

Івано-Франківський національний медичний університет
Міністерство охорони здоров'я України
Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького
Міністерство охорони здоров'я України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Легінь Надія Ігорівна

УДК 615.322+582.795

ДИСЕРТАЦІЯ

**Фармакогностичне дослідження підлісника європейського
(*Sanicula europaea* L.)**

15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія
22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Н. І. Легінь

Науковий керівник: Грицик Любов Миколаївна, кандидат фармацевтичних наук,
доцент

Івано-Франківськ – 2021

АНОТАЦІЯ

Легінь Н. І. Фармакогностичне дослідження підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.). – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія. – Івано-Франківський національний медичний університет, МОЗ України, Івано-Франківськ, 2021.

Дисертаційна робота присвячена комплексному фармакогностичному дослідженню сировини підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.).

Проведений аналіз наукових першоджерел свідчить, що в Україні не проводилися дослідження з вивчення морфолого-анатомічних ознак; особливостей зростання; якісного складу та кількісного вмісту основних груп БАР; фармакологічної дії сировини підлісника європейського. Тому актуальним було проведення фармакогностичного дослідження надземних та підземних органів підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) для прогнозування фармакологічної дії та створення нових лікарських засобів.

За допомогою реакцій ідентифікації та хроматографічного аналізу у водних та водно-спиртових витяжках в траві та кореневищах з коренями підлісника європейського виявлено різні групи БАР, серед яких таніни, флавоноїди, гідроксикоричні кислоти, сапоніни, вільні цукри, амінокислоти, аскорбінова кислота, водорозчинні полісахариди, пектинові речовини.

Методом паперової хроматографії досліджено наявність органічних кислот та амінокислот в траві та кореневищах з коренями підлісника європейського. За результатами проведеного хроматографічного аналізу в траві підлісника європейського виявлено аскорбінову, яблучну, лимонну та щавлеву кислоти, а в кореневищах з коренями – щавлеву, лимонну та яблучну кислоти. За результатами хроматографічного аналізу в сировині підлісника європейського ідентифіковано 11 амінокислот, а саме: аспарагінову та глютамінову кислоти, аланін, аргінін, лейцин, гістидин, серин, валін, треонін, метіонін, пролін.

Методом двовимірної хроматографії на папері встановлено, що в траві підлісника європейського міститься 8 фенольних сполук (3 сполуки ідентифіковано як флавоноїди і 5 – як гідроксикоричні кислоти). В кореневищах з коренями встановлено 5 сполуки фенольної природи (1 сполуку ідентифіковано як флавоноїд і 4 – як гідроксикоричні кислоти).

Вперше методами рідинно-рідинного фракціонування, хроматографії на колонках силікагелю, препаративної хроматографії на папері, дробної кристалізації з надземних органів підлісника європейського виділено в індивідуальному стані 6 гідроксикоричних кислот: кофейна, хлорогенова, неохлорогенова, розмаринова, ферулова, *n*-кумарова та 1 флавоноїд – рутин; з підземних органів підлісника європейського виділено в індивідуальному стані 5 гідроксикоричних кислот: кофейна, хлорогенова, неохлорогенова, розмаринова, ферулова.

Методом атомно-абсорбційної спектрометрії досліджено елементний склад сировини підлісника європейського. Серед макроелементів в траві підлісника європейського в найбільшій кількості накопичується К (2740 мг/100 г), а серед мікроелементів – Fe (7,98 мг/100 г); у кореневищах з коренями встановлено найвищий вміст макроелементу Са (2260 мг/100 г) та мікроелементу Mn (5,81 мг/100 г). Вміст важких металів (Cd та Pb) знаходився в межах допустимих концентрацій згідно з вимогами ДФУ 2.0 для препаратів рослинного походження.

