

О. О. Михайленко¹, А. Г. Котов², Е. Е. Котова², **Л. М. Сіра¹**,
В. М. Ковальов¹, В. А. Георгіянци¹

¹ Національний фармацевтичний університет Міністерства охорони здоров'я України, Україна, 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53. E-mail: mykhailenko.farm@gmail.com

² Державне підприємство «Державний науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», Україна

Розробка методик стандартизації приймочок крокусу посівного (шафран) для внесення у проєкт монографії Державної фармакопеї України

Крокус посівний (*Crocus sativus* L.) з родини Ірисові (*Iridaceae*) – лікарська та харчова рослина, яку нещодавно почали активно культивувати в Україні. Спеція «шафран» – це є приймочки з квітки крокусу, які проявляють широкий спектр фармакологічної активності завдяки своїм трьом основним біоактивним сполукам: кроцину, пікрокроцину та шафраналю. Якість цієї сировини регламентується різними нормативними документами, проте в Державній фармакопеї України (ДФУ) така стаття відсутня.

Мета. Провести порівняльний аналіз монографії «Saffron for homeopathic preparations» з European Pharmacopoeia (ЄФ) 9.0, «Safran. *Crocus stigma*» з Deutscher arzneimittel codex (DAC) та «Spices – Saffron (*Crocus sativus* L.)» з ISO 3632 за показниками: опис, ідентифікація (мікроскопія та ТШХ), сторонні домішки, втрата в масі під час висушування, зола та кількісне визначення кроцину, пікрокроцину та шафраналю методом УФ-Вид-спектрофотометрії для з'ясування можливості гармонізації вимог національної законодавчої бази на приймочки крокусу з ЄФ, DAC та ISO. Результати аналізу будуть враховані для розробки монографії національної частини ДФУ «Крокусу посівного (шафран) приймочки».

Результати та їх обговорення. Проаналізовано показники якості приймочок крокусу та їх нормування, що визначено монографією ЄФ 9.0, DAC та ISO 3632 на досліджувану сировину, виявлено певні відмінності щодо регламентованих показників якості сировини. Результати власних досліджень засвідчили, що зразки приймочок українського крокусу (шафран) відповідають усім зазначеним вимогам. Наведено результати макро- та мікроскопічного дослідження сировини; хроматографічне дослідження проведено відповідно до ЄФ 9.0 та DAC із використанням кроцину як стандартної речовини; кількісне визначення кроцину, пікрокроцину та шафраналю у 8 зразках приймочок крокусу проведено методом УФ-Вид-спектрофотометрії відповідно до ISO 3632. Запропоновано ввести такі значення питомого показника поглинання: для кроцину ($C_{44}H_{64}O_{24}$; М.м. 976,70) – не менше 180, для шафраналю ($C_{10}H_{14}O$; М.м. 150,22) – не менше 30, для пікрокроцину ($C_{16}H_{26}O_7$; М.м. 330,37) – не менше 60, у перерахунку на суху сировину.

Експериментальна частина. Для аналізу використовували висушені приймочки крокусу посівного (шафран), заготовлені у смт Любимівка, Херсонська обл., Україна (2016–2018), а також комерційні зразки шафрану з Марокко, Азербайджану, Іспанії. Проведено аналіз провідних НТД, що містять статті «Крокусу приймочки», серед них ЄФ 9.0, DAC та ISO 3632. Проводили дослідження: опис зовнішнього вигляду цілих приймочок крокусу; втрата в масі під час висушування та масова частка летких сполук (105 °С, 16 год); масова частка загальної золи; вимірювання кількості пікрокроцину, шафраналю та кроцину проводили шляхом прямого зчитування поглинання 1% водного розчину приймочок за 257 нм, 330 нм та 440 нм, відповідно, за допомогою УФ-Вид-спектрофотометра.

Висновки. Проведено аналіз вимог до якості ЛРС – приймочок крокусу посівного за двома монографіями: ЄФ 9.0 «Saffron for homeopathic preparations», «Safran. *Crocus stigma*» з Deutscher arzneimittel codex та міжнародним стандартом якості ISO 3632 «Spices – Saffron (*Crocus sativus* L.)». Визначено основні критерії стандартизації приймочок крокусу. Запропоновано внести монографію до національної частини ДФУ «Крокусу посівного приймочки (шафран)» за такими вимогами: ідентифікація (макро- та мікроскопічні ознаки; тонкошарова хроматографія (кроцин); кількісне визначення (вміст кроцину, пікрокроцину, шафраналю), адаптоване до ISO 3632, яке проводиться методом УФ-Вид-спектрофотометрії; сторонні домішки; втрата в масі під час висушування; загальна зола.

Ключові слова: стандартизація; Державна фармакопея України; крокусу посівного приймочки; шафран; кроцини

О. О. Mykhailenko¹, А. Г. Kotov², Е. Е. Kotova², **L. M. Sira¹**,
V. M. Kovalyov¹, V. A. Georgiants¹

¹ National University of Pharmacy of the Ministry of Health of Ukraine, Ukraine

² State Enterprise "Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Centre for Quality of Medicinal Products", Ukraine

Development of methods for standardization of *Crocus sativus* (saffron) stigmas for inclusion in the draft monograph of the State Pharmacopoeia of Ukraine

Crocus sativus L. from the Iridaceae family is a medicinal and edible plant that has recently been actively cultivated in Ukraine. Saffron spice is crocus flower stigmas exhibiting a wide range of the pharmacological activity due to its three main bioactive compounds: crocin, picrocrocic and safranal. The quality of this raw material is regulated by various normative documents, but there is no monograph in the State Pharmacopoeia of Ukraine (SPHU).

Aim. To perform a comparative analysis of the monograph “Saffron for homeopathic preparations” from the Ph. Eur. 9.0, “Saffron. Croci stigma” from the Deutscher arzneimittel codex (DAC) and “Spices – Saffron (*Crocus sativus* L.)” from the ISO 3632 by the following indicators: description, identification (microscopy and TLC), impurities, loss on drying, total ash and quantification of crocin, picrocrocin and safranal by UV-Vis-spectrophotometry to clarify the possibility of harmonizing the requirements of the national legal framework for *Crocus* stigmas with the Ph. Eur. 9.0, DAC and ISO 3632. The results of the analysis will be taken into account in the development of the monograph of the national part of the SPhU “*Crocus* stigmas (saffron)”.

