



## KAPITEL 7 / CHAPTER 7<sup>1</sup> METHOD OF OBTAINING AND STANDARTIZING EXTRACTS OF CREEPING THYME

DOI: 10.30890/2709-2313.2022-13-02-017

### Вступ.

Згідно даних інституту фізіотрії і пульмонології НАМН України, на долю захворювань органів дихання припадає третина всіх зареєстрованих в Україні захворювань, в структурі смертності вони займають четверте місце після патологій системи кровообігу, злоякісних новоутворень і нещасних випадків [1].

У фармакотерапії цих захворювань важливе місце займають лікарські засоби (ЛЗ) рослинного походження, яким характерна різнобічна фармакологічна дія, що зумовлена комплексом біологічно активних речовин (БАР) відповідних рослин. Крім цього, рослинні препарати при правильному дозуванні практично нетоксичні, нешкідливі, відносно доступні, ефективні й унікальні [2-3]. Для лікування захворювань, що супроводжуються кашлем перевагу віддають таким рослинам як: чебрець повзучий, плющ звичайний, подорожник великий, фіалка триколірна, алтея лікарська, солодка гола, первоцвіт весняний, оман високий та іншим [2-5]. Віддавна відомою ЛРС і такою, що залишається актуальною для виробництва ЛЗ, є трава чебрецю повзучого (*Thymus serpyllum*), родини Губоцвіті (*Lamiaceae*).

Чебрець повзучий (*Thymus serpyllum*) є фармакопейною рослиною, а відповідна їй сировина – трава чебрецю (*Herba Thymi*) – офіційною. Вона росте по всій Україні, найбільш поширений на Поліссі у сухих хвойних і мішаних лісах, на узліссях, галявинах, серед чагарників, на схилах. З лікувальною метою застосовують траву чебрецю, яку заготовляють в період цвітіння рослини.

Із даних літератури [2-5] відомо, що трава чебрецю повзучого містить ефірну олію (0,2-1,5 %), в деяких джерелах знаходимо її вміст до 3 %, в якій знайдені феноли – тимол (40 %), карвакрол (до 25 %), в незначній кількості – борнеол, терпінеол, каріофіллен та цингіберен. У сировині також містяться флавоноїди, дубильні та гіркі речовини, камедь, терпенові кислоти (урсолова і олеанова), мінеральні солі.

<sup>1</sup>Authors: Zarivna N. O.



З усіх груп БАР трави чебрецю найбільш вивченими є компоненти ефірної олії, виділення і дослідження яких здійснюється різними методами. Для аналізу сумішей терпенових сполук найширше застосування знайшли хроматографічні методи, які дозволяють розділити компоненти сумішей та здійснити їхнє кількісне визначення.

Препарати на основі чебрецю повзучого призначають при бронхітах, запаленні легень, кашлюку як відхаркувальний засіб. Серед рослин з муколітичною активністю особлива увага припадає, також, на чебрець повзучий [5-7]. Тому пошук, дослідження БАР рослинної сировини та створення на їх основі вітчизняних лікарських препаратів з муколітичною активністю є актуальним завданням фармації на сьогодні.

Згідно даних Державного реєстру лікарських засобів України в групу муколітиків (R05CB) включені 73 лікарські засоби, які випускаються в різних лікарських формах тридцятьма виробниками, із яких вісімнадцять – зарубіжні. Фармацевтичні компанії-виробники пропонують на ринку різні лікарські форми цих препаратів для безрецептурного відпуску, які аналізуючи ринок, були поділені на три групи. Першу групу (26 препаратів) складають рідкі лікарські засоби у формі сиропу, крапель, розчинів для внутрішнього застосування; другу групу складають тверді лікарські засоби (35) у формі таблеток, драже, капсул; третю групу (12 препаратів) – у формі для приготування розчинів (шипучі таблетки, гранули, порошки). Вище перераховані ЛЗ – синтетичного походження [6, 8].

Як відомо, препарати природнього походження, не поступаючись за ефективністю синтетичним лікарським засобам, найбільш повно відповідають головній вимозі медицини – “не зашкодь” – завдяки практично повній відсутності побічних ефектів та низькій токсичності. Саме їм надається перевага за рахунок:

- м'якої фармакологічної та політропної дії на організм;
- можливості тривалого застосування без істотних побічних проявів;
- спорідненості хімічних сполук до людського організму [2, 3].

У відповідності з міжнародною класифікацією АТС, лікарські препарати на основі чебрецю належать до групи препаратів, які стимулюють відхаркування (R-рівень кваліфікації). Інтерес представляють препарати, що за АТС класифікацією містяться в групі R05CA10 [8].

Високий попит і рівень конкуренції мають такі препарати як стоптусин



фіто, бронхіпрет, гербіон сироп первоцвіту. Потреба в таких препаратах як пертусин, трава чебрецю практично повністю забезпечується за рахунок продукції вітчизняних фармацевтичних фабрик. Більш великі виробники є монополістами вітчизняного сектору фармацевтичного ринку. Іноземні країни представлені 3 виробниками, зокрема фармацевтичними фірмами Словенії, Німеччини, Чеської республіки. Провівши аналіз фармацевтичного ринку препаратів на основі лікарської рослинної сировини – трави чебрецю повзучого встановлено, що лікарські засоби (ЛЗ) на її основі, містять в своєму складі водні та водно-спиртові екстракти чебрецю (Стоптусин фіто, Гербіон сироп первоцвіту, Пертусин, Пекторал тощо) [6, 8]. Кожен з виробників, вибираючи той чи інший екстрагент, мав на меті вилучення певних біологічно активних речовин (БАР), що найбільш ефективно проявляли ефективність щодо захворювань верхніх дихальних шляхів.

Аналіз ринку препаратів-муколітиків на основі трави чебрецю повзучого показав, що частка українських виробників щодо іноземних становить 25 % проти 75 %. Також, слід зазначити, що серед зареєстрованих ЛЗ на основі чебрецю прості препарати (наприклад лікарська рослинна сировина) становлять меншу частку, ніж комбіновані. Також, спостерігається домінування рідких лікарських форм. Серед комбінованих препаратів пропозиції в цілому рідких (сиropи, настойки, краплі, рідкі екстракти) і твердих (таблетки, збори, пастилки) представлені по 66,66 і 33,33 % у відсотках. Перші займають значну частку завдяки хорошій біодоступності, а перевага твердих лікарських форм зумовлена зручністю застосування, вищою точністю дозування порівняно з рідкими лікарськими формами. Однак, значною мірою це домінування пояснюється традиційною технологією переробки трави чебрецю, а саме отриманням рідкого екстракту та лабільністю біологічно активних речовин чебрецю, в результаті чого потрібно забезпечити захист одержаного екстракту чебрецю від світла, вологи, коливання температури. Всі ці фактори можна усунути за рахунок твердої лікарської форми у вигляді капсул. Більше того, з результатів проведеного маркетингового дослідження випливає необхідність розширення номенклатури ЛЗ за рахунок досягнень сучасної технології з метою більш глибокого насичення ринку препаратів досліджуваної групи у твердих лікарських формах.

Згідно Європейської Фармакопеї (ЄФ) стандартизація сировини проводиться за вмістом ефірної олії (не менше 3,0 мл/кг у перерахунку на суху



сировину). Німецька Фармакопея пропонує якість трави чебрецю здійснювати за вмістом ефірної олії (не менше 3 мл/кг) і вмісту фенолу у перерахунку на тимол (не менше 0,1 %). Державною фармакопеею України якість трави чебрецю регламентується вмістом ефірної олії, ідентифікацією у ній тимолу і карвакролу. Згідно національного доповнення, ідентифікують тільки тимол, зважаючи на тимольний хемотип вітчизняної сировини.

Актуальною проблемою фармацевтичного аналізу є стандартизація лікарських засобів рослинного походження. Показниками для стандартизації рослинних ЛЗ використовують загальні вимоги для лікарських форм останніх редакцій провідних фармакопей з деякими підходами, специфічними для рослинних препаратів. Метою створення критеріїв для стандартизації є забезпечення оптимального рівня постійного складу і фармако-технологічних характеристик рослинного ЛЗ, який за умов виробництва у відповідності до вимог Належної виробничої практики (GMP), міг би гарантувати відтворюваний і передбачуваний терапевтичний ефект. Критерії меж вмісту БАР у рослинних ЛЗ розраховують з урахуванням вмісту БАР або маркерів у вихідній лікарській рослинній сировині чи в рослинних препаратах, їх внеску у склад готового ЛЗ і особливостей технології виробництва. У процесі стандартизації рослинних препаратів важливою умовою є вибір групи чи окремих БАР, які б відповідали за фармакологічну активність ГЛЗ. Маркери якості рослинної сировини, напівпродуктів, а згодом готових лікарських засобів, повинні відображати як фармакологічну дію, так і склад достатньо лабільних БАР, вміст яких може змінюватися у процесі зберігання впродовж всього терміну придатності.

Як було показано при аналізі фармацевтичного ринку препаратів муколітиків [8], в Україні виробляється різними виробниками пертусин і комбіновані ЛЗ на основі трави чебрецю, або його екстракту. Кожен виробник контролює якість своєї продукції методами, приведеними у власних методиках контролю якості (МКЯ). На сьогодні більшість з них залишають кількісним показником якості вміст тимолу, який визначають методом газової хроматографії.

Розробка нових ЛЗ на основі рослинних екстрактів вимагає їх стандартизації в ланцюзі сировина – екстракти – ГЛЗ. Враховуючи те, що, трава чебрецю повзучого містить гідрофільні (флавоноїди-глюкозиди, фенолкарбонові кислоти, полісахариди, амінокислоти) та гідрофобні (у складі



ефірної олії) БАР, які мають фармакологічну активність [5], проте використовувана вітчизняними виробниками технологія отримання екстракту та настойки не дозволяє їх одночасне вилучення з трави. В результаті значна частина БАР потрапляє у відходи, що є доказом нераціонального використання ЛРС чебрецю, а отримувані ЛЗ, порівняно з сировиною, не можуть, внаслідок цього, містити повного комплексу БАР трави. Тому, необхідним виявилось підібрати оптимальний спосіб одержання рідкого екстракту, густого екстракту та змінити підхід до їх стандартизації. Для цього, спочатку вивчалися різні умови екстракції з досліджуваної ЛРС. З метою встановлення оптимальних умов отримання рідкого екстракту та максимального вилучення екстрактивних речовин з трави чебрецю повзучого було проведено експеримент щодо вибору оптимальних концентрації екстрагенту. Для забезпечення повноти витягу діючих речовин і максимальної швидкості екстрагування до екстрагента висувують такі вимоги:

- повинен максимально розчиняти ЛР і мінімально баластні речовини;
- повинен проникати у пори матеріалу і крізь стінки клітин, забезпечувати високу змочувальну здатність;
- повинен перешкоджати мікробіологічному забрудненню;
- повинен мати низьку температуру кипіння, легко регенеруватися;
- повинен бути мінімально токсичним і вогнебезпечним;
- повинен бути доступним за вартістю.

