРСР XI (ГФ XI), а також у Стандартах Гонконгської Китайської медицини (СГКМ).

Обґрунтовано необхідність у розробці національної НД для контролю якості субстанції інуліну для фармацевтичного використання та для поліфруктозану, що призначений для виготовлення ДД, а також ЛРС оману високого.

Наведено характеристику об'єктів дослідження, приладів, матеріалів та методів, що були використані при проведенні аналізу. На підставі вищенаведеного обґрунтовано актуальність і доцільність комплексних досліджень.

Розділ 3. Розробка сучасних критеріїв якості субстанції інуліну рослинного походження. Для прогнозування практичного використання та фізико-хімічних властивостей субстанцій інуліну рослинного походження методом ексклюзійної хроматографії проводили визначення молекулярної маси, розрахунок якої виконували з використанням програмного забезпечення гель-фільтрації. Молекулярна маса аналізованих зразків субстанцій інуліну, які одержані з різних рослинних джерел, склала від 2119 до 3548.

Іншими завданнями контролю якості аналізованих сполук при проведенні стандартизації були їх ідентифікація та дослідження критичних характеристик. У ході експерименту було встановлено, що аналізовані субстанції інуліну за показником «Опис» являють собою аморфні порошки білого (серії 01, 04, 06, 07, 09-11), майже білого (серії 03, 08) та блідо-жовтого (серії 02, 05) кольору, без запаху, серії 10 та 11 можна охарактеризувати як пухкі наче крейда. За ступенем гігроскопічності зразки гігроскопічні (серії 01, 03, 07-11) та дуже гігроскопічні (серії 02, 04-06), що треба враховувати при виготовленні ГЛЗ з інуліном. Субстанції легко та дуже легко розчинні у гарячій воді *P* та малорозчинні в органічних розчинниках (*хлороформ P*, *ацетонітрил P*, *метанол P*). За тестом «Розчинність у воді *P*» серії 01, 06, 09 – малорозчинні, решта – розчинні та легкорозчинні, що можна пояснити наявністю низькомолекулярних фракцій інуліну або присутністю сторонніх домішок цукрів.

При дослідженні морфології субстанцій інуліну методом світлової мікроскопії в *етанолі (96 %) P* встановлено, що зразки серії 02-09 виглядають як маси з великими сферичними чи яйцеподібними частинками, які повністю або частково фрагментовані. Подібні утворення можна охарактеризувати як псевдоморфні або псевдокристалічні, для яких виражені центральні міцели, що мають вигляд чорних ядер, і периферичні напівпрозорі оболонки, а також невеликі частинки інуліну (у вигляді темних крапок), що відділяються від основних псевдо-кристалічних утворень. Зразки серій 01, 10, 11 також являють собою повністю або частково фрагментовані сферичні чи яйцеподібні частинки, однак завдяки подрібненню більшого ступеня субстанції мають менший розмір.

Структурний склад інуліну підтверджували хімічними реакціями ідентифікації після гідролізу речовини, де серії інуліну 01-11 мали червоне забарвлення у реакції Селіванова, що підтверджує наявність кето-групи, а також оранжево-червоний та темно-червоний осад у реакції з реактивом Фелінга після гідролізу, що вказує на присутність альдегідної групи. Також, враховуючи, що макромолекула інуліну не володіє відновними властивостями, проводили реакцію з реактивом Фелінга без гідролізу речовини. Для серій 10-11 спостерігали слабкий перебіг реакції, тоді як для серії 01-09 реакція не проходила при кімнатній температурі, однак при нагріванні протягом 1 хв спостерігали появу оранжево-червоного осаду, що свідчить про присутність домішок інших цукрів, які мають властивості відновників. Аналогічний результат одержаний у тесті «Цукри, що відновлюються» розділу «Випробування» за вимогами БФ, де за однакових умов проводили титрування реактиву Фелінга розчином інуліну та 0,20 % розчином фруктози: для серій 01-09 об'єм розчину фруктози, що витратився на титрування, значно перевищує об'єм розчину інуліну, що також вказує на присутність сторонніх цукрів.

Досліджували чистоту субстанцій інуліну за тестами «Прозорість і ступінь каламутності рідин», «Ступінь забарвлення рідин», за якими лише зразки серій 01, 04, 06, 08-11 відповідають вимогам НД, розчини яких прозорі та безбарвні.

Діапазон рН для зразків інуліну склав від 4,014 до 7,271, за яким лише серії 01, 04, 06-11 входять у діапазон допустимих значень згідно з АФ. За тестом «Кислотність» лише зразки 01, 04-10 відповідають вимогам БФ. Для впровадження до ДФУ запропонований тест «рН» із нормуванням від 4,5 до 7,0 у зв'язку з тим, що речовина піддається гідролізу при додаванні розчинів кислот / лугів. Тому при впровадженні монографії до ДФУ показано проведення «рН».

Експериментальним шляхом встановлено, що визначення оптичного обертання розчинів інуліну доцільно проводити через 30 хв після їх приготування і додатково прискорювати можливий процес мутаротації та / або рацемізації можливих домішок цукрів шляхом додавання *аміаку розчину розведеного Р1*. Запропоновано встановити критерій для питомого оптичного обертання для 10,0 % водного розчину інуліну на рівні від -32,0 до -40,5 (інуліну для фармацевтичного використання) та від -15,0 до -40,5 (для інуліну, що призначений для виготовлення ДД).

Для контролю аніонів та катіонів запропоновані межі вмісту хлоридів не більше 170 *ppm*, сульфатів – не більше 200 *ppm*, оксалатів – не більше 0,003 %, кальцію – не більше 270 *ppm* (за вимогами БФ), залізо – мають бути відсутні (за вимогами АФ), за якими всі аналізовані серії відповідають вимогам НД.

Визначення кількісного вмісту арсену проводили методом електротермічного атомно-абсорбційного аналізу. В результаті досліджень встановлено, що для аналізованих серій інуліну його вміст складає від 0,023 до 0,610 мг/кг (*ppm*) та не перевищує допустимих нормувань 1 *ppm* за вимогами БФ.

Запропоновано критерії до нормування вмісту важких металів (не більше 5 *ppm*) за вимогами АФ, за яким усі аналізовані серії відповідають вимогам. Проведено визначення сульфатної золи за БФ та сульфатної золи з урахуванням вмісту кальцію за АФ. Для впровадження методу до ДФУ рекомендовано проводити визначення за вимогами БФ та встановити межі нормування не більше 0,2 %. Для аналізованих серій субстанцій інуліну відповідають вимогам усі серії субстанцій, крім 03.

Втрата в масі при висушуванні склала від 3,60 % до 6,98 %, що входить до діапазону допустимих значень 10,0 % відповідно до вимог БФ та АФ. У зв'язку з тим, що субстанції гігроскопічні та дуже гігроскопічні, запропоноване верхнє нормування – 10,0 %.