Results and discussion. The quality indicators of *Crocus* stigmas and their standardization determined by the monograph in the Ph. Eur. 9.0, DAC and ISO 3632 on the raw material studied have been analyzed; some differences in the regulated quality indicators of the raw material have been found. The results of our own research have shown that the samples of the Ukrainian *Crocus* (saffron) meet all these requirements. The results of the macro- and microscopic examination of the raw material are given. The chromatographic examination has been performed in accordance with the Ph. Eur. 9.0 and DAC using crocin as a standard compound; the quantitative determination of crocin, picrocrocin and safranal in 8 samples of *Crocus* stigmas has been performed by UV-Vis-spectrophotometry in accordance with the ISO 3632. It has been proposed to introduce the following indicators to determine the specific absorption rate: for crocin ($C_{44}H_{64}O_{24}$; Mw – 976.70) not less than 180, for safranal ($C_{10}H_{14}O$; Mw – 150.22) – not less than 30, for picrocrocin ($C_{16}H_{26}O_7$; Mw – 330.37) – not less than 60 calculated with reference to the dried raw material.

Experimental part. For analysis the dried stigmas of *Crocus sativus* (saffron) collected in the village Lyubimivka, Kherson region, Ukraine (2016-2018), as well as commercial samples of saffron from Morocco, Azerbaijan, Spain were used. The analysis of the leading normative documents containing monographs “*Crocus* stigmas”, among them the Eur. Ph. 9.0, DAC and ISO 3632, was performed. The studies included description of the appearance of the whole *Crocus* stigmas; loss on drying and the mass fraction of volatile compounds (105°C, 16 h); the mass fraction of total ash. The amount of picrocrocin, safranal and crocin was measured by direct reading of the absorption of 1% aqueous solution of stigmas at 257 nm, 330 nm and 440 nm, respectively, using a UV-Vis-spectrophotometer.

Conclusions. The analysis of the requirements to quality of the medicinal raw material – stigmas of *Crocus sativus* – has been performed based on the monographs: “Saffron for homeopathic preparations” from the Ph. Eur. 9.0, “Saffron. Croci stigma” from the Deutscher arzneimittel codex and “Spices – Saffron (*Crocus sativus* L.)” from the ISO 3632. The main criteria for standardization of the raw material have been determined. It has been proposed to introduce the monograph to the national part of the SPhU “*Crocus* stigmas (saffron)” according to the following requirements: identification (macro- and microscopic signs; thin-layer chromatography (crocin)); the quantitative determination (the content of crocin, picrocrocin and safranal) adapted to the ISO 3632, performed by UV-Vis-spectrophotometry; impurities; loss on drying; total ash.

Key words: standardization; State Pharmacopoeia of Ukraine; *Crocus sativus* stigma; saffron; crocin

Copyright © 2021, O. O. Mykhailenko, A. G. Kotov, E. E. Kotova, L. M. Sira, V. M. Kovalyov, V. A. Georgiants
This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>)

Crocus L. є одним із родів родини Ірисові (*Iridaceae*), що налічує близько 80 видів [1]. Найбільш дослідженим, розповсюдженим та введеним у культуру є *Crocus sativus* L. (крокус посівний), прийомки якого широко використовують у харчовій промисловості як барвну та ароматизувальну спецію. 2015 року почалось масове культивування шафрану у Херсонській області України [2].

Наразі тривають дослідження шафрану з метою з'ясування можливості його використання як компонента протиракових, протизапальних та антидепресантних лікарських засобів [3]. Шафран використовують у китайській медицині для лікування меланхолії, депресії, шоку та порушень менструального циклу [4]; як адаптоген в індійській аюрведичній медицині [5]; у гомеопатії застосовують у випадках судомного кашлю, спастичних явищ у дітей [3, 4]. Приймочки крокусу посівного містять кілька характерних вторинних метаболітів, зокрема каротиноїди кроцетин та кроцин, а також монотерпеноїдний глікозид пікрокроцин та шафраналь (рис. 1) [1–3]. Крім того, виявлено наявність різних фенольних сполук, терпеноїдів, амінокислот, вітамінів [3, 6], які зумовлюють фармакологічну активність рослинної сировини. На світовому ринку наявні різні види додаткового хар-

чування на основі шафрану, серед них: «Affron»[®] Saffron Extract (Pharmactive, Canada) [7]; «Dry saffron extract «Saffron'Extr»[®] (Eusano, France, Germany) [8]; «Saffr'Activ»[®] (Green Plants Extracts, Australia) [9] та інші.

Аналіз сучасного стану науково-технічної документації (НТД) на цей вид лікарської рослинної сировини (ЛРС) засвідчив, що монографії на прийомки крокусу посівного (шафран) є у всіх провідних фармакопєях світу: Європейська Фармакопєя (ЄФ) 9.0 “Saffron for homeopathic preparations. Croci stigma ad praeparationes homoeopathicas”, 2014 [10]; Британська Фармакопєя “Saffron for Homoeopathic Preparations”, 2009 [11]; Німецька Фармакопєя “Crocus. Safran”, 2003 [12]; Deutscher arzneimittel codex (DAC) “Safran. Croci stigma”, 1999 [13]; Аюрведична Фармакопєя Індії, “Kumkuma (Style and stigma)”, 2015 [14]; Тайваньська Фармакопєя 2nd Ed. «Crocus stigma», 2016 [15]; Японська Фармакопєя 17nd Ed. «Crude Drugs Saffron», 2016 [16]; Китайська Фармакопєя “Stigma Croci. Xihonghua”, 2005 [17]; міжнародний стандарт ISO 3632 Spices – Saffron (*Crocus sativus* L.), Geneva, Switzerland, 2010/2011 [18–19]; FDA PART 73 – Listing of color additives exempt from certification Subpart A – Foods. Sec. 73.500 Saffron [20]; ГОСТ 21722-84 «Шафран, технические