### **7.1. Розробка технології одержання рідкого екстракту чебрецю повзучого**

Попередніми дослідженнями нами проведено екстракцію біологічно активних речовин з трави чебрецю повзучого водою та розчинами спирту різної концентрації (10 % – 96 %). Дані екстрагенти широко використовуються при отриманні екстрактів на хіміко-фармацевтичних підприємствах. З огляду на закордонний досвід отримання екстрактів чебрецю із застосуванням різної концентрації спиртових розчинів є доречним апробування їх як індивідуально, так і в поєднанні, тобто ступінчасто. Екстракцію проводили в класичному співвідношенні сировина – екстрагент (1:10) методом реперколяції. Відомо, що метод мацерації є тривалим і не завжди дозволяє вилучити максимальну кількість БАР з ЛРС та, як правило, є методом отримання настоек. Тому,



враховуючи склад трави чебрецю повзучого, а саме наявність у ньому флавоноїдів, ефірної олії, полісахаридів, амінокислот для подальших досліджень було обрано метод реперколяції, який є доступним, експресним та економічно вигідним методом в промислових умовах [9].

Для експерименту використовували траву чебрецю повзучого Житомирської ФФ «Ліктрави».

Витяги для досліджень отримували наступним експериментальним шляхом: 10 г сировини чебрецю поміщали в перколятор додавали 100 мл відповідного екстрагенту, настоювали 3 години до повного набрякання сировини, після чого доливали екстрагентом до «дзеркала» та залишали на 24 години. Зливали витяжку з першого перколятора і заливали нею свіжу сировину в другому перколяторі, а в перший поміщали свіжий екстрагент і проводили аналогічні операції як в перший день. На третій день все по аналогії з попередніми днями.

Технологічний процес проводили у батареї, що складалася з 3 перколяторів, що працюють у взаємозв'язку. У батареї зливання готового продукту проводять із перколятора, в якому завжди свіжа сировина, а свіжий екстрагент подають у перколятор, де найбільш виснажена сировина. На шостий день отримували витяг об'ємом 300 мл. Після чого отриманий витяг відстоювали 2 доби при температурі 10 °С, фільтрували через бязевий фільтр. За маркери якості отримуваних екстрактів, виходячи з проведених досліджень складу сировини, обрали флавоноїди, відновлюючі моносахариди та амінокислоти.

Кількісне визначення флавоноїдів, відновлюючих моносахаридів, амінокислот проводили спектрофотометричним методом, у перерахунку на апігенін, глюкозу та гліцин відповідно, як у випадку дослідження сировини (табл. 1).

Одержані експериментальні дані свідчать, що за здатністю екстрагувати комплекс флавоноїдів трави чебрецю повзучого значну перевагу має спирт етиловий 60 %; 30 % етанол вилучає максимальну кількість амінокислот; вода – полісахариди.

Таким чином, нами були відібрані лідери – 60 %, 30 %, 10 % розчини спирту і вода для подальших досліджень.



**Таблиця 1 – Порівняльна характеристика виходу екстрактивних речовин, флавоноїдів, полісахаридів, амінокислот у витягах чебрецю повзучого, одержаних при екстрагуванні водно-спиртовими розчинами різної концентрації (P = 0,95; n = 5)**

Вміст спирту в розчині для отримання екстракту, %	Екстрактивні речовини в перерахунку на суху речовину, %	Вміст флавоноїдів у перерахунку на апігенін $\times 10^{-2}$ , %	Вміст відновлюючих моносахаридів у перерахунку на глюкозу $\times 10^{-2}$ , %	Вміст амінокислот у перерахунку на гліцин $\times 10^{-2}$ , %
Вода	1,17 $\pm$ 0,02	2,37 $\pm$ 0,05	6,60 $\pm$ 0,03	6,02 $\pm$ 0,04
10	1,46 $\pm$ 0,01	2,45 $\pm$ 0,04	5,40 $\pm$ 0,02	6,12 $\pm$ 0,03
20	1,54 $\pm$ 0,01	3,05 $\pm$ 0,03	5,31 $\pm$ 0,03	6,18 $\pm$ 0,02
30	1,55 $\pm$ 0,01	4,30 $\pm$ 0,03	5,22 $\pm$ 0,01	7,24 $\pm$ 0,02
40	1,56 $\pm$ 0,02	6,00 $\pm$ 0,02	5,03 $\pm$ 0,02	6,21 $\pm$ 0,02
50	1,63 $\pm$ 0,01	6,70 $\pm$ 0,03	4,70 $\pm$ 0,02	5,45 $\pm$ 0,01
60	1,68 $\pm$ 0,01	7,50 $\pm$ 0,03	4,51 $\pm$ 0,02	4,81 $\pm$ 0,02
70	1,72 $\pm$ 0,01	7,40 $\pm$ 0,03	2,10 $\pm$ 0,03	4,73 $\pm$ 0,03
80	1,44 $\pm$ 0,02	5,50 $\pm$ 0,02	-	3,84 $\pm$ 0,02
90	0,95 $\pm$ 0,02	2,40 $\pm$ 0,03	-	1,86 $\pm$ 0,02
96	0,51 $\pm$ 0,02	1,06 $\pm$ 0,03	-	1,32 $\pm$ 0,03

В результаті було обрано три технології рідкого екстракту чебрецю, суть яких заключалась у різній черговості застосування екстрагенту з тою чи іншою концентрацією спирту. Використовували метод реперколяції, екстрагування проводили впродовж 4 діб. На восьмий день отримували екстракт об'ємом 300 мл. Отримані екстракти відстоювали впродовж 2 діб, фільтрували і визначали вміст БАР відповідно. Результати експерименту наведені в таблиці 2.

Як видно з результатів дослідження, оптимальною виявилася технологія № 2, коли почергово сировина екстрагується 60 % спиртом, потім 30 % і пізніше гарячою водою. Запропонована технологія, дозволяє отримувати екстракти з високим виходом БАР.

Важливою умовою ефективності будь-якої екстракції рослинного матеріалу є її тривалість. Тому, актуальним стало вивчення динаміки вилучення діючих речовин з трави чебрецю повзучого при розробці технології рідкого екстракту з метою визначення оптимального часу. У серії наступних досліджень отримували екстракт згідно технології № 2 методом реперколяції, проводячи екстрагування впродовж 3, 4, 5, 6 днів і використовуючи відповідне число перколяторів. Результати дослідження показані в таблиці 3.



**Таблиця 2 – Залежність виходу екстрактивних речовин, флавоноїдів, відновлюючих моносахаридів, амінокислот в рідкому екстракті чебрецю повзучого від черговості застосування екстрагентів (P = 0,95; n = 5)**

Вміст біологічно-активних речовин, %	Технологія № 1 60% : 30 % : 10 %	Технологія № 2 60 % : 30 % : гаряча вода	Технологія № 3 10 % : 30% : 60%
Флавоноїди у перерахунку на апігенін $\times 10^{-2}$	3,31 $\pm$ 0,03	3,21 $\pm$ 0,02	1,32 $\pm$ 0,04
Відновлюючі моносахариди у перерахунку на глюкозу $\times 10^{-2}$	2,64 $\pm$ 0,04	9,91 $\pm$ 0.03	5,13 $\pm$ 0.03
Амінокислоти у перерахунку на гліцин $\times 10^{-2}$	4,41 $\pm$ 0,04	4,61 $\pm$ 0.03	5,41 $\pm$ 0.02
Екстрактивні речовини в перерахунку на суху речовину $\times 10^{-2}$	1,56 $\pm$ 0,01	1, 78 $\pm$ 0.01	1,52 $\pm$ 0,01

**Таблиця 3 – Залежність виходу екстрактивних речовин, флавоноїдів, відновлюючих моносахаридів, амінокислот в рідкому екстракті чебрецю повзучого від часу екстракції (P = 0,95; n = 5)**

Кількість перколяторів	Вміст флавоноїдів у перерахунку на апігенін $\times 10^{-2}$ , %	Вміст відновлюючих моносахаридів у перерахунку на глюкозу $\times 10^{-2}$ , %	Вміст амінокислот у перерахунку на гліцин $\times 10^{-2}$ , %	Екстрактивні речовини в перерахунку на суху речовину, %
3	3,21 $\pm$ 0,03	9,91 $\pm$ 0,02	4,61 $\pm$ 0,02	1,78 $\pm$ 0,01
4	3,33 $\pm$ 0,02	10,71 $\pm$ 0,03	4,42 $\pm$ 0,02	1,94 $\pm$ 0,01
5	4,15 $\pm$ 0,02	11,13 $\pm$ 0.02	4,51 $\pm$ 0,03	2,15 $\pm$ 0,01
6	4,18 $\pm$ 0,03	12,91 $\pm$ 0,02	5,83 $\pm$ 0,03	2,31 $\pm$ 0,01

Як видно з результатів, наведених у таблиці 3 найбільший вміст БАР спостерігається в екстракті, де екстрагування проводили 6 діб, а цільовий витяг отримували з 6 перколяторів. Це свідчить про довготривалість технологічного процесу, що створить труднощі на хіміко-фармацевтичних підприємствах, яким вигідно отримувати екстракти в коротші терміни з максимальним виходом БАР





та мінімальними затратами екстрагенту. Крім цього, надмірна тривалість процесу екстрагування призводить до забруднення витяжок супутніми високомолекулярними сполуками, швидкість дифузії яких значно менша, ніж у біологічно активних речовин. Загальна тривалість екстракції найчастіше змінюється з економічних міркувань. Інколи, доцільно припинити процес у певний момент, бо додатково витягнуті кількості речовин не окуплять надлишкових витрат цінних екстрагентів (спирту). Таким чином, ми обрали технологію екстракту, де використали 4 перколятори, де вміст БАР незначно відрізняється від попереднього.