Вперше з сировини підлісника європейського були виділені фракції ВРПС, ПР, ГцА та ГцБ. Методом ПХ та ТШХ вивчено мономерний склад полісахаридних комплексів. Для встановлення якісного складу полісахаридів вивчали динаміку їх гідролізу сульфатною кислотою протягом 1, 3 та 5 годин. Встановлено, що повне розщеплення полімерних сполук до молекул мономерів відбувається протягом 3 год. Загальний вміст полісахаридів при подальшому гідролізі зменшується, що свідчить про їх деструкцію. На основі проведених досліджень у фракції ВРПС трави підлісника європейського було виявлено такі моносахариди як глюкоза, арабіноза, ксилоза, фруктоза; у фракції ПР – глюкоза,

арабіноза, ксилоза, глюкуронова кислота; у фракції ГцА – глюкоза, ксилоза, галактуринова кислота; у фракції ГцБ – глюкоза, арабіноза, рамноза, фруктоза, глюкуронова кислота. У фракції ВРПС кореневищ з коренями підлісника європейського було ідентифіковано глюкозу, арабінозу, рамнозу, фруктозу; у фракції ПР – глюкозу, арабінозу, рамнозу, глюкуронову кислоту; у фракції ГцА – глюкозу, арабінозу, ксилозу, фруктозу, галактуринову кислоту; у фракції ГцБ – глюкозу, арабінозу, рамнозу, ксилозу, глюкуронову кислоту.

Дослідження амінокислотного складу сировини підлісника європейського проводили на амінокислотному аналізаторі ААА Т-339 М у порівнянні з концентрацією стандартних гідролізатів амінокислот згідно з ДСТУ ISO 13903:2005. У сировині підлісника європейського ідентифіковано та встановлено вміст 17 амінокислот, серед яких 7 незамінних та 10 замінних. Загальна сума амінокислот у траві підлісника європейського становить 100,10 мг/100 г (з них 31,37 мг/100 г незамінних), а у кореневищах з коренями підлісника європейського – 99,06 мг/100 г (з них 14,49 мг/100 г незамінних). Домінантними амінокислотами у траві підлісника європейського є аспарагінова кислота (12,42 мг/100 г), гліцин (12,21 мг/100 г), аланін (9,81 мг/100 г), аргінін (9,12 мг/100 г); у кореневищах з коренями підлісника європейського – аргінін (25,38 мг/100 г), пролін (11,54 мг/100 г), аланін та аспарагінова кислота (по 10,77 мг/100 г).

Методом обернено-фазної високоефективної рідинної хроматографії з УФ-детектуванням у траві підлісника європейського ідентифіковано 14 фенольних сполук, а в кореневищах з коренями – 13 сполук. Серед танінів найбільший вміст у траві підлісника європейського припадає на епікатехіну галат – 1,11 %; кореневища з коренями найбільше містять у своєму складі галокатехін – 0,31 %. Найвищий вміст серед флавоноїдів у траві підлісника європейського складає кверцетин – 0,012 %. Найбільший вміст гідроксикоричних кислот у траві та кореневищах з коренями підлісника європейського припадає на розмаринову кислоту – 0,49 % та 0,33 % відповідно. Кумарини в сировині підлісника європейського представлені кумарином, вміст

якого у досліджуваній сировині складає 0,009 %.

Методом газової хроматографії/мас-спектрометрії в траві підлісника європейського ідентифіковано 3 сполуки стероїдної природи: β -ситостерол (282,82 мг/кг), стигмастан-3,5-дієн (112,72 мг/кг) і стигмастерол (39,16 мг/кг). Виявлено 39 компонентів летких сполук, з яких 14 ідентифіковано з вірогідністю співпадіння з даними бібліотеки мас-спектрів більше як 90 %: β -патчулен, β -кедрен, транс- α -бергамотен, β -хелміскапен, α -кадінен, α -муурулен, бісаболен, (-)-каламенен, каріофілен оксид, 4,11-селінадієн, гептакозан, 1-метил-6-метиленбіцикло[3.2.0] гептан, гексагідрофарнезилацетон. Серед ідентифікованих компонентів летких сполук найбільшу частку складають сесквітерпеноїди, які представлені ациклічними, моноциклічними, біциклічними та трициклічними сполуками, серед яких за вмістом переважають біциклічні сполуки. Домінантними серед сесквітерпеноїдів є моноциклічний – бісаболен (36,34 мг/кг); біциклічний – β -хелміскапен (356,61 мг/кг); трициклічний – β -кедрен (65,72 мг/кг), а також вуглеводень 1-метил-6-метиленбіцикло[3.2.0] гептан (126,68 мг/кг). В траві підлісника європейського виявлено 9 жирних кислот: пальмітолеїнова, пальмітинова, лінолева, ліноленова, стеаринова, бегенова, трикозанова, лігноцеринова, церотинова кислоти. Вміст ненасичених і насичених кислот знаходиться майже у рівному співвідношенні – 50,46 % і 49,54 % від загального вмісту визначених кислот. Серед ненасичених жирних кислот переважає лінолева (2892,98 мг/кг) та ліноленова кислоти (1784,69 мг/кг), а серед насичених – пальмітинова кислота (3400,77 мг/кг).