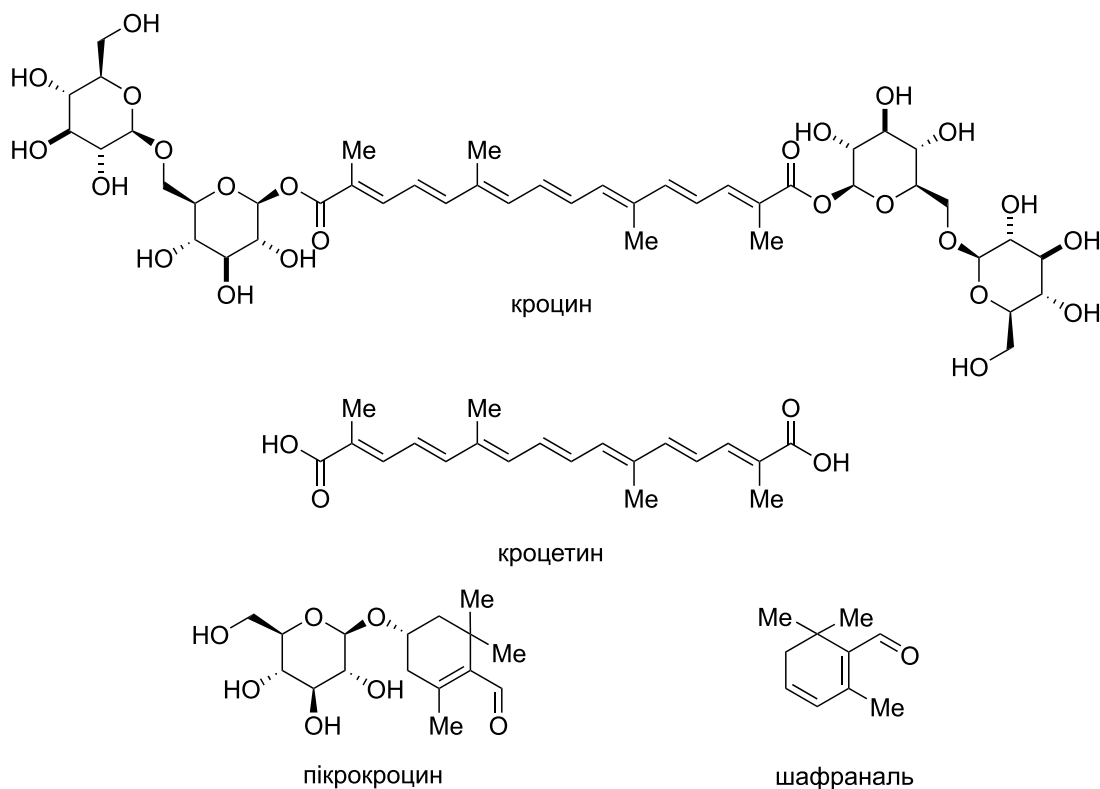


Рис. 1. Структурні формули основних біологічно активних речовин приймочок крокусу посівного: кроцин, кроцетин, пікрокроцин та шафраналь

условия», Москва, РФ, 2011 [21]; Doc. No. FAD 9(2516)C Draft Indian Standard Spices — Saffron (*Crocus sativus* L.), 2010/2011 [22]; National Iranian Standards 259-1: Saffron – specifications and 259-2: Saffron-test methods, 1996 [23]. Проте варто зауважити, що всі НТД регламентують використання шафрану по-різному – як гомеопатичний лікарський засіб, як лікарську рослинну сировину чи як харчовий засіб.

Отже, на сьогодні існує широкий спектр підходів до стандартизації шафрану, зумовлений вмістом основних біологічно активних речовин (БАР), а тому розробка єдиних методик стандартизації як сировини, так і препаратів на її основі є актуальною. Для верифікації методик показників якості шафрану було обрано монографії ЄФ 9.0, DAC та ISO 3632 для розробки проектів монографій на рослинну сировину приймочок крокусу посівного. З огляду на те, що досліджувану сировину описано в ЄФ 9.0, DAC та інших НТД, але не описано в Державній фармакопеї України (ДФУ), метою роботи було проведення аналізу методик якісного та кількісного визначення БАР приймочок крокусу з урахуванням вимог ДФУ для розробки монографії національної частини «Крокусу посівного (шафран) приймочки».

Експериментальна частина

Для проведення дослідження було взято 8 серій приймочок шафрану: зразки серій №1–5 заготовлено у смт Любимівка, Херсонська обл., Україна

(у жовтні 2016–2018), зразки серій №6–8 придбано у відомих світових виробників шафрану – Марокко (м. Таліоуїн), 2017 р.; Азербайджан (м. Абшерон), 2017 р.; Іспанія (м. Ла-Манш), 2017 р. (зразки не фальсифіковані, куплені у відомих фермерів).

Проведено аналіз вимог до якості приймочок крокусу посівного за двома монографіями: «Saffron for homeopathic preparations» з ЄФ 9.0, «Safran. *Crocus stigma*» з DAC та міжнародним стандартом якості ISO 3632 «Spices – Saffron (*Crocus sativus* L.)», що було обрано за основу для розробки та впровадження монографії «Крокусу посівного (шафран) приймочки» до ДФУ.

Морфолого-анатомічне дослідження. Препарати з цілих та подрібнених сухих приймочок крокусу готували шляхом фіксування сировини у суміші спирт-гліцерин-вода (1:1:1). Як проявлювальний розчин використовували воду дистильовану, розчин хлоралгідрату Р (80 г/100 мл води) та розчин 50% (об/об) гліцерину Р [24]. Реактив на крохмаль – розчин Люголя. Морфологічні та анатомічні діагностичні ознаки вивчали й описували за загальноприйнятими методами і вимогами ДФУ [25], використовували мікроскоп РВ-2610 (збільшення 15x10, 15x40) і фотокамеру Samsung PL50.