Сучасні реактори дозволяють підвищити ефективність екстракції БАР за рахунок перемішування. Тому наступним було дослідження впливу перемішування на вихід БАР. Для цього, використовували технологію № 2 методом реперколяції, впродовж 4 діб, застосовували в першому випадку перемішування, а в іншому - без нього. На 8 день технологічного процесу отримували необхідний витяг. Отримані витяги відстоювали, фільтрували і визначали вміст БАР. Дані експерименту представлені в таблиці 4.

**Таблиця 4 – Залежність виходу екстрактивних речовин, флавоноїдів, відновлюючих моносахаридів, амінокислот в рідкому екстракті чебрецю повзучого від режиму екстракції ( $P = 0,95$ ;  $n = 5$ )**

Режим екстракції	Вміст флавоноїдів у перерахунку на апігенін, $\times 10^{-2}$ , %	Вміст відновлюючих моносахаридів у перерахунку на глюкозу, $\times 10^{-2}$ , %	Вміст амінокислот у перерахунку на гліцин, $\times 10^{-2}$ , %	Екстрактивні речовини в перерахунку на суху речовину, %
З перемішуванням	4,72 $\pm$ 0,03	12,36 $\pm$ 0,02	5,11 $\pm$ 0,02	4,72 $\pm$ 0,01
Без перемішування	3,31 $\pm$ 0,02	10,71 $\pm$ 0,03	4,42 $\pm$ 0,02	1,94 $\pm$ 0,01

Як показують дані дослідження, представлені в таблиці 4, екстракти виготовлені з перемішуванням сировини відзначаються вищим вмістом БАР. Це закономірно, оскільки при даному режимі екстракції зменшується шар нерухомої рідини, з'являються конвекційні потоки, які сприяють перенесенню речовини. З появою турбулентного перемішування як усередині, так і назовні клітин молекулярно-кінетичний рух змінюється на конвективний, це дозволяє



підтримувати різницю концентрацій у зоні зіткнення фаз на високому рівні.

Таким чином, вивчення технологічних властивостей сировини та впливу ряду чинників на процес екстрагування дозволив визначити оптимальні умови для виробництва рідкого екстракту чебрецю повзучого. Запропонований спосіб отримання екстракту чебрецю повзучого характеризується високим виходом БАР і є рентабельним, а, отже, може знайти інноваційну реалізацію, зокрема при створенні вітчизняного лікарського засобу з муколітичною активністю.

## 7.2. Дослідження умов отримання густого екстракту чебрецю повзучого

Для отримання густого екстракту при проведенні експерименту використане наступне обладнання:

- насос глибокого вакууму VT6 з максимальним розрідженням до 0,85 кгс/см<sup>2</sup> з вакуумметром ОБВ 1-100 з діапазоном вимірювання від 0 до -1 кгс/см<sup>2</sup>;

- лабораторний роторний випарювач LABOROTA 4001;

У ході проведення експерименту нами відібрано по 500 мл екстракту чебрецю повзучого. Упарювання проводили до об'єму 100 мл фіксуючи час упарювання за наступних умов:

- значення температури 60 °С, вакууму 0,6 кгс/см<sup>2</sup>;
- значення температури 60 °С, вакууму 0,8 кгс/см<sup>2</sup>;
- значення температури 80 °С, вакууму 0,6 кгс/см<sup>2</sup>;
- значення температури 80 °С, вакууму 0,8 кгс/см<sup>2</sup>.

Результати експерименту представлені у таблиці 5.

**Таблиця 5 – Режимы згущення рідкого екстракту чебрецю повзучого**

Режим	Температура, °С			
	60		80	
Вакуум, кгс/см <sup>2</sup>	0,6	0,8	0,6	0,8
Час упарювання, хв ( з 500 мл до 100 мл )	95	80	65	55

З одержаних даних можна зробити висновок, що суттєвий вплив має



температура упарювання, а саме приблизно на 50 % швидше упарюється екстракт при 80 °С порівняно з 60 °С упарювання. При розрідженні вакууму 0,8 кгс/см<sup>2</sup> приріст складає близько 15-20 % порівняно із вакуумом 0,6 кгс/см<sup>2</sup>.

**Таблиця 6 – Залежність тривалості упарювання від температури упарювання**

Значення вакууму, кгс/см <sup>2</sup>	Температура упарювання, °С	Тривалість упарювання, год.	Вміст флавоноїдів, г
0,8	30	9	2,73 ± 0,04
0,8	40	7	2,72 ± 0,03
0,8	50	5,5	2,73 ± 0,04
0,8	60	4,5	2,72 ± 0,03
0,8	70	4	2,72 ± 0,02
0,8	80	4	2,70 ± 0,02

Як видно з результатів експерименту [9], оптимальною температурою упарювання є температура 60-70 °С, при цьому тривалість упарювання складатиме 4-4,5 год. Внаслідок того, що екстракт являє собою складну фізико-хімічну систему, що складається з багатьох індивідуальних речовин, а саме фенольних сполук (апигенін і лютеолін та їхні глікозиди, кофейна, хлорогенова і розмаринова кислоти тощо), що є термолабільними сполуками, підвищення температури вище 70 °С є ризикованим з точки зору зниження кількісного вмісту флавоноїдів.

В результаті проведеного експерименту, отримано готовий продукт – густий екстракт трави чебрецю повзучого, який візуально є густою, в'язкою масою, яка не виливається з тари, а розтягується в нитки і знову зливається в суцільну масу із специфічним запахом.

Технологічна схема отримання екстракту густого чебрецю повзучого представлена на рисунку 1.

Технологічний процес виробництва екстракту густого чебрецю повзучого складається з таких стадій:

ДР.1. Санітарна підготовка виробництва.

ДР.2. Підготовка сировини

ТПЗ. Отримання рідкого екстракту з трави чебрецю повзучого.

ТП4. Отримання екстракту густого чебрецю повзучого .

Санітарна підготовка виробництва включає наступні операції:



- ДР1.1 приготування дезінфікуючих розчинів;
- ДР1.2 підготовка вентиляційного повітря;
- ДР1.3 підготовка виробничих приміщень;
- ДР1.4. підготовка обладнання і інвентарю;
- ДР1.5. підготовка технологічного одягу;
- ДР1.6. підготовка робочого персоналу.

Технологічну стадію (ДР2. – підготовка сировини) здійснюють в приміщеннях складування сировини. Сировину і допоміжні матеріали, зберігають на складах, на піддонах або стелажах по найменуваннях, згідно вибухонебезпечних і токсикологічних властивостей відповідно до вимог Правил пожежної безпеки для підприємств з виробництва лікарських засобів (НАПБ В.01.051-99/191). Вхідний контроль сировини і матеріалів здійснюється Відділом контролю якості (ВКЯ) згідно КД 64У-2-95 “Вхідний контроль сировини і матеріалів для виробництва продукції медичної та мікробіологічної промисловості”. Відбір проб здійснюють згідно з документом НРН.QM.QC.U5.Sam.01.In “Порядок відбору проб вихідної сировини” на складі сировини в спеціально відведеному приміщенні класу D, обладнаному припливно-витяжною вентиляцією.

Технологічну стадію (ДР.2.1 – подрібнення сировини (трави) чебрецю повзучого) здійснюють в приміщенні подрібнення сировини на валковій дробарці тип ПД-630 поз. РМ73 відповідно до НРН.М.ЕР.СОЕ.Сhem.U1.03.In.

За допомогою сит для ручного просіву перевіряють розмір подрібнених частинок, який має бути в середньому 1-2 мм. Роботу на подрібнюючому обладнанні проводять при постійно працюючих припливно-витяжній вентиляції, місцевому відсмоктуванні, які забезпечують вміст рослинного пилу у повітрі в концентрації не вище граничнодопустимої. В бункер завантажують траву чебрецю повзучого, попередньо зважені на вазі поз. КП4 в кількості 154,0 кг (К2.1.1), періодично перевіряють розмір розчавленої рослинної сировини (К2.1.2). Після чого подрібнену траву чебрецю (ДР.2.1) повзучого збирають в чисті поліетиленові мішки, маркують етикеткою «Проміжна продукція» відповідно до НРН.М.ЕР.СОЕ. Сhem. Com.38.In, зважують на вазі поз. КП4 і передають у приміщення екстракції.

Технологічна стадія ТПЗ – отримання рідкого екстракту з трави чебрецю повзучого включає такі операції:

- ТПЗ.1. Приготування 60 % водно-спиртової суміші.



ТПЗ.2. Приготування 30 % водно-спиртової суміші

ТПЗ.3. Екстракція трави чебрецю повзучого.