Вміст суми поліфенолів, танінів, флавоноїдів, гідроксикоричних кислот, сапонінів, окиснюваних фенолів, органічних кислот, в тому числі аскорбінової кислоти, визначали спектрофотометричним, фотоколориметричним та титриметричним методами в надземних та підземних органах підлісника європейського. Вміст суми поліфенолів у сировині підлісника європейського становить від 2,17 % до 10,95 %; вміст окиснюваних фенолів – від 1,62 % до 4,68 %; вміст танінів – від 1,21 % до 7,91 %; вміст суми флавоноїдів знаходиться

в межах від 0,087 % до 2,72 % в залежності від виду сировини. Вміст тритерпенових сапонінів в досліджуваній сировині знаходиться в межах від 0,33 % до 1,05 %; гідроксикоричних кислот – від 0,55 % до 1,68 %. За результатами дослідження було встановлено, що вміст вітаміну K_1 знаходиться в межах від 0,37 % до 1,03 %, органічних кислот – від 1,15 % до 1,88 %, аскорбінової кислоти – від 0,018 % до 0,067 % залежно від виду сировини. Найбільший вміст біологічно активних речовин накопичується в листках підлісника європейського, а дещо нижчий вміст – у траві. На підставі проведених фітохімічних, морфологічних досліджень та з урахуванням фітомаси листків для подальших досліджень обрано траву підлісника європейського.

На підставі проведених досліджень було визначено технологічні параметри сировини підлісника європейського та встановлено оптимальні умови одержання екстрактів підлісника європейського. Вихід одержаних екстрактів становив 21,57 % – 28,45 % залежно від природи екстрагенту та виду сировини.

Встановлено, що введення екстрактів з трави підлісника європейського (екстрагент – вода очищена або 70 % етанол) в дозі 5000 мг/кг маси тіла білих мишей не призводить до загибелі тварин, будова внутрішніх органів залишалася без змін, гематологічні та деякі біохімічні показники крові знаходилися на рівні контрольних. Це вказує на відсутність токсичної дії екстрактів в даній дозі та дає можливість віднести їх до IV класу токсичності речовин з $LD_{50} = 500 - 5000$ мг/кг (малотоксичні).

Дослідження антимікробної активності методом дифузії в агар із застосуванням паперових дисків свідчить, що екстракти трави підлісника європейського виявляють бактеріостатичну активність відносно паличкоподібної та кокоподібної мікрофлори. Найбільшу активність проявляє екстракт трави підлісника європейського (екстрагент – 70 % етанол) щодо *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 та *Escherichia coli* ATCC 25922 та екстракт кореневищ з коренями підлісника європейського (екстрагент – вода очищена) по

відношенню до *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Встановлено, що при нанесенні екстрактів з трави підлісника європейського (екстрагент – вода очищена або 70 % етанол) на рану зупинка кровотечі відбувалась у 1,52 та 1,48 рази швидше щодо препарату порівняння, а відносно контрольної групи – в 1,98 та 1,93 рази залежно від виду екстрагенту. Препарат порівняння «Екстракт перцю водяного рідкий» (ПрАТ «Фітофарм») зменшував час кровотечі у 1,3 рази в порівнянні з контрольною групою. Спосіб одержання екстракту з трави підлісника європейського з кровоспинною дією захищено патентом України на корисну модель 132069.

Встановлено, що при застосуванні екстрактів трави підлісника європейського (екстрагент – вода очищена або 70 % етанол) спостерігається повне загоєння рани на 8 – 9 і 9 – 10 добу відповідно, препарату порівняння «Рекутан» (ТЗОВ «Здоров'я») – на 10 – 11 добу, а в контрольній групі тварин – на 15 – 16 добу. Краща ранозагоювальна дія та динаміка перебігу ранового процесу спостерігалася при застосуванні екстракту трави підлісника європейського (екстрагент – вода очищена).