Підібрано оптимальні умови для ідентифікації та визначення чистоти субстанції інуліну методом ТШХ (за маркерами фруктозою, глюкозою, сахарозою, лактозою та мальтодекстрином) із двократним елююванням у рухомій фазі *кислота оцтова льодяна Р – хлороформ Р – вода Р (70:60:10)* на хроматографічних пластинах *силикагель Р* з їх попередньою імпрегнацією 0,3 % розчином натрію ацетату та детектуванням хроматографічних зон дифеніламін-анілін-фосфорнокислим реактивом. Визначено валідаційні характеристики методики (специфічність, робасність, прецизійність). Специфічність оцінювали на одній пластинці у порівнянні з розчинами-маркерами; при визначенні робасності оцінювали вплив умов проведення хроматографування на кінцевий результат (вплив типу нерухомої фази,

насиченість камери, об'єм нанесення, відстані від лінії старту до фінішу, кратність елюювання, тривалість гідролізу, вплив проявника, стабільність розчинів для нанесення).

Ідентифікацію субстанцій рекомендовано проводити за розчином інуліну після гідролізу розчином кислоти щавлевої протягом 10 хв (рис. 1 – А), визначення чистоти – за розчином інуліну без гідролізу (рис. 1 – Б). За результатами дослідження в усіх серіях субстанцій (01-11) ідентифіковано інулін, для серій 01-09 підтверджено наявність домішок вільних цукрів.

Установлено умови для використання методики методом ВЕТШХ з однократним елююванням: зменшена відстань, що має пройти рухома фаза, до 7 см та об'єм проб до 2 мкл.

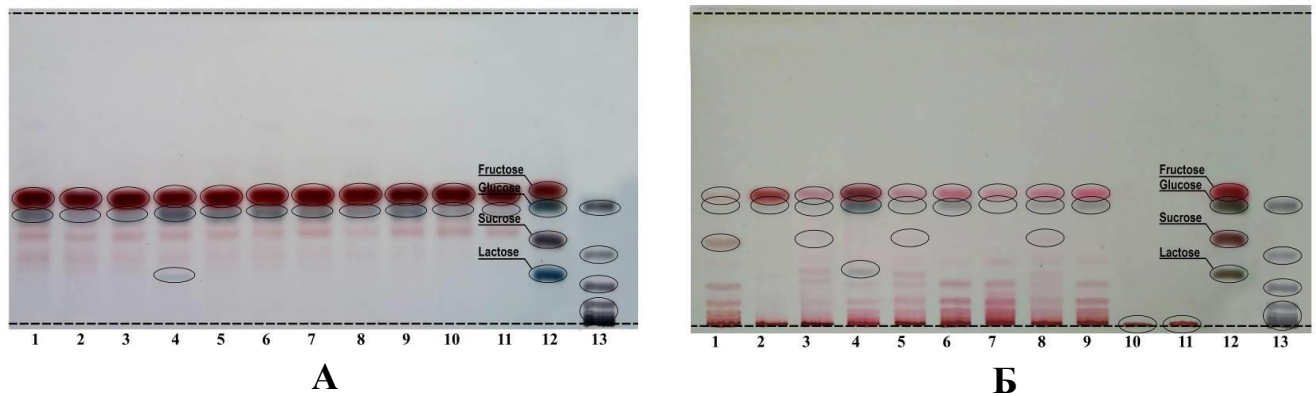


Рис. 1 Хроматограми випробовуваних субстанцій інуліну після гідролізу (А) та без гідролізу (Б) для серій 01-11 (1-11); розчин стандартних речовин фруктози, глюкози, сахарози та лактози (12), розчин стандартної речовини мальтодекстрину (13) на ТШХ-пластині Silica gel 60 (Merck) з алюмінієвою підкладкою

Розроблені критерії до нормування:

- інуліну для фармацевтичного використання – не мають бути присутні інші зони на хроматограмі розчину інуліну без гідролізу;
- для інуліну, що призначений для виготовлення ДД – допускається наявність зон фруктози, глюкози, сахарози та лактози, однак мають бути відсутні хроматографічні зони, що відповідають мальтодекстрину.

Розроблено методику для кількісного визначення інуліну у субстанціях методом ВЕРХ із ВДС-детектором у перерахунку на висушену речовину, вивчено її валідаційні характеристики (рис. 2, 3).

Методика є лінійною в досліджуваному діапазоні 80-120 %, що підтверджується рівнянням лінійності $Y_i = 0,9913 \cdot X_i + 0,7908$, $r = 0,9998$ та розрахованими метрологічними характеристиками (табл. 1, рис. 4).

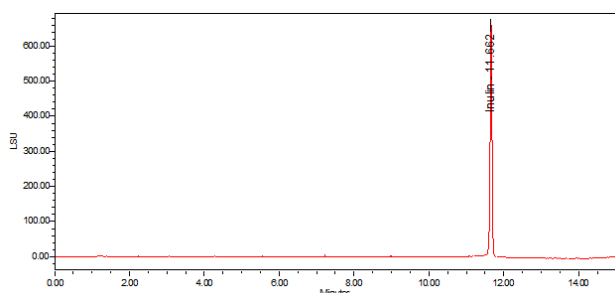


Рис. 2 Хроматограма розчину порівняння

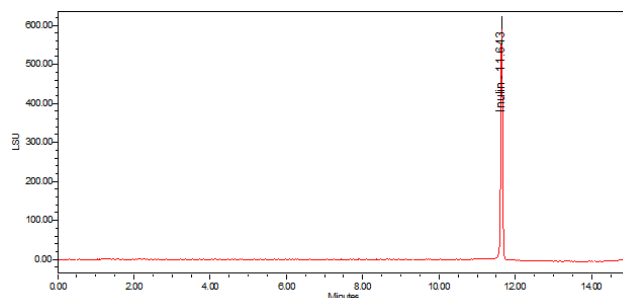


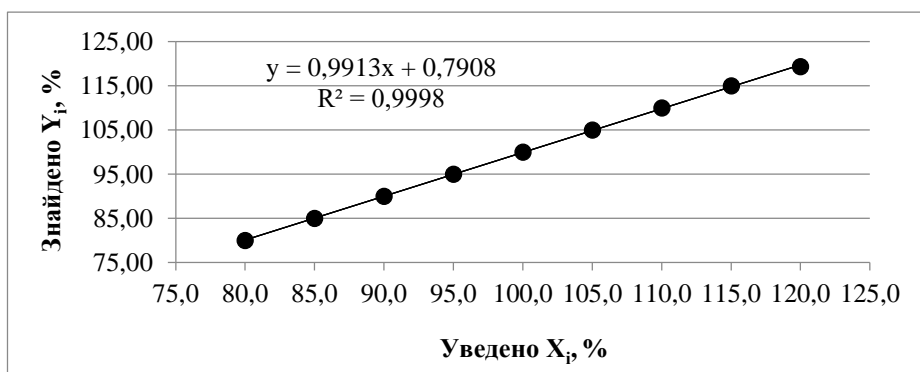
Рис. 3 Хроматограма випробовуваного розчину (серія 10)

Таблиця 1

Дані перевірки лінійності методики кількісного визначення інуліну у субстанціях рослинного походження методом ВЕРХ із ВДС-детектором

Параметр	Вимоги	Отримане значення	Виконання критерію
a	$\leq 3,2$	0,928	Виконується
S_0	$\leq 1,06$	0,401	Виконується
r	$> 0,9970$	0,9996	Виконується

Систематична похибка ($\delta = 0,06 \leq 0,11$ %) є незначущою, відносний довірчий інтервал $\Delta Z = t(95\%, 8) \cdot s_z = 1,8595 \cdot s_z = 0,55 \leq 2,0$ %, що підтверджує коректність методики та її відповідність вимогам ДФУ (табл. 2).