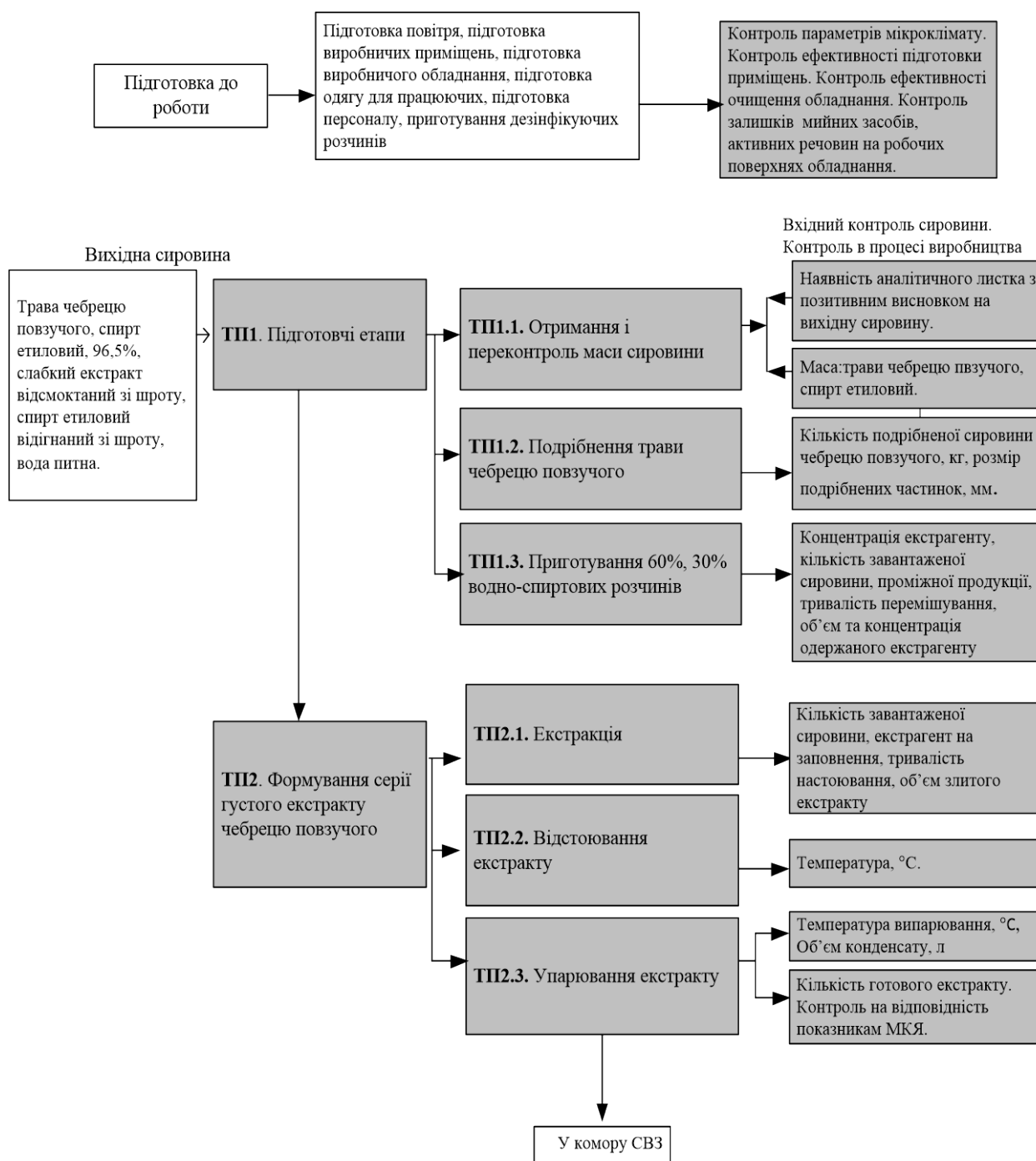
Екстракцію проводять 60 %, 30 % водно-спиртовою сумішшю та водою гарячою (95 °С). В підготовлений апарат поз. 378 самопливом із мірника поз. М75 подають 96,5 % етиловий спирт в відповідному об'ємному співвідношенні. Із збірника поз. 379 (на заповнення) перетискують за допомогою інертного газу в мірник поз. М75 слабкий екстракт, відсмоктаний із трави чебрецю повзучого (250,0 л) і відігнаний (150,61 л) з екстрактора спирт етиловий із шроту, із збірника поз. 383 (на витіснення) перетискують за допомогою інертного газу в мірник поз. М75 спирт етиловий, отриманий після упарювання екстракту (361,56 л), і самопливом із мірника поз. М75 подають в апарат поз. 378 (КЗ.1.1).

З відділення водопідготовки за допомогою вакууму подають очищену воду М9 в апарат поз. Р76 (КЗ.1.2) та включають мішалку для перемішування впродовж 10 – 15 хв (КЗ.1.3) спирту. Після чого відбирають проби водно-спиртових сумішей відповідно до НРН.М.ЕР.СОЕ.Сhem.Сom.14.Іn та визначають концентрацію спирту етилового в них (КЗ.1.4) згідно НРН.М.ЕР.СОЕ.Сhem.У1.76.Іn.

Приготовлений екстрагент перетискують за допомогою інертного газу в мірник поз. М75 і з нього при необхідності передають на наступну операцію ТПЗ.2. Перед завантаженням мірник поз. М75 продувають інертним газом (тиск азоту 0,2 кгс/см<sup>2</sup>), мірну ємкість маркують етикеткою «Проміжна продукція» відповідно до НРН.М.ЕР.СОЕ.Сhem.Сom.38.Іn. Процес екстрагування трави чебрецю повзучого (ТП 3.3. – екстракція трави чебрецю повзучого) проводили методом реперколяції в батареї із 4-х екстракторів поз. Р11 (1, 2, 3, 4), експлуатацію яких проводять відповідно НРН.М.ЕР.СОЕ.Сhem.У1.15.Іn. В підготовлений екстрактор поз. Р11(1) через верхній люк завантажують зважених на вазі поз. КП4 150 кг подрібненої трави чебрецю повзучого (КЗ.2.1) і зверху на неї вкладають нержавістальний сітчатий круг. Після загрузки екстрактор щільно закривають кришкою. Із мірника поз. М75 через нижній зливний кран екстрактора поз. Р11(1) самопливом подають 60 % водно-спиртову суміш в кількості 500 л до утворення над сировиною чебрецю повзучого дзеркала розчинника (КЗ.2.2). Наповнення і витіснення екстракту проводять зі швидкістю 40 л/год (КЗ.2.3). Настоювання проводять 12 год (КЗ.2.4). Одночасно з цим готують до роботи наступний екстрактор з аналогічною загрузкою рослинної сировини. Після закінчення часу



настоювання до верхнього зливного патрубку екстрактора поз. Р11(1) підключають нижній зливний патрубок другого екстрактора поз. Р11(2), завантаженого рослинною сировиною. Із мірника поз. М75 в екстрактор поз. Р11(1) самопливом через нижній зливний кран подають 500 л 30 % водно-спиртової суміші, витісняючи первинний екстракт з екстрактора поз. Р11(1) в екстрактор поз. Р11(2). Заповнення проводять до появи первинного екстракту в верхньому зливному патрубку екстрактора поз. Р11(2). Обидва заповнених екстрактори залишають для настоювання впродовж 12 год. Паралельно готують до роботи наступний третій екстрактор з аналогічною загрузкою рослинної сировини. Після настоювання в екстракторах поз.Р11(1) і поз. Р 11(2) із мірника поз. М75, аналогічно вищеописаному, в екстрактор поз. Р11(1) знову подають 500 л 30 % водно-спиртової суміші, яка витісняє з нього екстракт в екстрактор поз. Р11(2), з якого через патронний фільтр поз. Ф12, заправлений марлею, витісняється 500 л екстракту в збірник поз. 378 (КЗ.2.5). Збірник поз. 378 обладнаний мірним склом, манометром поз. КП7. Після знімання екстракту до батареї екстракторів поз. Р11(1) і поз. Р11(2) підключають екстрактор поз. Р11(3) з завантаженою рослинною сировиною і заповнюють його через 2 попередні екстрактори, подаючи 500 л 30 % самопливом із мірника поз. М75 в екстрактор поз.Р11(1). Після закінчення наповнення проводять настоювання в 3-х екстракторах впродовж 12 год. Після цього із екстрактора поз. Р11(3) витісняється в збірник поз. 378 через патронний фільтр 500 л екстракту, методом подачі (3 год) гарячої води (95 °С) в кількості 500 л в екстрактор поз. Р11(1).



**Рисунок 1 – Технологічна схема отримання густого екстракту чебрецю повзучого**

До батареї екстракторів поз. Р11(1), поз. Р11(2) і поз. Р11(3) підключають екстрактор поз. Р11(4) з завантаженою сировиною і заповнюють його через 3 попередні екстрактори, подаючи 500 л свіжої суміші самопливом із мірника поз. М75 в екстрактор поз. Р11(1). Після закінчення наповнення проводять настоювання в екстракторах поз. Р11(2), поз. Р11(3), поз. Р11(4) впродовж 12



годин, а екстрактор поз. Р11(1) відключають (так закінчується пусковий режим – розгортання батареї), робочий період починається з другого обороту 1-го перколятора).

На екстракторі поз. Р11(1) закривають всі вентиля, крім вентиля на лінії відсмоктування. На збірнику поз. 379, обладнаному мановакуумметром поз. КП16, включають вакуум і проводять відсмоктування слабкого екстракту із екстрактора поз. Р11(1) до кількості 250 л (К3.2.6) з наступною подачею його в мірник поз. М75 з метою використання його на стадії екстракції після відповідного коректування. Відсмоктування проводять при вакуумі  $0,6 \div 0,7$  кгс/см<sup>2</sup> протягом  $1,5 \div 2$  годин (К3.2.7). Слабкий екстракт аналізують на вміст спирту по методиці К3.2.10 (для спирту). Після відсмоктування екстрагенту закривають вентиль на лінії відсмоктування, подають воду на теплообмінник поз. Т20, гостру пару в екстрактор поз. Р11(1) і пару в оболонку екстрактора.

Відгін спиртової суміші проводять в збірник поз. 379 впродовж 8-8,5 годин глухою і гострою парою (К3.2.9) до повного зникнення спирту з трави чебрецю. Після закінчення відгону закривають гостру пару, зливають воду з екстрактора, яка там залишилась, і вивантажують відпрацьований шрот відповідно до НРН.М.ЕР.СОЕ.Сhem.Сom.02.Іn. З отриманого рідкого екстракту відбирають пробу згідно НРН.М.ЕР.СОЕ.Сhem.Сom.14.Іn. для проведення аналізу згідно методики (К3.2.10). При регенерації відпрацьованого шроту одержують близько 150,61 л (К3.2.11) водно-спиртової суміші, яку аналізують на вміст спирту згідно НРН.М.ЕР.СОЕ.Сhem.У1.76.Іn. (К3.2.12). Водно-спиртову суміш передають в мірник поз. М75 з метою використання її на стадії екстракції після відповідного коректування.

Технологічна стадія ТП4 – отримання екстракту густого чебрецю повзучого складається із таких операцій:

ТП4.1. – відстоювання екстракту;

ТП4.2. – упарювання екстракту.

Відстоювання водно-спиртового екстракту чебрецю повзучого (ТП4.1) проводять в нержавістальній чаші поз. Р80, обладнаній оболонкою для охолодження. Водно-спиртовий екстракт в кількості 500 л самопливом подають із збірника екстракту поз. 378 в чашу поз. Р80, розсіл подають в оболонку чаші і відстоюють екстракт при температурі 3-5 °С не менше однієї доби для отримання прозорої рідини (К4.1.1). Після відстоювання, водно-спиртовий





екстракт чебрецю повзучого передають вакуумом у вакуум-випарний апарат поз. Р81.