Тонкошарова хроматографія. Для аналізу використовували методику ідентифікації кроцинів, що наведено у ЄФ 9.0 за статтею «Ідентифікація С» [10]: для приготування випробуваного розчину брали наважку сировини 0,01 г, обережно

розтирали у ступі товчачиком перед випробуванням та додавали 0,05 мл води Р. Через 3 хв додавали 1 мл метанолу Р, витримували впродовж 20 хв у захищеному від світла місці та фільтрували. Хроматографування проводили на пластинках Merck 60 F₂₅₄, у системі розчинників вода Р – 2-пропанол Р – етилацетат Р (10:25:65). Як розчин порівняння використовували 5,0 мг нафтолу жовтого S R та 5 мг судану червоного G R, що розчиняли у 5 мл метанолу Р. Отримані хроматограми висушували на повітрі, після чого переглядали за денного світла (виявлення А), потім переглядали пластинки в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм (виявлення В). Виявлення С: пластинку обприскували анісового альдегіду розчином Р, нагрівали за температури 100–105°C протягом 5–10 хв і переглядали за денного світла.

Кількісне визначення. Для дослідження використано методику вимірювання оптичного поглинання випробовуваного водного розчину приймочок крокусу за 440 нм з ЄФ 9.0 відповідно до статті «Випробування. Інтенсивність забарвлення» [10] та методику ISO 3632 [19] оцінки вмісту пікрокроцину, шафраналю та кроцину відповідно до статті «Визначення основних характеристик методом УФ-Вид-спектроскопії» у водному розчині приймочок крокусу. Визначення пікрокроцину, шафраналю та кроцинів ($A_{1\text{ см}}^{1\%}(\lambda_{\text{max}})$) для кожного зразка розраховували за формулою:

$$A_{1\text{ см}}^{1\%}(\lambda_{\text{max}}) = \frac{(A \times 10000)}{m \times (100 - W)},$$

де: А – оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 257 нм для пікрокроцину, 330 нм для шафраналю, 440 нм для кроцину; 10000 – повне розведення витягу, m – маса наважки випробовуваної сировини, г; W – втрата в масі під час висушування випробовуваної сировини, %. Екстракти аналізували за допомогою спектрофотометра Evolution 60S UV-Visible Spectrophotometer (США). Статистичне оброблення даних проводили відповідно до вимог ДФУ, 1-е вид., доп. 1, п. 5.3, використовуючи програмне забезпечення Microsoft Office Excel 7.0 [25].

Результати та їх обговорення

Для здійснення поставленого завдання у Херсонській області у 2016–2018 рр. було заготовлено зразки приймочок крокусу посівного. На момент виконання дослідження в інших регіонах України цю рослину не вирощували, тому для порівняння якості шафрану українського походження до аналізу було залучено зразки приймочок, заготовлені в Марокко, Азербайджані та Іспанії, де виробництво шафрану існує декілька століть.

У монографії ЄФ 9.0. наведено критерії стандартизації приймочок крокусу, що запропоновано

використовувати як гомеопатичний засіб. Водночас у DAC наведено монографію «Safran. Croci stigma» саме на лікарську рослину сировину, а настанова Міжнародної організації зі стандартів ISO 3632 «Spices – Saffron (*Crocus sativus* L.)» регламентує процедури визначення якості приймочок для харчової промисловості. Тому для обґрунтування розробки та впровадження проекту монографії до національної частини ДФУ «Крокусу посівного (шафран) приймочки» саме як лікарської рослини сировини для порівняння методів визначення якості було обрано названі нормативні документи.

Досліджуючи критерії стандартизації та регламентації показників якості, наведені у зазначених вище документах, виявили певні розбіжності, що при цьому суттєво доповнюють одна одну. У таблиці 1 наведено результати аналізу досліджуваних зразків українського шафрану та порівняння вимог, що висуваються до сировини приймочок крокусу у ЄФ 9.0, DAC та ISO 3632: ідентифікація А та В (макро- та мікроскопія сировини); ідентифікація С (ТШХ), а також випробування (сторонні домішки; сторонні барвники, ТШХ, втрата в масі під час висушування; загальна зола та кількісне визначення).

Ідентифікація А. Макроскопія. Під час проведення макроскопічних досліджень серій приймочок крокусу було з'ясовано, що досліджувана сировина відповідає вимогам монографій ЄФ 9.0, DAC та ISO 3632.

Ідентифікація В. Мікроскопія. Дослідження проводять для подрібненої сировини. У ході мікроскопічних досліджень у всіх зразках виявлено діагностичні анатомічні структури, характерні для приймочок крокусу посівного (рис. 2, таблиця 1).

Ідентифікація С. Тонкошарова хроматографія. Ідентифікацію кроцинів у сировині проводили методом ТШХ відповідно до вимог DAC та ЄФ. На рис. 3 наведено послідовність зон на хроматограмах випробовуваного розчину приймочок крокусу та розчину порівняння. За денного світла (виявлення А) на хроматограмі розчину порівняння зверху виявляється червона зона судану червоного G, у нижній третині виявляється жовта зона нафтолу жовтого S. На хроматограмі випробовуваного розчину в нижній третині нижче стандарту проявляється одна жовта зона та вище неї – дві жовті зони. У середній третині може бути видно до двох блідо-жовтих зон. Зона з найменшим значенням R_f (кроцин) має найбільшу інтенсивність, що перевищує інтенсивність зони нафтолу жовтого S. На хроматографі випробовуваного розчину (виявлення В) видно темну зону в переході від нижньої до середньої третини та у верхній третині. За виявлення С на хроматограмі випробовуваного розчину в нижній половині проявляється синьо-зелена зона (кроцин), над нею – дві синьо-зелені

Таблиця 1

Результати дослідження приймочок крокусу посівного на відповідність вимогам ЄФ 9.0, DAC та ISO 3632