Встановлено, що екстракти трави підлісника європейського (екстрагент – вода очищена або 70 % етанол) проявляють протизапальну дію при карагеніновому набряку та не поступаються за своєю активністю препарату порівняння рослинного походження кверцетину (ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ»). Введення тваринам екстрактів трави підлісника європейського (екстрагент – вода очищена або 70 % етанол) призводило до зменшення об'єму лапи щура відносно контрольної групи на 36,40 % та 32,62 % через 5 год після введення флогогенного агенту, а кверцетин – на 29,40 %.

На підставі проведених скринінгових фармакологічних досліджень екстрактів підлісника європейського встановлено, що виражену кровоспинну, ранозагоювальну, протизапальну та антимікробну активність проявляють екстракти трави підлісника європейського.

Стандартизацію одержаного екстракту проводити за вимогами ДФУ 2.0 за наступними параметрами: опис, розчинність, ідентифікація (2.2.7), втрата в масі

при висушуванні (2.8.17), загальна зола (2.4.16), важкі метали (2.4.8, метод А), мікробіологічна чистота (5.1.4, 2.6.12, 2.6.13) та кількісне визначення суми поліфенолів (2.8.14).

На підставі проведених досліджень розроблено проєкт методів контролю якості «Підлісника європейського трави екстракт сухий».

За результатами проведеного морфолого-анатомічного дослідження підлісника європейського було встановлено основні морфологічні та анатомічні діагностичні ознаки надземних та підземних органів.

Морфологічні ознаки трави. Цілі або частково здрібнені шматки стебел, листків, квіток. Стебло голе, просте, до 3 мм у діаметрі. Листки довго- або короткочерешкові, пальчатороздільні, з 3 – 5 обернено яйцеподібними дво-, тринадрізними пилчастими частками з зубцями, що закінчуються зубчиком. З верхнього боку листки темно-зеленого кольору, з нижнього – сіро-зеленого. Квітки дрібні, зібрані у 3 – 5-променевий зонтик, оточений обгорткою з ланцетних, зубчастих або перистороздільних листочків; пелюстки білі або блідо-рожеві, виїмчасті, з довгою увігнутою всередину верхівкою. Запах слабкий, специфічний.

Морфологічні ознаки кореневища з коренями. Шматки кореневища циліндрично-веретеноподібної форми близько 4 см завдовжки, 1 – 2 см у діаметрі, тверді та малогалузисті, з великою кількістю бічних коренів. Поверхня від темно-жовтого до жовтуватого-коричневого кольору, зморшкувата, із залишками коренів. Бічні корені циліндричні, іноді спірально закручені, завдовжки до 7 см, діаметром 0,1 – 0,2 см, темно-коричневого кольору.

Анатомічні ознаки трави. Стебло підлісника європейського вкрите однорядною епідермою. В паренхімі стебла лежить велика кількість судинно-волокнистих пучків у вигляді кільця. У флоємі судинно-волокнистих пучків чітко видно групи ситоподібних трубок, які щільно зосереджені в луб'яній паренхімі. Камбій складається з трьох-чотирьох шарів тонкостінних клітин. У ксилемі розташовані судини невеликими групами. Центральну частину стебла займає серцевина з великими тонкостінними клітинами. Листкова пластинка

дорсивентральної будови. Під верхньою епідермою наявна одношарова гіподерма. Мезофіл листка неоднорідний, містить 2 – 3-рядну палісадну паренхіму, утворену щільно розташованими прозенхімними клітинами овальної форми. Клітини верхньої епідерми дещо витягнуті у тангентальному напрямі, із хвилясто-виїмчастими тонкостінними оболонками. Вздовж жилок епідермальні клітини дрібні, прозенхімні, в окремих місцях їх оболонки потовщені вервичкоподібно. Продихи у верхній епідермі відсутні. Клітини нижньої епідерми зі звивистими оболонками. Серед них зустрічаються численні продихи, які розташовані на одному рівні з іншими епідермальними клітинами або дещо занурені. Замикаючі клітини з потовщеними внутрішніми оболонками та вузькою щілиною, оточені трьома побічними клітинами, одна з яких менша або більша від двох інших (анізочитний тип продихового апарату). Черешок листка на поперечному зрізі має трикутну форму з невеликими виступами, вираженість яких збільшується з віком органу, а також у напрямку від базальної до верхівкової частини черешка. В середній частині черешка присутні п'ять судинно-волокнистих пучків, повернені ксилемою до центра. Клітини епідерми без потовщень мозаїчно чергуються з клітинами, що мають вервичкоподібно потовщені оболонки. Місцями клітини епідерми вкриті складчастою кутикулою