Упарювання екстракту (ТП4.2.) проводять у вакуум-випарному апараті поз. Р81. обладнаному паровою оболонкою, термометром поз. КП37, мановакуумметром поз. КП16, теплообмінником поз. Т82 і збірником конденсату поз. 383. Подають пару в оболонку апарату, відгін проводять при температурі від 60 до 80 °С і вакуумі  $0,7 \pm 0,1$  кгс/см<sup>2</sup> (К4.2.1). Температуру контролюють кожні 15 хвилин (К4.2.2). Процес продовжують до того часу, поки кількість конденсату не становитиме близько 361,56 л (К4.2.3), або поки не з'являться погони, які не містять слідів спирту (з'явиться голубувате забарвлення конденсату). Одержаний спирт-відгін аналізують на вміст спирту етилового згідно НРН.М.ЕР.СОЕ.Сhem.U1.76.In. (К4.2.4). Одержаний відігнаний спирт передають в мірник поз.М75 і після відповідного коректування використовують на екстракціях наступних завантажень. Процес випарювання продовжують при температурі  $80 \div 100$  °С (К4.2.5). Отриманий густий екстракт чебрецю повзучого аналізують згідно методики (К 4.2.6).

У випадку отримання негативного результату по вмісту вологи всю серію екстракту густого чебрецю повзучого піддають додатковому випарюванню, після чого серія екстракту густого повторно контролюється на втрату в масі при висушуванні. При отриманні позитивного результату аналізу продукт дають на упаковку. Отриманий конденсат води після доупарювання екстракту можна використовувати для отримання екстрагенту.

Екстракт густий чебрецю повзучого із вакуум-випарного апарату поз. Р81 вивантажують в чисту суху поліетиленову бочку. Контролер ВКЯ підприємства відбирає пробу готової продукції для аналізу на відповідність вимогам МКЯ №UA/6809/01/01 (К4.2.7).

### **7.3. Дослідження якісного складу біологічно активних речовин у рідкому та густому екстрактах чебрецю повзучого**

Оскільки при аналізі трави чебрецю повзучого з метою стандартизації цієї сировини як показник якості, серед інших, ми обрали склад флавоноїдів і гідроксикоричних кислот та кількісний вміст флавоноїдів, то доречним є



вивчення якісного та кількісного складу цих БАР і в одержаних екстрактах [11].

Ідентифікацію та визначення кількісного вмісту аналізованих БАР у ЛРС та відповідних їхніх екстрактах проводили із застосуванням сучасних чутливих і селективних методів аналізу.

Якісний склад флавоноїдів визначали методом ТШХ [12] у системі розчинників *етилацетат Р – мурашина кислота Р – вода Р* (90:6:9). Визначені об'єми розчинів наносили на хроматографічні пластинки Silica gel F<sub>254</sub> фірми “Merck” за допомогою приладу для автоматичного нанесення проб на пластинку “CAMAG Linomat 5”, хроматографування проводили в хроматографічній камері “GAMAG”.

Питання доповнення існуючої фармакопейної статті на ЛРС чебрецю повзучого ідентифікацією фенолкарбонових кислот і флавоноїдів, які чисельно представлені у даній сировині, розглянуто нами в розділі 3. Приступаючи до стандартизації рідкого та густого екстракту чебрецю повзучого, нами розглядалась можливість ідентифікації таких же БАР, продовжуючи запропонований підхід у ланцюзі ЛРС – екстракти.

Хроматографічні дослідження рідкого та густого екстракту чебрецю повзучого методом ТШХ дозволили ідентифікувати фенолкарбонові кислоти – розмаринова (головний представник), кофейна і хлорогенова; флавоноїди – лютеолін-7-О-глюкозид, апігенін-7-О-глюкозид, лютеолін, апігенін і рутин. Не ідентифікували дві кислоти, незначні кількості яких виявляються у верхній частині хроматограми і невстановленої будови глюкозид лютеоліну, який за розміром та інтенсивністю флуоресценції, є головним представником флавоноїдів в екстракті. Виходячи з даних літератури [5] цей представник флавоноїдів може бути лютеолін-7-О-ди або триглюкозидом.

Тому, кислоти – розмаринова, кофейна, хлорогенова і флавоноїди – лютеолін-7-О-глюкозид, рутин і лютеолін, а також невстановленого складу глюкозид лютеоліну, ми обрали як ідентифікаційні маркери рідкого екстракту чебрецю повзучого, наявність зон яких на хроматограмі досліджуваного об'єкту дозволить об'єктивно його ідентифікувати.

В результаті проведених ТШХ-досліджень нами пропонується наступна методика ідентифікації флавоноїдів та фенолкарбонових кислот у рідкому та густому екстракті чебрецю повзучого.

Методика ідентифікації досліджуваних БАР у екстрактах чебрецю повзучого.



*Випробовуваний розчин:* а) рідкий екстракт чебрецю повзучого;

б) 0,4 г густого екстракту чебрецю повзучого розчиняють в 10 мл 96 % *етанолу Р* в ультразвуковій бані впродовж 10 хв, фільтрують.

*Розчин порівняння.* 0,5 мг СЗ кислоти розмаринової (Fluka), 0,5 мг СЗ кислоти кофейної (Fluka), 0,5 мг СЗ кислоти хлорогенової (Fluka), 1,0 мг ФСЗ лютеолін-7-О-глюкозиду (ДФУ), 0,5 мг СЗ рутину (Sigma) і 0,5 мг СЗ лютеоліну (Fluka) розчиняють у 20,0 мл метанолу Р.

На лінію старту хроматографічної пластинки окремо смугами по 10 мм наносять 10 мкл *випробовуваного розчину* (а, б) та 5 мкл *розчину порівняння*. Пластинку поміщають у камеру із сумішшю розчинників *кислота мурашина безводна Р – вода Р – етилацетат Р* (6:9:90). Коли фронт розчинників пройде 10 см від лінії старту, пластинку виймають із камери.

*Висушування:* сушать на повітрі, а потім витримують при температурі від 100 °С до 105 °С впродовж 2 хв.

*Виявлення:* теплу пластинку обприскують *розчином 10 г/л аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р у метанолі Р*, сушать на повітрі. Потім пластинку обприскують *розчином 50 г/л макроголу 400 Р у метанолі Р*, сушать на повітрі впродовж 30 хв і переглядають в УФ-світлі з довжиною хвилі 365 нм.

*Результати:* на хроматограмі *розчину порівняння* повинні виявлятися (у порядку зростання  $R_f$ ): жовто-оранжева флуоресціююча зона, відповідна рутину ( $R_f = 0,18$ ), блакитна флуоресціююча зона, відповідна кислоті хлорогеновій ( $R_f = 0,32$ ); жовто-оранжева флуоресціююча зона, відповідна лютеолін-7-О-глюкозиду ( $R_f = 0,42$ ), салатово-блакитна флуоресціююча зона, відповідна кислоті розмариновій ( $R_f = 0,80$ ), блакитна флуоресціююча зона, відповідна кислоті кофейній ( $R_f = 0,82$ ), жовто-оранжева флуоресціююча зона, відповідна лютеоліну ( $R_f = 0,84$ ).

На хроматограмі *випробовуваного розчину* (а) мають виявлятися шість зон (рутину, кислоти хлорогенової, лютеолін-7-О-глюкозиду, кислоти розмаринової, кислоти кофейної і лютеоліну) на рівні зон на хроматограмі розчину порівняння, відповідні їм за забарвленням і флуоресценцією і зона яскравої жовто-оранжевої флуоресценції ( $R_f = 0,29$ ) нижче зони кислоти хлорогенової на хроматограмі розчину порівняння. Можуть виявлятися інші зони блакитної і жовто-оранжевої флуоресценції.

На хроматограмі *випробовуваного розчину* (б) мають виявлятися шість зон



(рутину, кислоти хлорогенової, лютеолін-7-О-глюкозиду, кислоти розмаринової, кислоти кофейної і лютеоліну) на рівні зон на хроматограмі розчину порівняння, відповідні їм за забарвленням і флуоресценцією і зона яскравої жовто-оранжевої флуоресценції ( $R_f = 0,29$ ) нижче зони кислоти хлорогенової на хроматограмі розчину порівняння. Можуть виявлятися інші зони блакитної і жовто-оранжевої флуоресценції.

Послідовність зон на хроматограмах випробуваного розчину (рідкого або густого екстракту) та розчину порівняння наведена нижче на рисунку 2.

Верхня частина пластинки	
<i>Лютеолін:</i> жовто-оранжева флуоресціююча зона	жовто-оранжева флуоресціююча зона (лютеолін)
<i>Кислота кофейна:</i> блакитна флуоресценціююча зона	блакитна флуоресціююча зона (кислота кофейна)
<i>Кислота розмаринова:</i> салатово-блакитна флуоресценціююча зона	салатово-блакитна флуоресценціююча зона (кислота розмаринова)
<i>Лютеолін-7-О-глюкозид:</i> жовто-оранжева флуоресціююча зона	жовто-оранжева флуоресціююча зона (лютеолін-7-О-глюкозид)
<i>Кислота хлорогенова:</i> блакитна флуоресціююча зона	блакитна флуоресціююча зона (кислота хлорогенова) <b>дуже інтенсивна</b> жовто-оранжева флуоресціююча зона
<i>Рутин:</i> жовто-оранжева флуоресціююча зона	жовто-оранжева флуоресціююча зона (рутин)
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

**Рисунок 2 – Схема хроматограми в умовах ідентифікації рідкого екстракту чебрецю повзучого після обробки розчинами аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти і макроголу 400 при перегляді в УФ-світлі з довжиною хвилі 365 нм**

В результаті проведених ТШХ-досліджень доведена наявність флавоноїдів та фенолкарбонових кислот в рідкому та густому екстрактах чебрецю, що дозволить об'єктивно встановлювати тотожність досліджуваних екстрактів на наявність БАР використаної сировини.



Наступним етапом дослідження було проведення ідентифікації полісахаридів в рідкому та густому екстрактах чебрецю повзучого і здійснювали методом ТШХ на пластинках “Silica gel” (Merck, Німеччина) в системі розчинників *вода P – ацетонітрил P* (15:85) із використанням розчину стандартних зразків (СЗ) моносахаридів (арабіноза, галактоза, рамноза, фруктоза, глюкоза, ксилоза) [139-142]. Хроматограми проявляли розчином тимолу (0,5 г тимолу, 5 мл концентрованої сульфатної кислоти та 95 мл 96 % спирту етилового). Результати хроматографічного виявлення моносахаридів в досліджуваних екстрактах наведено в таблиці 7.