Показник	Вимоги ЄФ 9.0	Вимоги DAC	Вимоги ISO 3632*	Отримані результати, що рекомендовано впровадити у монографію
1	2	3	4	5
Ідентифікація А. Макроскопія	Наявність діагностичних елементів	Наявність діагностичних елементів	Наявність діагностичних елементів	Цілі сухі червоно-бурі приймочки зі стовпчиками завдовжки 15–40 мм. Стовпчики зрослі, утворюють нитку (ніжку), у якій вирізняється біла основа і блідо-жовта трубка. Трубка стовпчиків поступово доверху дещо стовщується, розгалужується певною мірою і несе 3 вільних, червоно-оранжевих вузько-лійкоподібних приймочки завдовжки до 5 мм з хвилястим, нерівномірно-зубчастим краєм
Ідентифікація В. Мікроскопія	Наявність діагностичних елементів	Наявність діагностичних елементів	Наявність діагностичних елементів	Клітини епідерми із злегка звивистими бічними стінками і невеличкими сосочкуватими виростами зовнішньої оболонки (рис. 1, a); по краю з видовженими сосочкоподібними виростами (б). Пилкові зерна відокремлені (в), жовті, симетричні, монадні, кулясті, сфероїдальні чи сплюснено-сфероїдальні діаметром 80–100 мкм, з дрібнозернистою екзину. Пігментовані клітини епідерми і паренхіми приймочок (г) містять водорозчинний вміст (кרוцини). Провідні пучки містять вузькі судини зі спіральними потовщеньнями (д). Крохмальні зерна прості, кулясті або овальні (е)
Втрата в масі під час висушування, %	Не більше 10,0% (до постійної маси)	Не більше 12,0% (105°C, 2 год)	Не більше 12,0% (105°C, 16 год)	Не більше 12,0%; 0,200 г сировини перед випробуванням перемелюють у ступці, сушать за 105°C протягом 2 год
Масова частка загальної золи, %	Не більше 7,0%	Не більше 7,0%	Не більше 8,0%	Не більше 7,0%
Масова частка золи, що нерозчинна в 10% хлоридній кислоті, %	Стаття відсутня	Стаття відсутня	Не більше 1,0% – категорія I та II*; не більше 1,5% – категорія III, IV	Не застосовувати. Зола, нерозчинна у хлористоводневій кислоті, складається в основному з оксиду кремнію і характеризує забрудненість сировини сторонніми мінеральними домішками. Спосіб оброблення приймочок [26] виключає їх потрапляння
Визначення вмісту квіткових відходів	Стаття відсутня	Стаття відсутня	Не більше 0,5% – категорія I; не більше 3% – категорія II; не більше 5% – категорія III, IV	Об'єднати у статтю «Сторонні домішки»
Масова частка подрібнених приймочок, що проходять крізь сито з отворами 500 мкм (0,5 мм)	Стаття відсутня	Стаття відсутня	Не більше 6,0%	Об'єднати у статтю «Сторонні домішки»

Продовження таблиці 1

1	2	3	4	5
Масова частка сторонніх домішок рослинного та нерослинного походження	Мають бути відсутні повністю	Не більше 7,0%	Не більше 0,1 та 0,5% – категорія I, II; не більше 1,0 та 2,0% – категорія III, IV	Не більше 1%, при цьому стовпчиків допускається не більше 10,0% від загальної маси сировини, крім того, мають бути відсутні тичинки сафлору, квітки календули, чорнобривців, штучно пофарбовані кукурудзяні волокна. Мають бути відсутні анілінові барвники
Розчинність сировини у холодної воді, %	Стаття відсутня	Стаття відсутня	Не менше 65%	Не застосовувати. Зазначена вимога є лише для харчового засобу, що визначає ступіть розчинності, для ЛРС значення має вміст БАР
Чистота (якісні реакції)	Стаття відсутня	На хр-мі розчину ніяких жовтих, помаранчевих чи червоних зон не повинно бути, окрім зазначених у статті	Стаття відсутня	На хроматограмі випробовуваного розчину, отриманого в розділі <i>Ідентифікація С</i> , ніяких жовтих, помаранчевих чи червоних зон не повинно бути видно за денного світла, окрім зон кроцину. Може бути блідо-жовта зона між лінією старту та зоною з найменшим значенням R_f . Цей залишок («хвіст») не враховується під час оцінювання
Ідентифікація С (ТШХ/ якісні реакції/ВЕРХ)	R_f (кроцин), забарвлення/денне світло/УФ 254 та 365 нм/обробка анісовим альдегідом. Стандарт: нафтол жовтий+судан червоний. Вода-2-пропанол-етилцетат (10:25:65)	R_f (кроцин), забарвлення / денне світло/УФ 254 нм. Стандарт: нафтол жовтий. Вода-2-пропанол-етилцетат (10:25:65)	ТШХ та/або ВЕРХ: штучні барвники мають бути відсутні	Послідовність зон на хроматограмах розчину порівняння та інші зони подано на рис. 2.
Визначення інтенсивності забарвлення	Значення оптичної густини має становити не менше 0,44 (кроцини λ_{\max} 440 нм)	Водний роз-н шафрану має бути забарвленим не менше, ніж розчин калій дихромату (0,5 г/л)	Значення оптичної густини має становити не менше 0,20 (кроцини λ_{\max} 440 нм)	Наявність відповідного забарвлення випробовуваного розчину відповідно до вимог ДАС
Кількісне визначення	Стаття відсутня	Стаття відсутня	S_{\max} (вміст пікрокроцинів λ_{\max} 257 нм) \max/\min 70 – 30; <i>аромат</i> (вміст шафранало λ_{\max} 330 нм) \max/\min 50 – 20; <i>забарвлення</i> (вміст кроцинів λ_{\max} 440 нм) \max/\min 190 – 80	Кількісне визначення. Інтенсивність забарвлення, гіркоти, аромату за вимогами ISO 3632 (рис. 4). За визначенням питомого показника поглинання: для кроцину ($C_{44}H_{64}O_{24}$; М.м. 976,70) – не менше 180, для шафранало ($C_{10}H_{14}O$; М.м. 150,22) – не менше 30, для пікрокроцину ($C_{16}H_{26}O_7$; М.м. 330,37) – не менше 60, у перерахунку на суху сировину

* Якість шафрану оцінюють від I до IV категорії, з яких I – III найкращі і IV найбідніші.