Рис. 4 Графік лінійної залежності $Y_i = b \cdot X_i + a$ для стандартного розчину інуліну

Таблиця 2

Результати перевірки параметрів правильності та збіжності методики кількісного визначення інуліну у субстанціях рослинного походження методом ВЕРХ із ВДС-детектором

	Параметр	Значення	Критерій, %	Оцінка
Прецизійність	ΔZ	0,55	$\leq 2,0$	Виконується
Правильність	$ \bar{Z} - 100 $	0,09	$\leq 0,11$	Виконується за двома критеріями
			$\leq 0,64$	

Досліджено, що вміст інуліну у субстанціях становить від 85,26 до 98,29 %. Запропоноване нормування кількісного вмісту для субстанцій фармацевтичної якості від 94,0 до 102,0 %, для субстанцій, що призначені для виготовлення ДД – не менше 85 %.

Оптимізовано методику кількісного визначення інуліну методом СФ, що призначена для рутинного аналізу методом ППП після кислотного гідролізу субстанції до 5-гідроксиметилфурфуролу (5-ГМФ). Розраховано значення ППП для розчину стандарту фруктози, що становить $258 \pm 3,0$, та досліджено оптимальний час гідролізу субстанції – 90 хв. Вивчено валідаційні характеристики методики.

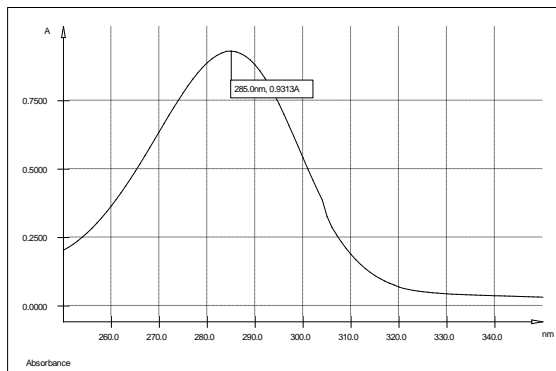


Рис. 5 Спектр поглинання 5-ГМФ

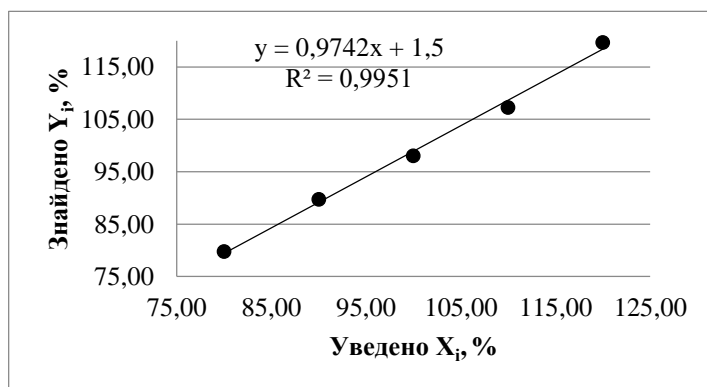


Рис. 6 Графік лінійної залежності при спектрофотометричному визначенні інуліну у варіанті методу ППП

Розчини стабільні протягом години, $\Delta_t = 0,38 \%$ для випробовуваного розчину $\leq 2,83 \text{ мах} \delta_{\text{tot}}$. Методика є лінійною у досліджуваному діапазоні 80-120 %, що підтверджується рівнянням лінійності $Y_i = 0,9742 \cdot X_i + 1,5$, $r = 0,9951$ та розрахованими метрологічними характеристиками (рис. 6, табл. 3).

Таблиця 3

Метрологічні характеристики лінійної залежності методики кількісного визначення інуліну у субстанціях рослинного походження методом СФ у варіанті ППП

Показник	Значення	Критерій (для допуску 94-102%)	Висновок
b	0,9742	–	–
S_b	0,9870	–	–
a	1,5000	1) статистична незначущість $\leq t(95\%;g-2) \cdot S_a = 2,37 \cdot S_a = 2,90$ 2) допустиме значення $\leq 5,84$	Відповідає
S_a	1,2247	–	–
S_0	1,07	2,83	Відповідає
r^2	0,9951	$\geq 0,9942$	Відповідає

Систематична похибка ($\delta = 1,04 \leq 1,79 \%$) є незначущою, відносний довірчий інтервал $\Delta Z = t(95\%,4) \cdot s_z = 2,1318 \cdot s_z = 2,27 \leq 2,83 \%$, що підтверджує коректність методики та її відповідність вимогам ДФУ (табл. 4).

Розроблено проекти національних монографій для контролю якості інуліну для фармацевтичного використання та інуліну, що призначений для виготовлення ДД, для їх упровадження до ДФУ.

**Результати перевірки параметрів правильності, збіжності результатів
методики кількісного визначення інуліну методом СФ**

	Параметр	Значення	Критерій, %	Оцінка
Прецизійність	ΔZ	2,27	$\leq 2,83$	Виконується
Правильність	$ \bar{Z} - 100 $	1,04	$\leq 1,79$	Виконується за двома критеріями
			$\leq 2,83$	

Розділ 4. Стандартизація вітчизняної лікарської рослинної сировини оману високого за вмістом інуліну. Із метою розробки національної монографії на ЛРС оману високого були проведені комплексні дослідження, першим етапом яких було визначення ідентичності та доброякісності сировини методами макро- (рис. 7) та мікроскопії (рис. 8).



Рис. 7 Макроскопічні діагностичні ознаки цілої (А) та подрібненої сировини (В) оману високого

У результаті макроскопічного вивчення цілих та подрібнених кореневищ, а також мікроскопічного дослідження поперечних зрізів та здрібненої у порошок сировини у розчині хлоралгідрату Р підтверджено, що аналізовані серії (01-11) являють собою оману високого кореневища та корені, які за анатомо-морфологічними та мікроскопічними діагностичними ознаками відповідають вимогам монографій «Оман високий» сучасних фармакопей.