**Таблиця 7 – Результати виявлення моносахаридів чебрецю повзучого у його рідкому екстракті методом ТШХ**

Моносахариди	R <sub>f</sub>	Колір зони після проявки
Арабіноза	0,21	сіро-фіолетова
Галактоза	0,13	рожева
Рамноза	0,33	оранжева
Фруктоза	0,18	темно-рожева
Глюкоза	0,17	світло-рожева
Ксилоза	0,29	світло-фіолетова
не ідентифікована	0,66	рожева

В результаті проведеного хроматографічного дослідження було ідентифіковано сім моносахаридів, один з яких залишився невідомим в зв'язку з відсутністю необхідного стандарту.

Методика ідентифікації моносахаридів в досліджуваних екстрактах чебрецю повзучого.

*Випробуваний розчин (а).* 10 мл рідкого екстракту чебрецю поміщали у стакан місткістю 100 мл і додавали 30 мл 96 % *етанолу P*, підігрівали 3 хв на водяній бані при температурі 30 °С до утворення в розчині кремових згустків. Після чого розчин відстоювали 1 годину, центрифугували, декантували, а з осадом проводили наступні операції: додавали 5 мл кислоти 2 моль/л сульфатної та кількісно перенесли в колбу місткістю 50 мл зі шліфом. Проводили нагрівання на водяній бані зі зворотнім холодильником впродовж 1 години. Після проведеного гідролізу отриманий розчин нейтралізували барій карбонатом. Пізніше суміш центрифугували, осад відкидали, застосували



надосадову рідину, як випробовуваний розчин.

*Випробуваний розчин (б).* 0,4 г густого екстракту поміщали у центрифужну пробірку, додавали 10 мл *води Р* і залишали в ультразвуковій бані протягом 10 хв, після чого центрифугували. Надосадову рідину переносили у стакан місткістю 100 мл, додавали 30 мл 96 % спирту і далі обробляли розчин, як вказано у приготуванні випробовуваного розчину (а), починаючи зі слів «...підігрівали 3 хвилини ...».

*Розчин порівняння.* 10 мг стандартних зразків фруктози, глюкози, арабінози, галактози, ксилози і рамнози поміщали у мірну колбу і розчиняли в у *воді Р*, доводячи об'єм розчину *водою Р* до позначки.

На лінію старту хроматографічної пластинки “Silica gel” розміром 20 × 20 см (Merck, Німеччина) наносять 15 мкл випробовуваного розчину (а) і (б) та 5 мкл розчину порівняння. Пластинку сушать на повітрі протягом 10 хв, поміщають у камеру з рухомою фазою *вода Р – ацетонітрил Р* (15:85) і хроматографують висхідним методом. Коли фронт розчинників пройде 15 см від лінії старту, її виймають з камери і сушать на повітрі. Пластинку обприскують розчином тимола (0,5 г тимола, 5 мл концентрованої сірчаної кислоти та 95 мл 96 % спирту *Р*) та нагрівають при температурі 100-105 °С впродовж 3-5 хв, переглядають при денному світлі.

У результаті проведеного аналізу [13], встановлено наявність фруктози, глюкози, арабінози, ксилози і рамнози у досліджуваних екстрактах чебрецю повзучого. За співвідношенням розміру та інтенсивності забарвлення плям на хроматограмах було зроблено висновок, що переважаючим моносахаридом є фруктоза, а з відновлюючих моносахаридів – глюкоза. Таким чином можна запропонувати обрати маркерами якості досліджуваних екстрактів наявність фруктози та глюкози (рис. 3).

З метою доведення наявності амінокислот в складі відповідних екстрактів проведено ТШХ-аналіз.

Методика ідентифікації амінокислот в рідкому та густому екстракті чебрецю повзучого наведена нижче.

*Випробуваний розчин (а)* Рідкий екстракт чебрецю.

*Випробовувай розчин (б)* 0, 4 г густого екстракту розчиняють в 10 мл спирту (30 %, об/об) *Р* на ультразвуковій бані впродовж 10 хв.



**Рисунок 3 – Схема хроматограми густого екстракту чебрецю повзучого (4) та розчинів порівняння (1, 2, 3, де 1 – арабіноза; 2 – галактоза; 3 – рамноза; 4 – фруктоза; 5 – глюкоза; 6 – ксилоза) в умовах ідентифікації моносахаридів**

*Розчин порівняння.* по 10 мг стандартних зразків гліцину, лейцину, тирозину, аланіну, аспарагінової та глютамінової кислот розчиняють в 25 мл води *P*.

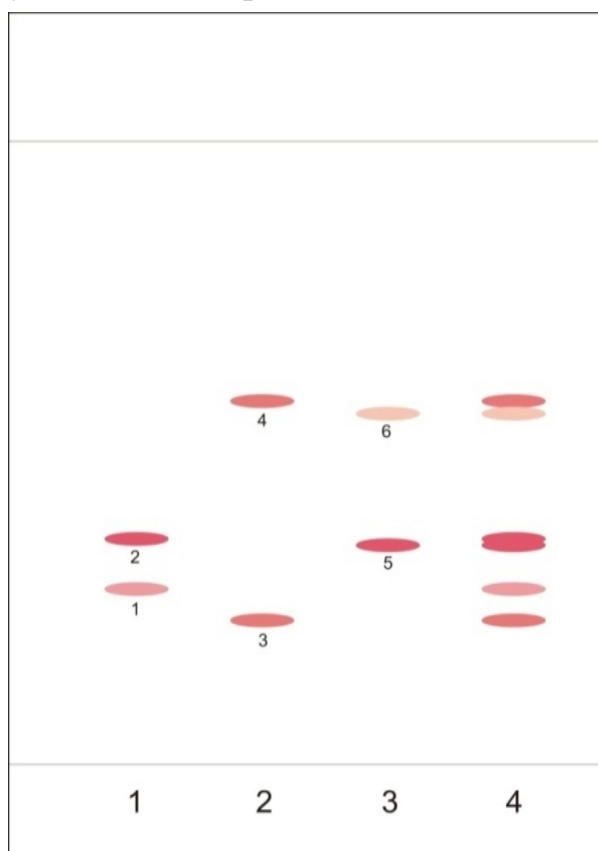
На лінію старту хроматографічної пластинки Silica gel F<sub>254</sub> розміром 20x20 см з товщиною шару 0,25 мм наносять смугами, завдовжки 10 мм, 20 мкл випробовуваного розчину та 5 мкл розчину порівняння. Пластинку сушать на повітрі впродовж 30 хв, поміщають у камеру з рухомою фазою *ізопропанол P – мурашина кислота P – вода P* (40:2:10) і хроматографують висхідним методом. Коли фронт розчинників пройде 15 см від лінії старту, її виймають з камери і сушать на повітрі. Пластинку обприскують *розчином нінгідрину P* у суміші *кислоти оцтової P* та *бутанолу P*, нагрівають при температурі 100-105 °С 3-5 хв і проглядають при денному світлі [14].

На хроматограмах випробовуваних розчинів рідкого і густого екстрактів спостерігали зони тирозину, аланіну, лейцину, гліцину, глютамінової та



аспарагінової кислот на рівні відповідних зон на хроматограмі розчину порівняння.

Схема хроматограми, отримана при дослідженні рідкого екстракту чебрецю повзучого в умовах ідентифікації амінокислот наведена на рисунку 4.



**Рисунок 4 – Схема хроматограми випробуваного розчину (4) та розчинів порівняння (1, 2, 3), на яких 1 – гліцин; 2 – аланін; 3 – аспарагінова кислота; 4 – лейцин; 5 – глутамінова кислота; 6 – тирозин.**

Таким чином, в складі рідкого екстракту чебрецю повзучого доведена наявність амінокислот.

#### **7.4. Визначення кількісного вмісту біологічно активних речовин у досліджуваних екстрактах чебрецю повзучого та вибір критеріїв прийнятності**

Розглядаючи кількісні показники для встановлення якості досліджуваних екстрактів ми зупинили свій вибір на кількісному визначенні в них флавоноїдів, полісахаридів та амінокислот. Останні представлені у ЛРС та ідентифіковані





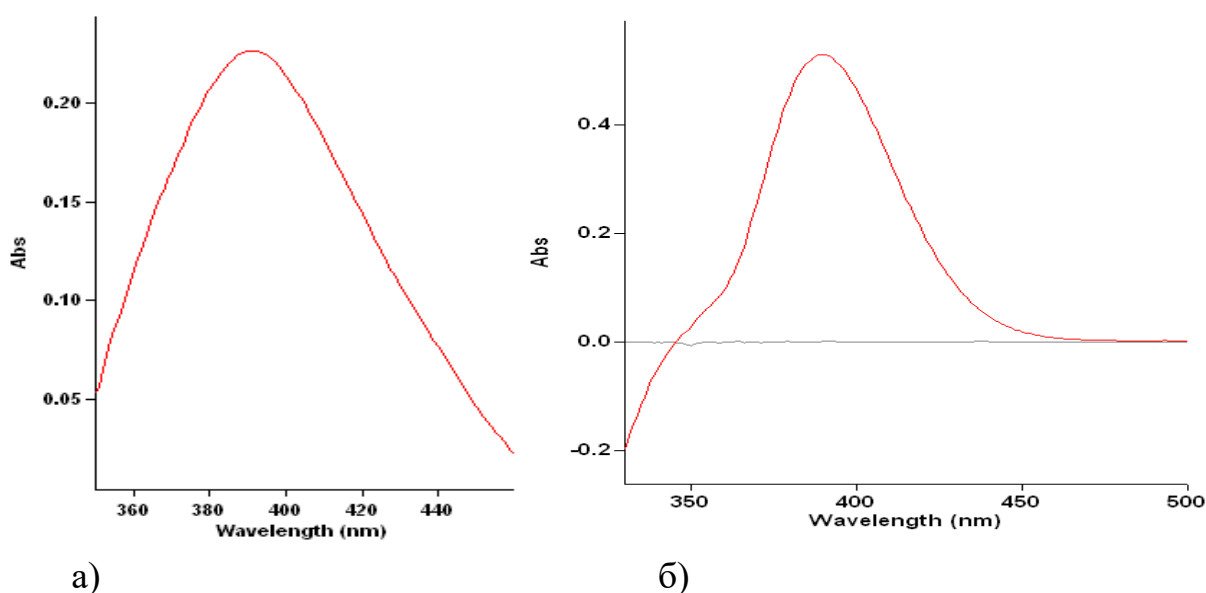
нами відповідно у рідкому й густому екстрактах [11-12].

Визначення суми флавоноїдів проводили методом диференціальної спектрофотометрії на спектрофотометрі марки “Cary-50”.