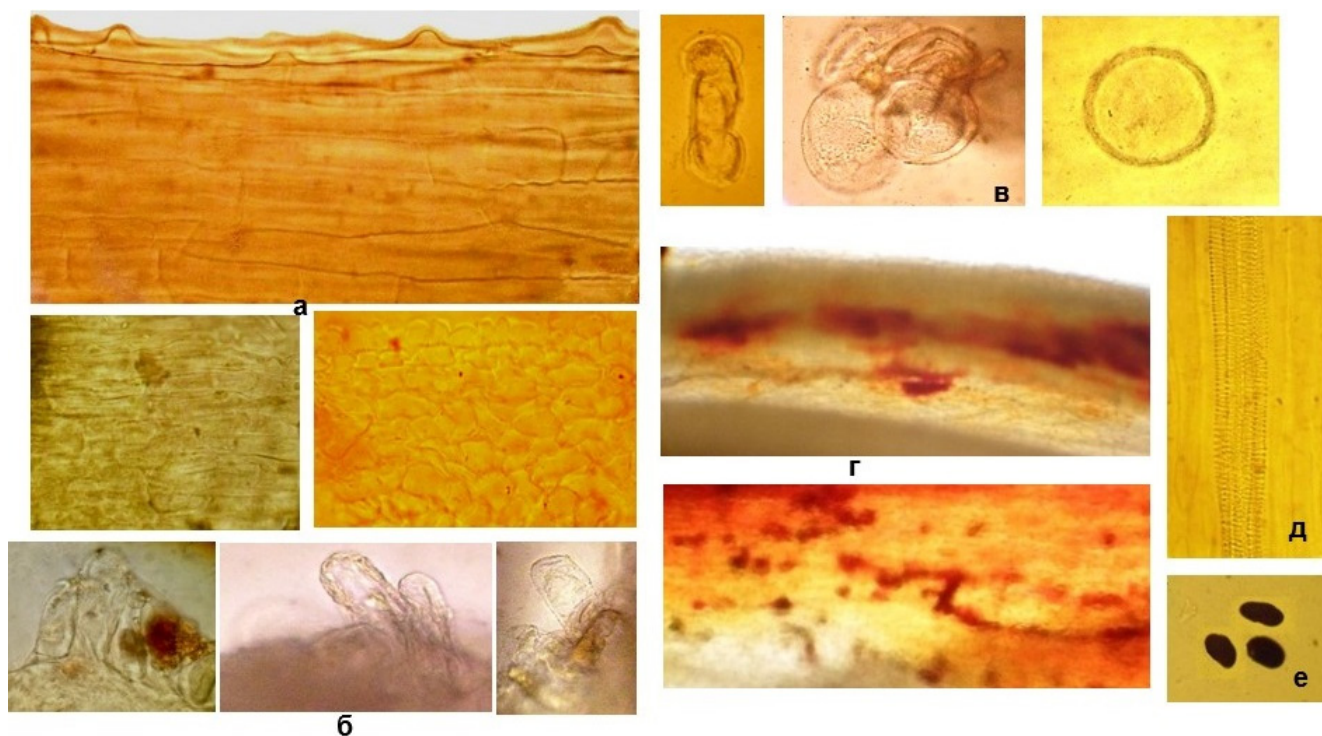


Рис. 2. Анатомо-діагностичні ознаки цілих приймочок шафрану, де: **а** – епідерма поверхні приймочок з сосочками; **б** – край приймочки з сосочкоподібними й пальчастими виростами; **в** – пилкові зерна; **г** – пігментовані клітини епідерми і паренхіми приймочок; **д** – спіральні судини ксилеми стовпчика і приймочки; **е** – крохмальні зерна (після дії розчину Люголя)

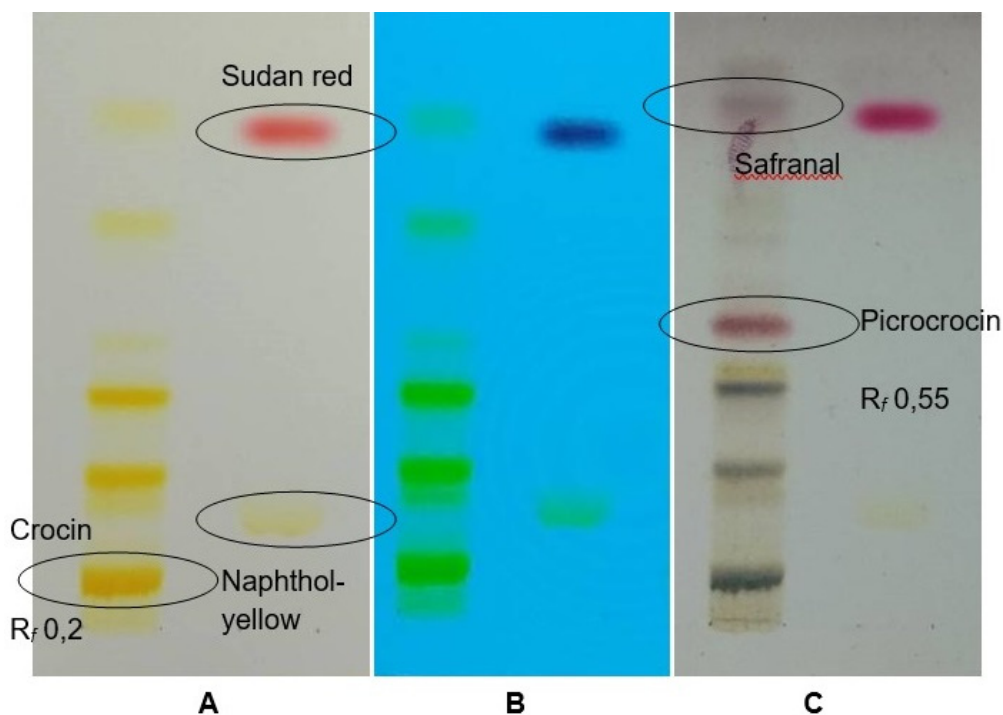


Рис. 3. Хроматограми випробовуваних розчинів приймочок крокусу посівного (шафран): **А** – переглядають за денного світла; **В** – в УФ-світлі за 254 нм; **С** – після обприскування розчином анісового альдегіду і за денного світла після нагрівання за 100–105 °С протягом 5–10 хв