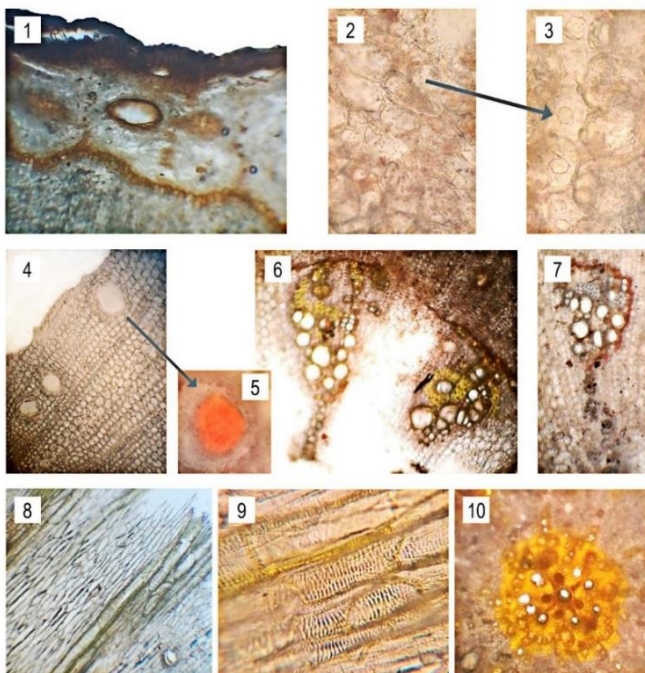


Рис. 8 Мікроскопічні діагностичні ознаки поперечного зрізу оману високого кореневищ та коренів: 1 – фрагмент з перидермою, схизогенними вмістилицями у коровій паренхімі, 2 – паренхіма кори на малому і великому (3) збільшенні з «грудочками» інуліну, 4 – паренхіма деревини зі схизогенними вмістилицями (5), 6 – фрагмент центрального циліндра з відкритими провідними пучками (7), 8 – паренхіма і судини (9) на поздовжньому зрізі, 10 – первинна ксилема

При мікроскопічному дослідженні підтверджено наявність інуліну (зокрема і реакцією Моліша) та відсутність іншого запасального полісахариду – крохмалю – реакцією з розчином йоду.

Для перерахунку кількісного вмісту інуліну у сировині визначали втрату в масі при висушуванні, яка склала від 7,78 до 9,31 %, що задовольняє вимоги існуючих монографій на сировину оману (не більше 13,0 %) за показником «Втрата в масі при висушуванні».

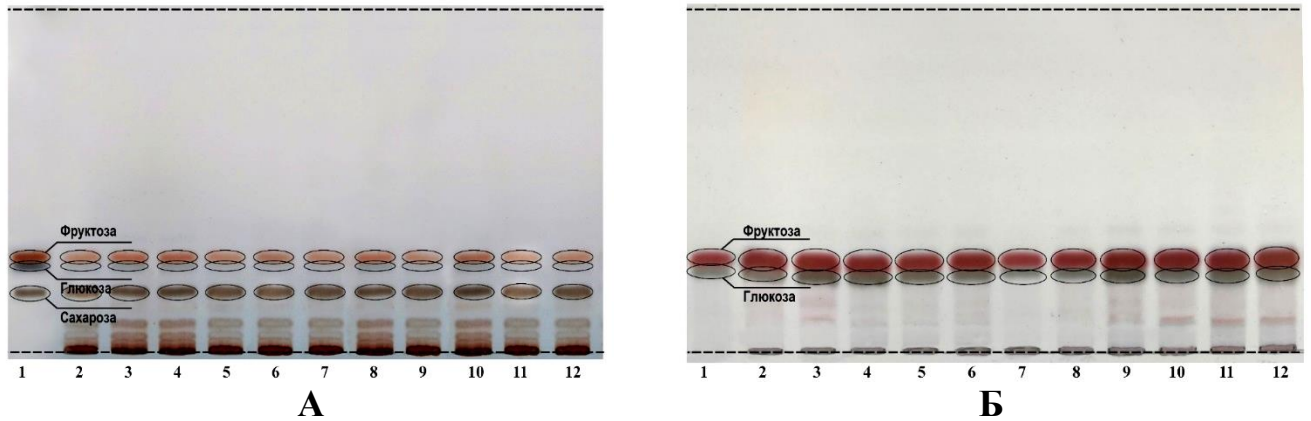


Рис. 9 Хроматограми випробовуваних серій 01-11 ЛРС оману високого без гідролізу (А) та після гідролізу (Б) (1-11); розчин стандартних речовин фруктози, глюкози, сахарози (12) на ТШХ-пластині Silica gel 60 (Merck) з алюмінієвою підкладкою

Верифіковано методику ідентифікації інуліну в ЛРС оману високого методом ТШХ за маркерами фруктозою, глюкозою, сахарозою. Підібрано оптимальні умови гідролізу сировини – протягом 90 хв з 40 г/л розчином кислоти сірчаної. Вивчено валідаційні характеристики методики (специфічність, робасність, прецизійність).

Підібрано оптимальні умови для використання методики методом ВЕТШХ: відстань, яку мала пройти рухома фаза, становить 7 см, об'єми проб для нанесення – 2 мкл.

Верифіковано методику кількісного визначення інуліну в ЛРС оману високого методом ВЕРХ із ВДС-детектором у перерахунку на висушену сировину, вивчено її валідаційні характеристики (рис. 11, 12).

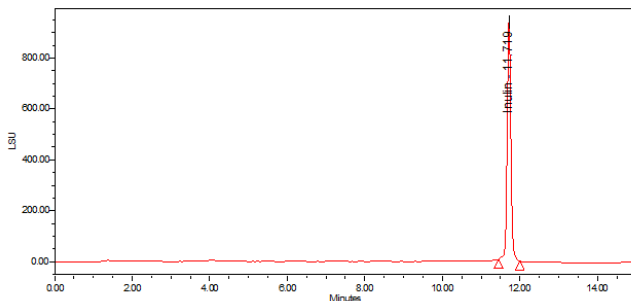


Рис. 11 Хроматограма розчину порівняння

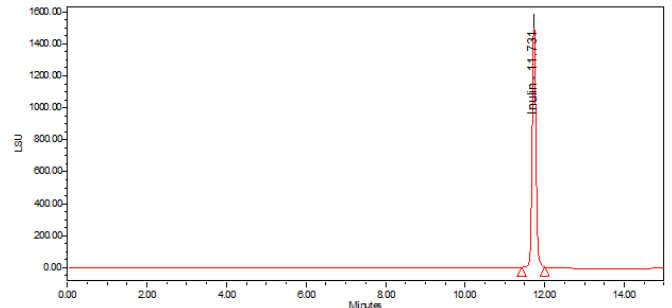


Рис. 12 Хроматограма випробовуваного розчину ЛРС оману високого (серія 01)

Методика є лінійною в досліджуваному діапазоні 80-120 %, що підтверджується рівнянням лінійності $Y_i = 0,9977 \cdot X_i - 0,36$, $r = 0,9999$ та розрахованими метрологічними характеристиками (табл. 5, рис. 13).

Таблиця 5

Дані перевірки лінійності методики кількісного визначення інуліну у ЛРС оману високого методом ВЕРХ з ВДС-детектором

Параметр	Вимоги	Отримане значення	Виконання критерію
$ a $	$\leq 10,2$	0,360	Виконується
S_0	$\leq 3,4$	1,343	Виконується
r	$> 0,9691$	0,9999	Виконується

Систематична ($\delta = 0,68 \leq 0,88$ %) похибка є незначущою, відносний довірчий інтервал $\Delta Z = t(95\%,4) \cdot s_z = 2,1318 \cdot s_z = 1,96 \leq 6,0$ %, що підтверджує коректність методики та її відповідність вимогам ДФУ (табл. 6).