Кількісний вміст флавоноїдів у рідких екстрактах визначали по реакції утворення забарвленої сполуки безпосередньо флавоноїдів із алюміній хлоридом [5].

Оскільки стандартом для розрахунку їх вмісту у сировині було обрано апігенін, то і при контролі якості екстрактів необхідно розраховувати кількість флавоноїдів на апігенін [11].

Диференціальні електронні спектри поглинання комплексу алюміній хлориду з флавоноїдами, присутніми у рідкому екстракті чебрецю, характеризуються наявністю максимуму поглинання при  $390 \pm 2$  нм (рис. 5).



**Рисунок 5 – Диференціальні електронні спектри поглинання випробуваного (а) і розчину порівняння (б) в умовах кількісного визначення флавоноїдів у рідкому екстракті чебрецю повзучого ( $\lambda_{\max} = 390,0$  нм)**

Як видно з рисунку 5, в умовах кількісного визначення флавоноїдів, спектр поглинання випробуваного розчину для досліджуваного екстракту чебрецю повзучого за ходом кривої та положенням максимуму відповідає спектру поглинання відповідного комплексу апігеніну, тому суму флавоноїдів в екстракті розраховували у перерахунку на апігенін.

Для визначення суми флавоноїдів у рідкому екстракті чебрецю повзучого нами запропоновано наступну методику.



Методика визначення суми флавоноїдів в рідкому (густому) екстракті чебрецю повзучого.

*Вихідний розчин (а).* 10,0 мл рідкого екстракту поміщають в мірну колбу місткістю 50 мл і доводять об'єм розчину *спирт ом (70 %, об/об)Р* до позначки і перемішують (*вихідний розчин*).

*Випробуваний розчин (а).* 1,0 мл *вихідного розчину (а)* поміщають у мірну колбу місткістю 25 мл, додають 2,0 мл 3 % розчину алюміній хлориду і доводять об'єм розчину *спирт ом (70 %, об/об)Р* до позначки, перемішують.

*Компенсаційний розчин.* 1,0 мл *вихідного розчину (а)* поміщають в мірну колбу місткістю 25 мл і доводять об'єм розчину *спирт ом (70 %, об/об) Р* до позначки, перемішують.

*Вихідний розчин (б).* 0,13 г (точна наважка) густого екстракту чебрецю поміщають в мірну колбу місткістю 25 мл, розчиняють у 20 мл *спирту (60 %, об/об) Р* та доводять об'єм розчином тим же спиртом до позначки, перемішують.

*Випробуваний розчин (б).* 1,0 мл *вихідного розчину (б)* поміщають у мірну колбу місткістю 25 мл, додають 2,0 мл 3 % розчину алюмінію хлориду та доводять *спиртом (70 %, об/об) Р* до позначки, перемішують.

*Компенсаційний розчин.* 1,0 мл *вихідного розчину (б)* поміщають в мірну колбу місткістю 25 мл і доводять об'єм розчину *спирт ом (70 %, об/об) Р* до позначки, перемішують.

*Розчин стандартного зразка апігеніну.* 0,03 г (точна наважка) стандартного зразка апігеніну (Fluka) поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, додають 70 мл *спирту (70 %, об/об) Р*, розчиняють та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки і перемішують.

10,0 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу місткістю 25 мл і доводять об'єм розчину *спирт ом (70 %, об/об) Р* до позначки, перемішують.

*Розчин порівняння.* 1,0 мл розчину стандартного зразка апігеніну поміщають в мірну колбу місткістю 25 мл, додають 2,0 мл 3 % розчину алюміній хлориду і доводять об'єм розчину *спирт ом (70 %, об/об) Р* до позначки, перемішують.

*Компенсаційний розчин.* 1,0 мл розчину стандартного зразка апігеніну поміщають в мірну колбу місткістю 25 мл і доводять об'єм розчину *спирт ом (70 %, об/об) Р* до позначки, перемішують.

Через 45 хв записують диференціальні електронні спектри поглинання для



випробовуваного розчину і розчину порівняння відносно компенсаційних розчинів для кожного відповідно та вимірюють оптичну густина в максимумі поглинання при довжині хвилі  $390 \pm 2$  нм.

Вміст суми флавоноїдів ( $X_1$ ) в рідкому екстракті чебрецю, у відсотках та в перерахунку на апігенін, розраховують за формулою:

$$X_1 = \frac{2 \cdot m_0 \cdot A}{A_0}$$

де:  $A$  – оптична густина *випробовуваного розчину*,

$m_0$  – маса наважки стандартного зразка апігеніну, в г;

$A_0$  – оптична густина *розчину порівняння*.

Вміст суми флавоноїдів ( $X_2$ ) в густому екстракті, у відсотках, в перерахунку на апігенін та на суху речовину, розраховують за формулою:

$$X_2 = \frac{25 \cdot m_0 \cdot 6 \cdot 100 \cdot 100 \cdot A}{A_0 \cdot 100 \cdot m \cdot (100 - W)}$$

де:  $A$  – оптична густина *випробовуваного розчину*;

$m$  – маса наважки екстракту, взятого для аналізу, г;

$m_0$  – маса наважки стандартного зразка апігеніну, г;

$W$  – втрата в масі при висушуванні, %.

Результати кількісного визначення суми флавоноїдів у рідких та густих екстрактах наведено в таблиці 8.

Кількісний вміст флавоноїдів у досліджуваних екстрактах коливається у певних межах і визначається їх вмістом у вихідній сировині та відтворюваністю технології екстракту. Зважаючи на отримані результати кількісного визначення, при стандартизації рідкого екстракту чебрецю повзучого можна запропонувати критерієм якості вміст флавоноїдів не менше 0,03 %, густого екстракту – не менше 2,5 % у перерахунку на апігенін.

**Таблиця 8 – Результати визначення вмісту флавоноїдів в рідких та густих екстрактах ( $P = 0,95$ ;  $n = 5$ )**

Екстракт	Вміст флавоноїдів в перерахунку на апігенін, %			
	№1	№2	№3	№4
Рідкий екстракт чебрецю	$0,052 \pm 0,01$	$0,049 \pm 0,01$	$0,051 \pm 0,01$	$0,048 \pm 0,01$
Густий екстракт чебрецю	$2,81 \pm 0,01$	$2,80 \pm 0,02$	$2,81 \pm 0,03$	$2,77 \pm 0,02$



Визначення полісахаридів в рідкому екстракті чебрецю повзучого проводили гравіметрично, а вміст відновлюючих моносахаридів – спектрофотометрично з використанням фотометричної реакції відновлення пікринової кислоти до пікрамінової [15].

Методика гравіметричного визначення вмісту полісахаридів у рідкому екстракті чебрецю повзучого.

20,0 мл рідкого екстракту (точна наважка) поміщають у стакан місткістю 200 мл, додають 60 мл 96 % спирту Р, перемішують і нагрівають на водяній бані при температурі 30 °С протягом 5 хв. Витримують 1 год і фільтрують під вакуумом через скляний фільтр ПОР 16, попередньо висушений при температурі 100-105 °С до постійної маси. Осад кількісно переносять на фільтр за допомогою 15 мл суміші вода Р – 96 % спирт Р (1:2) і послідовно промивають 10 мл 96 % спирту Р, 15 мл ацетону Р та 15 мл етилацетату Р. Фільтр з осадом сушать на повітрі, потім висушують при температурі 100 – 105 °С до постійної маси, охолоджують в ексікаторі і зважують.

Вміст полісахаридів в рідкому екстракті у відсотках, розраховують за формулою:

$$X = \frac{m}{m_{\text{нав}}} \cdot 100\%$$

де  $m$  – маса осаду після висушування і доведення до постійної маси, г;

$m_{\text{нав}}$  – маса рідкого екстракту, взятого для аналізу, г.

Результати гравіметричного визначення вмісту полісахаридів представлені в таблиці 9.

**Таблиця 9 – Результати гравіметричного визначення вмісту полісахаридів в рідкому екстракті чебрецю повзучого (Р = 0,95; n = 5)**

Зразок екстракту	Вміст полісахаридів, %
1	0,28 ± 0,02
2	0,30 ± 0,01
3	0,29 ± 0,02
4	0,26 ± 0,01

Окрім цього, нами були проаналізовані досліджувані екстракти на вміст відновлюючих моносахаридів методом спектрофотометрії у видимій ділянці спектру.

Методика кількісного визначення вмісту відновлюючих моносахаридів в



рідкому та густому екстракті чебрецю повзучого.

*Вихідний розчин (а).* 10,0 мл рідкого екстракту (точна наважка) поміщають у центрифужну пробірку місткістю 50 мл, додають 30 мл 96 % спирту Р, перемішують і нагрівають на водяній бані при температурі 30 °С протягом 5 хв. Витримують 1 год, вміст центрифугують, надосадову рідину відкидають, а осад переносять за допомогою 5,0 мл кислоти хлористоводневої розведеної Р та 5,0 мл води Р у конічну колбу місткістю 50 мл зі шліфом та нагрівають впродовж 1 год зі зворотнім холодильником на киплячій водяній бані. Колбу з вмістом охолоджують, поміщають в колбу невеликий шматок паперу конго і додають по краплях 40 % розчин натрію гідроксиду до почервоніння паперу, потім додають по краплях кислоту хлористоводневу розведену до посиніння паперу, а потім по краплях 10 % розчин натрію гідроксиду до почервоніння паперу. Отриманий розчин кількісно переносять за допомогою води Р в мірну колбу місткістю 25 мл, доводять об'єм розчину водою Р до позначки, перемішують і фільтрують, відкидаючи перші 5 мл фільтрату (розчин А).

*Вихідний розчин (б).* 0,2 г (точна наважка) густого екстракту чебрецю повзучого поміщають в мірну колбу місткістю 25 мл, додають 10 мл води Р, розчиняють і обробляють його так, як при приготуванні розчину А, починаючи зі слів “поміщають у центрифужну пробірку ...”. (розчин В)

*Випробовуваний розчин (а).* 1,0 мл 1 % розчину кислоти пікринової поміщають в плоскодонну колбу місткістю 25 мл, додають 3,0 мл 20 % розчину натрію карбонату і 1,0 мл розчину А. Колбу з вмістом витримують на киплячій водяній бані протягом 10 хв, потім охолоджують до кімнатної температури. Вміст колби кількісно переносять за допомогою води Р у мірну колбу місткістю 25 мл і доводять об'єм розчину водою Р до позначки.