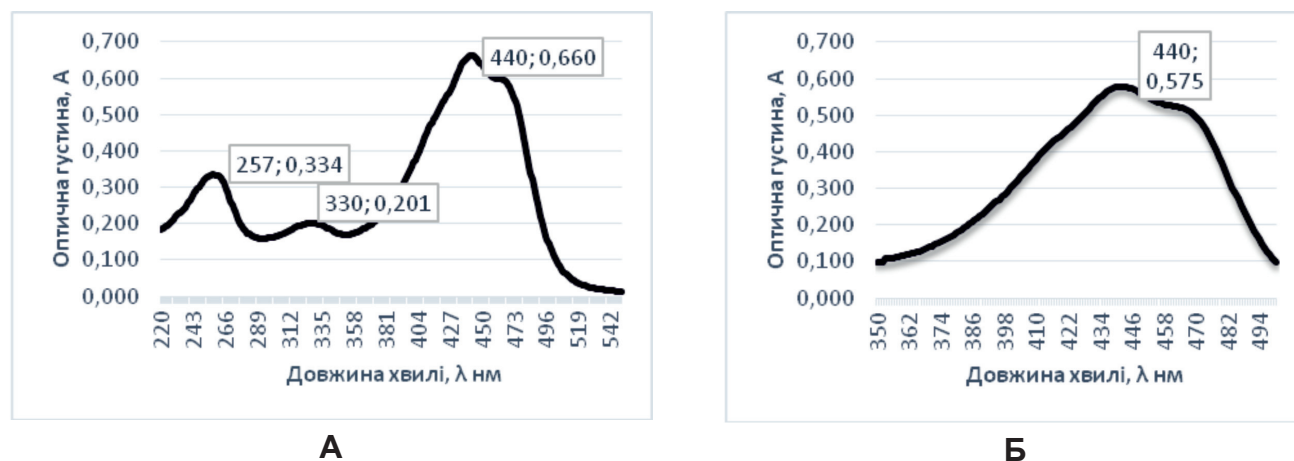


Рис. 4. Типові УФ-спектри поглинання випробовуваних розчинів приймочок крокусу посівного: **А** – отриманий в умовах методики ISO 3632; **Б** – отриманий в умовах методики ЄФ 9.0

Таблиця 2

Результати визначення кількісного вмісту пікрокроцину, шафраналю та кроцинів у розчинах приймочок крокусу посівного відповідно до методики ISO 3632, ($x \pm \Delta x$), $P = 0,95$; $\mu = 5$

Номер серії	$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 257 нм Пікрокроцин (смак)	$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 330 нм Шафраналь (аромат)	$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 440 нм Кроцини (колір)
№1	73,63 ± 1,30	43,54 ± 0,77	158,66 ± 2,79
№2	69,04 ± 1,21	35,38 ± 0,62	153,29 ± 2,70
№3	81,23 ± 1,43	31,72 ± 0,56	221,04 ± 3,89
№4	87,81 ± 1,54	35,38 ± 0,62	245,52 ± 4,31
№5	90,40 ± 1,59	37,76 ± 0,66	248,11 ± 4,36
№6	94,15 ± 1,66	36,96 ± 0,65	208,52 ± 3,67
№7	57,62 ± 1,01	38,48 ± 0,66	49,30 ± 0,87
№8	77,74 ± 1,37	55,52 ± 0,98	133,03 ± 2,34

зони, над ними – зона від червоного до червоно-фіолетового кольору і у верхній половині – одна або дві блідо-червоно-фіолетові зони. На хроматограмі розчину порівняння у верхній частині виявляється малиново-червона зона судану червоного G, а під нею – жовта зона нафтолу жовтого S. Варто зауважити, що екстракти шафрану дуже добре розділяються, зони мають характерну жовту флуоресценцію, з чітким визначенням R_f . Зони стандартів порівняння розташовані дуже високо (див. зразки хроматограм), навіть не на рівні з визначуваною речовиною – кроцином (R_f 0,15–0,25) та пікрокроцином (R_f 0,55).

Кількісне визначення. У роботі використано дві методики для порівняння результатів. У ЄФ 9.0 проводять визначення оптичної густини (інтенсивності забарвлення) водного витягу приймочок крокусу методом УФ-Вид-спектрофотометрії за 440 нм у перерахунку на кроцини. Відповідно

до методики ISO 3632, кількісне визначення пікрокроцину, кроцинів та шафраналю, виражених як поглинання 1% водного розчину приймочок за 257 нм, 330 нм та 440 нм відповідно, проводять тим же методом. Порівняння запропонованих методик засвідчило, що тільки у ISO 3632 наведено визначення питомого показника поглинання для кроцинів за довжини хвилі 440 нм (інтенсивність забарвлення), для шафраналю за довжини хвилі 330 нм (аромат), для пікрокроцину за довжини хвилі 257 нм (гіркота), за якими визначають кількісний вміст компонентів; у ЄФ визначають лише показник поглинання кроцинів за 440 нм, що має становити не менше 0,44, при цьому не обчислюють кількісний вміст речовини. У DAC відповідна стаття відсутня зовсім. На рис. 4 (А та Б) наведено типові УФ-спектри випробуваного розчину шафрану відповідно до методик ISO 3632 та ЄФ 9.0.

Оптимальним є використання методики кількісного визначення основних сполук за допомогою спектрофотометричного аналізу відповідно до ISO 3632, де пікрокроцин, шафраналь та кроцини виражають смак або гіркоту, аромат та забарвлення відповідно. Ці значення визначають як пряме зчитування поглинання 1% водного розчину висушених приймочок за 257, 330 та 440 нм у кварцевій кюветі з товщиною шару 1 см (табл. 2).

У результаті для розробки (у національну частину монографії) методики кількісного визначення біологічно активних речовин запропоновано визначати вміст пікрокроцину, шафраналю та кроцину за методикою ISO 3632: вимірювання проводять методом адсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій і видимій областях. За результатами досліджень визначено відповідні значення питомого показника поглинання: для кроцину – не менше 180, для шафраналю – не менше 30, для пікрокроцину – не менше 60, у перерахунку на суху сировину. Обрані речовини впли-

вають як на якість сировини, так і на фармакологічну дію ЛРС.