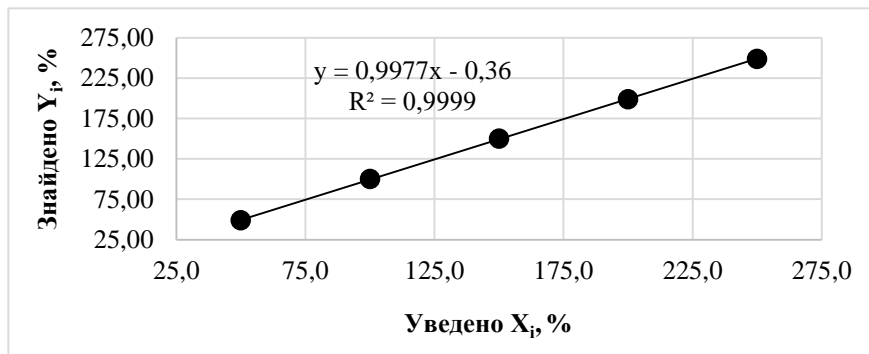


Рис. 13 Графік лінійної залежності $Y_i = b \cdot X_i + a$ для стандартного розчину інуліну

Таблиця 6

Результати перевірки параметрів правильності, збіжності результатів методики кількісного визначення інуліну в ЛРС оману високого методом ВЕРХ із ВДС-детектором

	Параметр	Значення	Критерій, %	Оцінка
Прецизійність	ΔZ	1,96	$\leq 6,0$	Виконується
Правильність	$ \bar{z} - 100 $	0,68	$\leq 0,88$	Виконується за обома критеріями
			$\leq 2,048$	

Досліджено, що вміст інуліну у сировині становить від 11,25 до 32,03 %.

Враховуючи кліматичну зону зрощування сировини оману високого, запропоновано нормування кількісного вмісту інуліну на рівні не менше 10,0 %.

Оптимізовано методику кількісного визначення інуліну та інших водорозчинних полісахаридів у ЛРС оману високого методом гравіметрії, у перерахунку на суху сировину, із застосуванням трикратної ультразвукової обробки сировини при співвідношенні сировина – екстрагент (1:4), що дозволяє збільшити вихід основної речовини. Вміст інуліну та інших водорозчинних полісахаридів в аналізованих серіях ЛРС оману високого (01-11), визначений методом гравіметрії, становить від 11,22 до 27,26 %.

Метрологічні характеристики методики кількісного визначення інуліну та інших водорозчинних полісахаридів, у перерахунку на суху сировину, методом гравіметрії

X_i	X_{cp}	S^2	S_{cp}	P	$t(P,v)$	Довірчий інтервал	$\epsilon, \%$
20,55	19,48	2,48	0,70	0,95	2,78	$19,48 \pm 1,96$	10,04
18,26							
18,98							
21,65							
17,96							

Розроблений проект монографії «Оману кореневища та корені^N» для його впровадження до ДФУ.

ВИСНОВКИ

Дисертаційна робота присвячена вирішенню наукових задач із розробки методик контролю якості інуліну рослинного походження та сировини *Inula helenium* L. Проведено комплексне експериментальне дослідження одинадцяти серій субстанцій інуліну рослинного походження, одержаних із *Cichorium intybus* L., *Agave americana* L., *Helianthus tuberosus* L., *Dahlia pinnata* L., та одинадцяти серій вітчизняної ЛРС оману високого, що були заготовлені на території України відповідно до вимог сучасної НД. У ході аналізу було визначено показники якості для наведених об'єктів, запропоновано критерії для їх нормування, розроблено сучасні методики контролю якості інуліну в субстанціях рослинного походження та ЛРС оману високого, вивчено їх валідаційні характеристики.

1. У результаті інформаційно-патентного пошуку наукових джерел літератури узагальнено дані щодо особливостей синтезу, хімічної структури та фізико-хімічних властивостей представника фруктанів – інуліну, а також надано ботанічну характеристику, хімічний склад та використання у медицині одного із поширеніших на території України джерел для добування поліфруктозану – оману високого кореневища та корені. Визначено, що інулін застосовується як еталонний препарат для визначення швидкості клубочкової фільтрації при захворюваннях нирок, для виготовлення ДД (як активний інгредієнт та допоміжна речовина).

2. Проведено аналітичний огляд сучасних ЛЗ та ДД, до складу яких входить субстанції інуліну рослинного походження та оману високого кореневища та корені. Значний обсяг ринку ДД з інуліном представлений засобами вітчизняного виробництва (73,81 %), які є комбінаціями інуліну з іншими активними компонентами (пробіотиками, ЛРС, солями кальцію, вітамінами) у вигляді твердих ЛФ (таблеток, капсул, саше) та разом використовуються в комплексній фармакотерапії цукрового діабету II типу, дисбактеріозу, атеросклерозу тощо. Враховуючи поширення ЛЗ та ДД з інуліном, актуальним завданням є розробка методик контролю якості інуліну у субстанціях рослинного походження та сировині

Inula helenium L. Обґрунтовано вибір як об'єктів дослідження субстанцій інуліну рослинного походження, що одержані з *Cichorium intybus* L., *Agave americana* L., *Helianthus tuberosus* L., *Dahlia pinnata* L. та ЛРС оману високого, що заготовлена на території України.

3. Проведено порівняльний аналіз підходів до контролю якості субстанції інуліну рослинного походження відповідно до вимог БФ, АФ та КХП, а також ЛРС оману високого за вимогами ГФ XI, БРФ, ДФ РК, ДФ РБ, ФФ, СГКМ, обґрунтовано необхідність розробки сучасних критеріїв стандартизації субстанції інуліну та вітчизняної ЛРС оману високого.

4. Проведено комплексне дослідження щодо оцінки якості АФІ інуліну за такими характеристиками, як опис, розчинність, гігроскопічність, мікроскопія. Ідентифіковано структурні компоненти поліфруктозану реакцією Селіванова та реактивом Фелінга. Досліджено чистоту субстанції відповідно до вимог провідних фармакопей за показниками прозорість та ступінь каламутності рідин, ступінь забарвлення рідин, рН / кислотність, питоме оптичне обертання, неорганічні катіони (кальцій, залізо), неорганічні та органічні аніони (сульфати, оксалати, хлориди), арсен, втрата в масі при висушуванні, сульфатна зола, відновлювані цукри. Запропоновано сучасні критерії їх нормування при розробці й упровадженні національної НД.

5. Розроблено нову методику ідентифікації та визначення чистоти інуліну методом ТШХ, досліджено її валідаційні характеристики, підібрано умови для її використання методом ВЕТШХ. Розроблено нову методику кількісного визначення субстанції інуліну методом ВЕЖХ із ВДС-детектором. Установлено, що кількісний вміст інуліну в аналізованих субстанціях рослинного походження, в перерахунку на висушену основу, становить від 85,26 до 98,29 %. Визначено, що за основними валідаційними характеристиками методика відповідає вимогам ДФУ.