*Випробовуваний розчин (в).* 1,0 мл 1 % розчину кислоти пікринової поміщають в плоскодонну колбу місткістю 25 мл, додають 3,0 мл 20 % розчину натрію карбонату і 1,0 мл розчину В. Колбу з вмістом витримують на киплячій водяній бані протягом 10 хв, потім охолоджують до кімнатної температури. Вміст колби кількісно переносять за допомогою води Р у мірну колбу місткістю 25 мл і доводять об'єм розчину водою Р до позначки.

*Розчин стандартного зразка глюкози.* 0,14 г (точна наважка) стандартного зразка глюкози (Fluka), висушеної при температурі від 100 до 105 °С до постійної маси, поміщають в мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняють у 50 мл води Р, доводять об'єм розчину водою Р до позначки і перемішують. 10,0



мл одержаного розчину поміщають в мірну колбу місткістю 25 мл, доводять об'єм розчину водою  $P$  до позначки і перемішують.

*Розчин порівняння.* 1,0 мл 1 % розчину кислоти пікринової, 3,0 мл 20 % розчину натрію карбонату і 1,0 мл розчину стандартного зразка глюкози, оброблений аналогічно досліджуваному розчину, починаючи зі слів: « Колбу з вмістом витримують...».

*Компенсаційний розчин.* 1,0 мл 1 % розчину кислоти пікринової, 3,0 мл 20 % розчину натрію карбонату і 1,0 мл води  $P$ , оброблений аналогічно досліджуваному розчину, починаючи зі слів «Колбу з вмістом витримують...».

Оптичну густину випробовуваного розчину і розчину порівняння вимірюють при довжині хвилі 460 нм відносно компенсаційного розчину.

Вміст відновлюючих моносахаридів в рідкому екстракті, у відсотках, в перерахунку на глюкозу, розраховують за формулою:

$$X_1 = \frac{A_x \cdot m_0}{A_0 \cdot 10 \cdot m} \cdot 100,$$

де  $A_x$  – оптична густина випробуваного розчину;

$A_0$  – оптична густина розчину порівняння;

$m_0$  – маса наважки стандартного зразка глюкози, г;

$m$  – маса екстракту взятого для аналізу, г.

Вміст відновлюючих моносахаридів в густому екстракті, у відсотках, в перерахунку на глюкозу і суху речовину, розраховують за формулою:

$$X_2 = \frac{A_x \cdot m_0 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot 4 \cdot m_n \cdot (100 - W)},$$

де  $A_x$  – оптична густина випробуваного розчину;

$A_0$  – оптична густина розчину порівняння;

$m_0$  – маса наважки стандартного зразка глюкози, г;

$m$  – маса наважки екстракту, взятого для аналізу, г;

$W$  – вміст вологи у екстракті, %.

Результати кількісного визначення відновлюючих моносахаридів представлені у таблиці 10.

Кількісний вміст відновлюючих моносахаридів у досліджуваних екстрактах коливається і визначається вмістом у вихідній сировині та відтворюваністю вибраної технології екстракту.



**Таблиця 10 – Результати визначення вмісту відновлюючих моносахаридів в рідких та густих екстрактах чебрецю повзучого ( $P = 0,95; n = 5$ )**

Досліджувані екстракти	Вміст відновлюючих моносахаридів в перерахунку на глюкозу, %			
	№1	№2	№3	№4
Рідкий екстракт чебрецю	0,113 ± 0,02	0,121 ± 0,02	0,101 ± 0,003	0,121 ± 0,002
Густий екстракт чебрецю	6,02 ± 0,10	6,87 ± 0,09	5,60 ± 0,10	6,97 ± 0,11

Керуючись результатами кількісного визначення відновлюючих моносахаридів, при стандартизації рідкого та густого екстракту чебрецю повзучого можна запропонувати критерієм якості вміст відновлюючих моносахаридів не менше 0,09 %, густого екстракту – не менше 5,0 % у перерахунку на глюкозу.

Визначення амінокислот в досліджуваних екстрактах чебрецю повзучого проводили методом спектрофотометрії у видимій ділянці спектру з використанням відомої і використовуваної фотометричної реакції утворення забарвленої сполуки амінокислот з нінгідринном [16].

Методика кількісного визначення вмісту амінокислот в рідкому і густому екстрактах чебрецю повзучого.

*Випробовуваний розчин (а).* До 1,0 мл (точна наважка) рідкого екстракту, поміщеного у пробірку, додають 1,1 мл свіжоприготовленого 0,2 % розчину нінгідрину  $P$  і нагрівають у киплячій водяній бані протягом 20 хв. Після повного охолодження розчин кількісно переносять у мірну колбу місткістю 100 мл і розбавляють водою  $P$  до позначки, перемішують.

*Випробовуваний розчин (б).* 0,13 г (точна наважка) густого екстракту чебрецю поміщають у мірну колбу місткістю 25 мл, розчиняють в 20 мл спирту (30 %, об/об) та доводять тим же спиртом об'єм розчину до позначки, перемішують.

1,0 мл отриманого розчину обробляють аналогічно випробовуваному розчину (а) починаючи зі слів «поміщеного у пробірку...».

*Розчин порівняння.* 0,059 г (точна наважка) ФСЗ гліцину поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, додають 70 мл води  $P$ , розчиняють протягом 5-10 хв, нагріваючи на водяній бані при температурі 50 °С. Охолоджують і доводять об'єм розчину водою  $P$  до 100 мл і перемішують.



До 1,0 мл отриманого розчину, поміщеного у пробірку, додають 1,1 мл 0,2 % розчину нінгідрину  $P$  і нагрівають в киплячій водяній бані протягом 20 хв. Після повного охолодження розчин кількісно переносять у мірну колбу місткістю 100 мл і розбавляють водою  $P$  до позначки, перемішують.

*Компенсаційний розчин.* 1,0 мл води  $P$  поміщають у пробірку, додають 1,1 мл 0,2 % розчину нінгідрину  $P$  і нагрівають у киплячій водяній бані протягом 20 хв. Після повного охолодження розчин кількісно переносять у мірну колбу місткістю 100 мл і розбавляють водою  $P$  до позначки, перемішують.

0,2 % розчин нінгідрину  $P$  0,1 г нінгідрину поміщають у мірну колбу місткістю 50 мл, розчиняють у 30 мл води  $P$ , доводять об'єм розчину тим же розчинником до позначки і перемішують.

Через 1 год вимірюють оптичну густина випробовуваного розчину і розчину порівняння на спектрофотометрі при довжині хвилі  $567 \pm 2$  нм у кюветі з товщиною шару 10 мм відносно компенсаційного розчину.

Вміст амінокислот в рідкому екстракті, у відсотках, в перерахунку на гліцин, розраховують за формулою:

$$X_1 = \frac{A_x \cdot m_0}{A_0 \cdot m} \cdot 100$$

де  $A_x$  – оптична густина випробовуваного розчину;

$A_0$  – оптична густина стандартного зразка гліцину;

$m_0$  – маса наважки стандартного зразка гліцину, г;

$m$  – маса екстракту взятого для аналізу, г.

Вміст амінокислот в густому екстракті, у відсотках, в перерахунку на гліцин, розраховують за формулою:

$$X_2 = \frac{A_x \cdot m_0 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot 16 \cdot m_{\text{н}} \cdot (100 - W)}$$

де  $A_x$  – оптична густина випробовуваного розчину;

$A_0$  – оптична густина розчину порівняння;

$m_0$  – маса наважки стандартного зразка глюкози, г;

$W$  – вміст води в екстракті, %;

$m_{\text{нав}}$  – маса наважки густого екстракту, взятого для аналізу, г.

Результати кількісного визначення суми амінокислот в екстрактах чебрецю представлені у таблиці 11.





**Таблиця 11 – Результати кількісного визначення суми амінокислот в в рідких та густих екстрактах чебрецю повзучого (P = 0,95; n = 5)**

Екстракти	Вміст амінокислот в перерахунку на гліцин, %			
	№1	№2	№3	№4
Рідкий екстракт чебрецю $\times 10^{-2}$ , %	4,40 $\pm$ 0,04	5,48 $\pm$ 0,03	3,25 $\pm$ 0,05	5,10 $\pm$ 0,03
Густий екстракт чебрецю	1,86 $\pm$ 0,02	2,18 $\pm$ 0,01	1,50 $\pm$ 0,01	2,08 $\pm$ 0,02

Таким чином визначено кількісний вміст суми амінокислот у перерахунку на гліцин у досліджуваних екстрактах чебрецю повзучого. Кількісним критерієм якості запропоновано їхній вміст відповідно у рідкому екстракті не менше 0,03 % та у густому – не менше 1,0 %.



## Висновки.

1. Досліджено вплив концентрації спирту етилового, часу і режимів екстракції на вихід екстрактивних речовин, флавоноїдів, відновлюючих моносахаридів, амінокислот трави чебрецю повзучого.

2. Підібрано оптимальний спосіб одержання рідкого екстракту чебрецю повзучого, яка здійснюється градієнтним екстрагуванням із застосуванням спирту етилового різної міцності (60 % і 30 % (об/об)) та гарячої води, чотирьох перколяторів, методу реперколяції з періодичним перемішуванням сировини у перколяторах. Застосування такої технології отримання дозволяє отримувати екстракт, який максимально насичений флавоноїдами, амінокислотами, полісахаридами.

3. Досліджено оптимальні умови отримання густого екстракту чебрецю повзучого, які полягають у випаровуванні під вакуумом при температурі 60-70 °С і залишковому вакуумі 0,8 кгс/см<sup>2</sup>.

4. Досліджено якісний склад рідкого і густого екстрактів трави чебрецю повзучого за групами БАР – флавоноїди, амінокислоти, полісахариди. З метою стандартизації екстрактів запропоновано ідентифікаційні маркери з фенольних сполук – лютеолін-7-О-глюкозид, лютеолін, рутин, хлорогенова, розмаринова і кофейна кислоти, глікозид лютеоліну невідомого складу.

5. Досліджено кількісний вміст флавоноїдів, амінокислот і відновлюючих моносахаридів у рідкому й густому екстрактах. Кореляція вмісту основних груп БАР для рідкого і густого екстракту свідчать про коректність вибраних умов переведення рідкого екстракту в густий. При стандартизації екстрактів кількісним показником якості запропоновано вміст флавоноїдів з наступними критеріями: для рідкого екстракту – не менше 0,03 %, для густого – не менше 2,5 % у перерахунку на апігенін.