Висновки

Проведено аналіз вимог до якості ЛРС – приймочок крокусу посівного за двома монографіями: «Saffron for homeopathic preparations» з ЄФ 9.0, «Safran. *Croci stigma*» з ДАС та міжнародним стандартом якості ISO 3632 «Spices – Saffron (*Crocus sativus* L.)». Визначено основні критерії стандартизації приймочок крокусу. Запропоновано внести монографію до національної частини ДФУ «Крокусу посівного приймочки (шафран)» за такими вимогами: ідентифікація (макро- та мікроскопічні ознаки); тонкошарова хроматографія (кроцин); кількісне визначення (вміст кроцину, пікрокроцину, шафраналю), адаптоване до ISO 3632, яке проводять методом УФ-Вид-спектрофотометрії; сторонні домішки; втрата в масі під час висушування; загальна зола.

Конфлікт інтересів: відсутній.

References

- Ahrazem, O.; Rubio-Moraga, A.; Nebauer, S.G.; Molina, R.V.; Gómez-Gómez, L. Saffron: Its phytochemistry, developmental processes, and biotechnological prospects. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **2015**, *63*, 8751–8764. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03194>.
- Михайленко, О. О.; Ковальов, В. М.; Кречун, А. В. *Оптимальні умови вирощування харчової та лікарської рослинної сировини приймочок шафрану (*Crocus sativus* L.) в Україні*; Інформаційний лист № 376-2018. Укрмедпатентінформ МОЗ України: Київ, 2018; Випуск 49 з проблеми «Фармація».
- Mykhailenko, O.; Kovalyov, V.; Goryacha, O.; Ivanauskas, L.; Georgiyants, V. Biologically active compounds and pharmacological activities of species of the genus *Crocus*: A review. *Phytochemistry* **2019**, *162*, 56–89. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.02.004>.
- Cardone, L.; Castronuovo, D.; Perniola, M.; Cicco, N.; Candido, V. Saffron (*Crocus sativus* L.), the king of spices: An overview. *Scientia Horticulturae* **2020**, *272*, 109560–109563. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.1095605>.
- Khare, C. P. *Indian Medicinal Plants*. Springer-Verlag: New York, 2007.
- Gohari, A. R.; Saeidnia, S.; Mahmoodabadi, M. K. An overview on Saffron, Phytochemicals, and Medicinal Properties. *Pharmacognosy Review* **2013**, *7* (13), 61–66. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.112850>.
- Kell, G.; Rao, A.; Beccaria, G.; Clayton, P.; Inarejos-García, A.M.; Prodanov, M. Affron® a novel saffron extract (*Crocus sativus* L.) improves mood in healthy adults over 4 weeks in a double-blind, parallel, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Complementary Therapies in Medicine* **2017**, *33*, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2017.06.001>.
- Eusano GmbH & Co. KG. Saffron extract. <http://www.eusano.com/botanical-raw-materials-and-extracts/saffron-crocus-sativus/35-saffron-extract> (accessed Dec 11, 2020).
- SaffrActiv®. <http://www.saffractiv.com/> (accessed Nov 25, 2020).
- European Pharmacopoeia*, 9th Ed.; European Department for the Quality of Medicines: Strasbourg, 2014; Vol. 1, p. 1694.
- Materials for use in the Manufacture of Homeopathic Preparations; "Saffron for Homeopathic Preparations". *British Pharmacopoeia*; Crown: London, 2009; Vol. III, p 7603.
- Crocus. Safran. German Homeopathic Pharmacopoeia*; CRC Press, 2003; Vol. 1, p 547.
- Deutscher Arzneimittel-Codex/Neues Rezeptur-Formularium (DAC/NRF). Ergänzungsbuch zum Arzneibuch, Bundesvereinigung Deutscher Apothekerverbände (ABDA)*; Govi-Verlag, 2016.
- Kumkuma (Style and stigma). *Ayurvedic Pharmacopoeia of India*; CreateSpace Independent Publishing Platform, 2015; Part I, Vol. IV, p 59.
- Croci stigma. Taiwan Herbal Pharmacopoeia*, 2nd Ed.; English Version; Ministry of Health and Welfare; 2016, p 315.
- Crude Drugs Saffron. *Japanese Pharmacopoeia* (JP17), 17th Ed.; English Version; The Ministry of Health, Labour and Welfare; 2016, p 173.
- Stigma Croci. Xihonghua. Chinese Pharmacopoeia*; 2005, p 310-311.
- ISO 3632-1:2011; Spices – Saffron (*Crocus sativus* L.). Part 1: Specification (2 Ed.); International Organization for Standardization: Genève, 2011.
- ISO 3632-2:2010; Spices – Saffron (*Crocus sativus* L.). Part 2: Test methods (1 Ed.); International Organization for Standardization: Genève, 2010.
- FDA PART 73 – Listing of color additives exempt from certification Subpart A – Foods. Sec. 73.500 Saffron.
- ГОСТ 21722-84; *Межгосударственный стандарт «Шафран, технические условия»; Москва, 2011.*

22. Doc. No. FAD 9(2516)C Draft Indian Standard Spices — Saffron (*Crocus sativus* L.) Part 2 Test Methods [(first revision of IS 5453 (Part 2)] (Adoption of ISO 3632 - 2 : 2010). Doc. No. FAD 9(2515)C Draft Indian Standard Spices – Saffron (*Crocus sativus* L.) Part 1 : Specification [third revision of IS 5453 (Part 1)] (Adoption of ISO 3632 - 1 : 2011).
23. National Iranian Standards 259-1: Saffron – specifications and 259-2: Saffron – test methods.
24. Барыкина, Р. П.; Веселова, Т. Д.; Девятков, А. Г.; Джалилова, Х. Х.; Ильина, Г. М.; Чубатова, Н. В. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы; Издательство МГУ: Москва, 2004.
25. Державна фармакопея України, 1-е вид.; ПІРЕГ: Харків, 2001.
26. Mykhailenko, O.; Desenko, V.; Ivanauskas, L.; Georgiyants, V. Standard operating procedure of Ukrainian saffron cultivation according with Good Agricultural and Collection Practices to assure quality and traceability. *Industrial Crops and Products* **2020**, *151*, 112376–112387 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112376>.

Received: 05. 10. 2020

Revised: 01. 12. 2020

Accepted: 03. 12. 2020