6. Оптимізовано існуючу методику кількісного визначення інуліну методом СФ для рутинного аналізу методом ППП: вивчено умови пробопідготовки субстанції, експериментальним шляхом розраховано значення ППП, проведено ревалідацію методики.

7. За результатами макро- та мікроскопічного дослідження ЛРС оману високого встановлено, що аналізовані серії являють собою кореневища та корені оману високого, які за анатомо-морфологічними та мікроскопічними діагностичними ознаками відповідають вимогам монографій «Оман високий» провідних фармакопей світу. Підтверджено наявність інуліну та відсутність іншого запасального полісахариду крохмалю.

8. Експериментальним шляхом підібрано умови ідентифікації інуліну в ЛРС оману високого методом ТШХ та ВЕТШХ, вивчено валідаційні характеристики ТШХ методики, досягнуто скорочення тривалості аналізу та його собівартості. Верифіковано методику кількісного визначення інуліну в ЛРС оману високого методом ВЕРХ. Встановлено, що вміст інуліну в ЛРС оману складає від 11,25 до 32,03 %.

9. Підібрано умови екстрагування ЛРС оману високого при гравіметричному визначенні із застосуванням попередньої ультразвукової обробки, що дозволяє

значно збільшувати кінцевий вихід основної речовини. Вміст інуліну та інших водорозчинних полісахаридів в аналізованих серіях ЛРС оману високого (01-11), що визначений методом гравіметрії, становить від 11,22 до 27,26 %.

10. Розроблені проекти монографій «Інулін^N», «Інулін для виготовлення дієтичних добавок^N», «Оману кореневища та корені^N», які запропоновано для впровадження до ДФУ.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Евтифеева О. А., Смелова Н. Н., Датхаев У. М., Проскурина К. И. Оценка метрологических характеристик методики спектрофотометрического определения инулина. *Вестник КазНМУ*. 2014. № 5. С. 54-58. (Особистий внесок: аналіз літературних джерел, проведення експериментальних досліджень, обробка одержаних даних, підготовка статті до друку).

2. Євтіфєєва О. А., Динник К. В., Смелова Н. М. Аналітичний огляд методів контролю якості інуліну. *Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П.Л. Шутика*. Київ, 2015. Вип. 24 (5). С. 311-317. (Особистий внесок: аналіз наукових літературних джерел, обробка експериментального матеріалу, підготовка статті до друку).

3. Смелова Н. Н., Кизим Е. Г., Петухова И. Ю., Евтифеева О. А. Разработка методики йодхлорметрического определения глюкозы в БАД с инулином. *Мир науки и инноваций*. 2015. Т. 13, Вып. 2(2). С. 58-63. (Особистий внесок: аналіз наукових літературних джерел, виконання експериментальних досліджень, обробка одержаних даних, підготовка статті до друку).

4. Yevtifieieva O. A., Smelova N. N., Proskurina K. I., Petukhova I. Yu. Development and validation of UV-Spectrophotometric method for quantitative determination of inulin by specific absorbance. *Der Pharma Chemica*. 2016. Vol. 8(1). С. 213-222. (Особистий внесок: аналіз наукових літературних джерел, виконання експериментальних досліджень, обробка одержаних даних, підготовка статті до друку).

5. Smielova N. M., Yevtifieieva O. A., Gubar S. M. The assessment of the quality parameters of inulin active pharmaceutical ingredients according to physicochemical characteristics. *Управління, економіка та забезпечення якості в фармації*. 2018. № 2 (54). С. 6-13. (Особистий внесок: аналіз наукових літературних джерел, виконання експериментальних досліджень, обробка одержаних даних, підготовка статті до друку).

6. Смелова Н. М., Євтіфєєва О. А., Вепрецька Л. В., Губарь С. М. Контроль якості активних фармацевтичних інгредієнтів інуліну рослинного походження за питомим оптичним обертанням. *Управління, економіка та забезпечення якості в фармації*. 2018. № 4 (56). С. 17-21. (Особистий внесок: аналіз наукових літературних джерел, проведення експериментальних досліджень, обробка одержаних даних, підготовка статті до друку).

7. Спосіб якісного визначення інуліну в оману високого кореневищах та коренях методом тонкошарової хроматографії : пат. 134259 України № u 2018 11983 ;

заявл. 03.12.18 ; опубл. 10.05.19, Бюл. № 9. Смелова Н. М., Губарь С. М., Євтіфєєва О. А., Котов А. Г., Котова Е. Е. Власник НФаУ «Національний фармацевтичний університет». (*Особистий внесок: аналіз наукових літературних джерел, проведення експериментальних досліджень, обробка одержаних даних, оформленні матеріалів*).

8. Евтифеева О. А., Проскурина К. И., Смелова Н. Н. Оценка методики количественного определения инулина по продукту его кислотного гидролиза. *Управління якістю в фармації* : матеріали VIII наук.-практ. конф., м. Харків, 23 трав. 2014 р. Харків : НФаУ, 2014. С. 109.

9. Евтифеева О. А., Смелова Н. Н., Проскурина К.И. Актуальность разработки методик количественного определения инулина. *Перспективы развития научных исследований в 21 веке* : сб. материалов 6-й междунар. науч.-практ. конф., г. Махачкала, 31 окт. 2014 г. Махачкала: НИЦ «Апробация». С. 180-182.

10. Смелова Н. М., Проскурина К. И. Инулін – перспективне джерело нових лікарських засобів. *Медицина третього тисячоліття* : зб. тез міжвуз. конф. молодих вчених та студентів, м. Харків, 20 січ. 2015 р. Харків : Харківський держ. медичний ун-т, 2015. С. 430-431.

11. Проскурина К. И., Смелова Н. Н. Изучение условий кислотного гидролиза инулина. *Медицинская наука: достижения и перспективы* : сб. материалов науч.-практ. конф. молодых ученых и студентов ТГМУ им. Абуали ибни Сино с междунар. участ. г. Душанбе, 29 апр. 2016 г. Душанбе, 2016. С. 366.

12. Смелова Н. М., Кизим О. Г., Євтіфєєва О. А. Підбір оптимальної методики для кількісного аналізу зв'язаної глюкози у біологічно активних добавках до їжі з інуліном. *Аналітична хімія у фармації* : матеріали II міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 17 берез. 2016 р. Харків : НФаУ, 2016. С. 124-125.

13. Євтіфєєва О. А., Смелова Н. М. Актуальність розробки та впровадження монографії «Інулін» до Державної фармакопеї України. *Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин* : матеріали II міжнар. наук.-практ. internet-конф., м. Харків, 21-23 берез. 2016 р. Харків : НФаУ, 2016. С. 106-108.

14. Proskurina K. I., Smelova N. N., Dolzhko D. V., Yevtifieieva O. A. Determination of the specific absorption of the 5-hydroxymethylfurfural for quantitative determination of inulin by UV-spectrophotometric method. *Topical issues of new drugs development* : abstracts of XXIII international scientific and practical conference of young scientists and student, Kharkiv, April 21, 2016. Kharkiv, 2016. Vol. 1. P. 214.

15. Smielova N. M., Yevtifieieva O. A. Identification and determination of tests of herbal inulin substances by thin-layer chromatography in accordance with the British Pharmacopoeia. *Topical issues of new drugs development* : Abstracts of XXIV International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student, Kharkiv, April 20, 2017, in 2 vol., Vol. 1. Kharkiv : NUPh. P. 202-203.

16. Gubar S., Hurko I., Smielova N., Georgiyants V. Development of the criteria for standardization of the quality of *Inula helenium* L. *Chemistry Conference for Young Scientists*, Blankenberge, Feb. 21-23, 2018. Blankenberge, 2018. P. 103.

17. Смелова Н. М., Євтіфєєва О. А., Безчаснюк О. М. Актуальність розробки комбінованих лікарських препаратів з інуліном для комплексної фармакотерапії

захворювань різноманітної етіології. *Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів* : матер. II міжнар. наук.-практ. конф., м. Харків, 28-29 берез. 2018 р., у 2-х т. Харків : НФаУ. Т. 2. 268 с.

18. Hurko I. A., Smielova N. M., Kriukova A. I. Selection of the optimal conditions for the qualitative analysis of sesquiterpene lactones and inulin in the medicinal plant raw material of elecampane by thin-layer chromatography. *Topical issues of new drugs development* : Abstracts of XXV International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student, Kharkiv, April, 18-20, 2018. Kharkiv : NUPh. P. 91.

19. Смелова Н. М., Губарь С. М., Євтіфєєва О. А. Порівняння підходів спектрофотометричного визначення інуліну у кореневищах та коренях оману високого (*Inula helenium* L.). *Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження* : матеріали I міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 5 квіт. 2018 р. Харків : НФаУ. С. 120-121. URL: <http://nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2015/02/Матеріали-конференції.pdf>

20. Смелова Н. М., Губарь С. М., Гурко І. А., Євтіфєєва О. А. Порівняльний аналіз вимог до якості лікарської рослинної сировини оману високого за показниками розділу «Випробування». *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів* : матеріали VII наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Тернопіль, 27-28 вересня 2018 р. Тернопіль : ТДМУ. С. 42-44.

21. Smielova N. M., Yevtifieieva O. A., Gubar S. M. Standardization of requirements for the quality of the active pharmaceutical ingredient of a plant origin inulin. *The 9th International Conference on Pharmaceutical Sciences and Pharmacy Practice*, Kaunas, November 09, 2018. Kaunas, 2018. P. 93.

22. Смелова Н. Н., Губарь С. Н., Евтифеева О. А. Сравнительная характеристика подходов к оценке качества лекарственного растительного сырья девясила высокого. *«Роль и место инновационных технологий в современной медицине» ТГМУ им. Абуали ибни Сино* : материалы 66-ой годичной науч.-практ. конф. с междунар. участием, г. Душанбе, 23 нояб. 2018 г. Душанбе, 2018. Т. 2. С. 404-405.

23. Смелова Н. М., Губарь С. М., Євтіфєєва О. А. Ідентифікація та визначення чистоти активних фармацевтичних інгредієнтів інуліну рослинного походження методом тонкошарової хроматографії : інформ. лист № 205-2018 / Український центр наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи (Укрмедпатентінформ). Київ, 2018. Вип. 46. 6 с. (Рішення ПК «Фармація» № 104 від 24.10.2018 р.).

АНОТАЦІЯ

Смелова Н.М. Розробка методик контролю якості інуліну у субстанціях рослинного походження та сировині *Inula helenium* L. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 «Фармацевтична хімія та фармакогнозія». – Національний фармацевтичний університет, МОЗ України, Харків, 2019.

Дисертаційна робота присвячена комплексному вивченню субстанцій інуліну рослинного походження, що одержані з *Cichorium intybus* L., *Agave americana* L., *Helianthus tuberosus* L., *Dahlia pinnata* L., та аналізу національної ЛРС *Inula helenium* L. відповідно до вимог існуючої НД; розробці сучасних методик контролю якості субстанцій інуліну та інуліну в ЛРС оману високого, вивченню їх валідаційних характеристик; розробці критеріїв якості та проектів монографій ДФУ на «Інулін^N», «Інулін для виготовлення дієтичних добавок^N», «Оману кореневища та корені^N».

Проведено аналітичний огляд сучасних ЛЗ та ДД, до складу яких входять субстанції інуліну рослинного походження та оману високого кореневища та корені. Здійснено комплексне дослідження оцінки якості АФІ інуліну за фізико-хімічними характеристиками, виявлено структурні компоненти поліфруктозану хімічними реакціями ідентифікації, досліджено чистоту субстанції відповідно до вимог провідних фармакопей, запропоновано сучасні критерії їх нормування при розробці національної НД.

Уперше розроблені нові методики ідентифікації інуліну у субстанціях та ЛРС оману високого методом ТШХ, ВЕТШХ та методики його кількісного визначення методом ВЕЖХ із ВДС-детектором, вивчені валідаційні характеристики. Оптимізовано існуючу методику кількісного визначення інуліну методом СФ для рутинного аналізу, проведено ревалідацію методики.

Уперше підібрано умови екстрагування інуліну з ЛРС оману високого при гравіметричному визначенні із застосуванням попередньої ультразвукової обробки.

Уперше розроблені проекти монографій «Інулін^N», «Інулін для виготовлення дієтичних добавок^N», «Оману кореневища та корені^N», які запропоновано для впровадження до ДФУ.

Ключові слова: інулін, оман високий, контроль якості, лікарська рослинна сировина, дієтичні добавки, стандартизація.

АННОТАЦІЯ

Смелова Н.Н. Разработка методик контроля качества инулина в субстанциях растительного происхождения и сырье *Inula helenium* L. – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 15.00.02 «Фармацевтическая химия и фармакогнозия». – Национальный фармацевтический университет, МОЗ Украины, Харьков, 2019.

Диссертация посвящена комплексному изучению субстанций инулина растительного происхождения, полученных из *Cichorium intybus* L., *Agave Americana* L., *Helianthus tuberosus* L., *Dahlia pinnata* L., и анализа отечественного лекарственного растительного сырья *Inula helenium* L. соответствии с требованиями существующей нормативной документации; разработке современных методик контроля качества субстанций инулина и инулина в лекарственном растительном сырье девясила высокого, изучению их валидационных характеристик; разработке критериев качества и проектов монографий Государственной фармакопеи Украины

(ГФУ) «Инулин^N», «Инулин для изготовления диетических добавок^N», «Девясила корневища и корни^N».

Проведен аналитический обзор современных лекарственных средств и диетических добавок, в состав которых входят субстанции инулина растительного происхождения и девясила высокого корневища и корни. Осуществлен сравнительный анализ подходов к контролю качества субстанций инулина в соответствии с требованиями Британской и Американской фармакопей, Кодекса пищевых продуктов, а также ЛРС девясила высокого по требованиям Государственной фармакопеи СССР XI, Британской растительной фармакопеи, Государственной фармакопеи Республики Беларусь, Государственной фармакопеи Республики Казахстан, Французской фармакопеи, Стандартов Гонконгской Китайской медицины; обоснована необходимость разработки современных критериев стандартизации субстанции инулина и отечественного лекарственного растительного сырья девясила высокого. Проведено комплексное исследование по оценке качества активного фармацевтического ингредиента инулина по таким характеристикам, как описание, растворимость, гигроскопичность, микроскопия. Выявлены структурные компоненты химическими реакциями идентификации. Исследована чистота субстанций в соответствии с требованиями ведущих фармакопей по таким показателям: прозрачность и степень мутности жидкостей, степень окраски жидкостей, рН / кислотность, удельное оптическое вращение, неорганические катионы (кальций, железо), неорганические анионы (сульфаты, оксалаты, хлориды), мышьяк, потеря в массе при высушивании, сульфатная зола, восстанавливающие сахара. Предложены современные критерии их нормирования при разработке и внедрении национальной нормативной документации.

Впервые разработана новая методика идентификации и определения чистоты инулина методом ТСХ, исследованы ее валидационные характеристики, подобраны условия использования методики методом ВЭТСХ. Впервые разработана новая методика количественного определения субстанции инулина методом ВЭЖХ с испарительным детектором светорассеяния, изучены ее валидационные характеристики.

Оптимизирована существующая методика количественного определения инулина методом адсорбционной спектрофотометрии в ультрафиолетовой и видимой областях, для рутинного анализа методом удельного показателя поглощения, проведена ревалидация методики.

Определены макро- и микроскопические диагностические признаки отечественного сырья девясила высокого, подтверждено наличие инулина и отсутствие другого запасящего полисахарида крахмала.

Экспериментальным путем подобраны условия для идентификации инулина в отечественном лекарственном растительном сырье девясила высокого методом ТСХ и ВЭТСХ, изучены валидационные характеристики методики ТСХ. Верифицирована методика количественного определения инулина в лекарственном растительном сырье девясила высокого методом ВЭЖХ с испарительным детектором светорассеяния, изучены ее валидационные характеристики

Впервые подобраны условия экстрагирования инулина из сырья девясила высокого при гравиметрическом определении с применением предварительной ультразвуковой обработки.

Впервые разработаны проекты монографий «Инулин^N», «Инулин для изготовления диетических добавок^N», «Девясил корневища и корни^N», которые предложены для внедрения в ГФУ.

Ключевые слова: инулин, девясил высокий, контроль качества, лекарственное растительное сырье, диетические добавки, стандартизация.

SUMMARY

N. M. Smielova. Development of methods for inulin quality control in the plant origin substances and the medicinal raw material *Inula helenium* L. – A manuscript copyright qualifying scientific work.

A thesis for the Candidate of Pharmaceutical Sciences degree by the speciality 15.00.02 “Pharmaceutical chemistry and pharmacognosy”. – National pharmaceutical university, Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2019.

The thesis is devoted to a comprehensive study of plant origin inulin substances, which have been derived from *Cichori umintybus* L., *Agave americana* L., *Helianthus tuberosus* L., *Dahlia pinnata* L., and the analysis of the national medicinal raw materials (MRM) *Inula helenium* L. according to the requirements of the existing regulatory documentation (RD); development of modern methods of quality control of inulin substances and inulin in MRM of Elecampane, study of their validation characteristics; development of quality criteria and the State Pharmacopoeia of Ukraine (SPhU) manuscript projects for “Inulin^N”, “Inulin for the dietary supplements production^N”, “Rhizomes and roots of Elecampane^N”.

An analytical review of the modern medical product and dietary supplement of plant origin consisting of inulin substances and rhizomes and roots of Elecampane has been carried out. A multi-method research of active pharmaceutical ingredient of inulin quality assessment in accordance with the physico-chemical characteristics has been performed, fructan structural components have been deduced by chemical reactions of identification, substance purity according to the leading pharmacopoeias requirements has been studied, modern criteria for their standardization in the development of national RD have been suggested.

New techniques of inulin identification in the substances and MRM of Elecampane have been developed for the first time by a TLC method, HPTLC and the technique of its quantification by a HPLC method with evaporative light scattering detector, validation characteristics have been studied. The current technique of inulin quantification by absorption spectrophotometry (ultraviolet and visible) method for a routine analysis has been optimized, revalidation of the technique has been performed.

The conditions for inulin extraction from MRM of Elecampane in gravimetric determination, using pre-ultrasonic treatment, have been identified for the first time.

Manuscript projects for “Inulin^N”, “Inulin for the dietary supplements production^N”, “Rhizomes and roots of Elecampane^N”, have been newly developed and suggested for SPhU introduction.

Key words: inulin, Elecampane, quality control, medicinal raw material, dietary supplements, standardization.

Перелік умовних позначень

5-ГМФ	– 5-гідроксиметилфурфурол;
СФ	– абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій та видимій областях;
АФІ	– активний фармацевтичний інгредієнт;
АФ	– Американська фармакопея (USP 38 – NF 33);
БРФ	– Британська рослинна фармакопея;
БФ	– Британська фармакопея (British Pharmacopoeia 2010);
ВЕРХ	– високоефективна рідинна хроматографія;
ВЕТШХ	– високоефективна тонкошарова хроматографія;
ВЭЖХ	– высокоэффективная жидкостная хроматография;
ВЭТСХ	– высокоэффективная тонкослойная хроматография;
ГЛЗ	– готовий лікарський засіб;
ДНДЛ з КЯЛЗ	– Державна науково-дослідна лабораторія з контролю якості лікарських засобів Національного фармацевтичного університету;
НФаУ	– Державна фармакопея Республіки Білорусь;
ДФ РБ	– Державна фармакопея Республіки Казахстан;
ДФ РК	– Державна фармакопея СРСР XI;
ГФ XI	– Державна фармакопея України;
ДФУ	– дієтична добавка;
ДД	– ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів»;
ДП УНФЦЯЛЗ	– Кодекс харчових продуктів (Food Chemicals Codex 10);
КХП	– лікарська рослинна сировина;
ЛРС	– лікарський засіб;
ЛЗ	– нормативна документація;
НД	– питомий показник поглинання;
ППП	– Стандарти Гонконгської Китайської медицини;
СГКМ	– тонкослойная хроматография;
ТСХ	– тонкошарова хроматографія;
ТШХ	– Французька фармакопея.
ФФ	

Підписано до друку 09.10.2019. Формат 60×84/16.
Папір офсетний. Гарнітура Times New Roman. Друк цифровий.
Ум. друк.арк.0,9. Наклад 100 пр. Зам. № б/н.
Надруковано ФОП Пісня О.В., м. Харків, вул. Гіршмана 16-а
Свідоцтво про державну реєстрацію В02 № 248750 від 13.09.2007 р.