Анатомічні ознаки кореневища з коренями. Кореневище має безпучковий тип будови. Клітини корку перидерми на поперечному зрізі у 2 рази більші від клітин корку бічного кореня. Серцевина складається із великих клітин округлої форми. Бічний корінь безпучкового типу будови. Субепідермальна коленхіма з нерівномірно-потовщеними оболонками клітин утворює 3 – 4-рядне суцільне кільце. Основна тканина утворена двома рядами дрібних клітин і 5 – 8 рядами товстостінних паренхімних клітин. У складі перидерми – 3 – 7 шарів тонкостінних, сплюснених, забарвлених у темно-коричневий колір клітин корку. У коровій частині та в ксилемі наявні промені механічних тканин, що розширюються в центробіжному напрямку. Вони різні за довжиною та досить рівномірно чергуються з променями паренхіми. Судини сітчасті, рідше кільчасті. Серцевина в центральній частині циліндрична. Наявні друзи кальцію

оксалату.

Результати ресурсознавчих дослідження вказують, що більшість відомих популяцій *Sanicula europaea* L. займають невелику площу, нечисленні, щільність рослин досить низька. За віковим станом представлені лише генеративні рослини, тобто не спостерігається природного відновлення популяцій. Кількість особин у популяціях значно залежить від вегетаційного періоду та часто представлені поодинокими особинами, інколи – по кілька або невеликими групами. Тому першочерговими заходами для забезпечення поширення *Sanicula europaea* L. було проведення дослідження з інтродукції та акліматизації виду, вивчення етапів органогенезу та розробки методів культивування.

Дослідження з культивування *Sanicula europaea* L. проводили згідно з вимогами Настанови СТ-Н МОЗУ 42-4.5:2012 «Лікарські засоби. Належна практика культивування та збирання вихідної сировини рослинного походження». Для розробки умов культивування використовували насіння та посадковий матеріал підлісника європейського, заготовлені в Івано-Франківській обл. у 2012 р. Встановлено, що лабораторна схожість насіння підлісника європейського становить $35 \pm 2,3$ %, а польова – 20 ± 2 %.

На дослідних ділянках лікарських рослин Державного дендрологічного парку «Дружба» ім. З. Павлика вивчали вегетативне розмноження підлісника європейського в парниках і у відкритому ґрунті, використовуючи живці з бруньками відновлення та живці з частиною кореневища. Найбільший відсоток вкорінення спостерігали у живців з бруньками відновлення (92 %), а при вкоріненні живців з частиною кореневища отримали нижчий відсоток (45 %). При висаджуванні весною рослини починали відростати цього ж року, були повністю сформовані, на другий рік давали плоди. Рослини висаджені восени, починали відростати лише з наступної весни, були значно нижчими, не повністю сформовані, починали плодоносити лише на третій рік. Таким чином, встановлено, що ефективнішим способом розмноження підлісника європейського є вегетативне розмноження живцями з бруньками відновлення.

Фенологічні спостереження за рослинами підлісника європейського проводили в природному фітоценозі (с. Вовчинці Івано-Франківської обл.) та на дослідних ділянках лікарських рослин ІФНМУ. Встановлено, що оптимальними термінами заготівлі підлісника європейського є червень – липень (період масового цвітіння рослини).

За результатами проведених фітохімічних та морфолого-анатомічних досліджень були запропоновані наступні параметри стандартизації трави підлісника європейського: макро- та мікроскопічні ознаки сировини, ідентифікація за наявністю фенольних сполук, втрата в масі при висушуванні (не більше 10 %), вміст золи загальної (не більше 10 %), сторонні домішки (не більше 2 %), кількісний вміст суми поліфенолів (не менше 8 %).

Розроблено проекти методів контролю якості «Підлісника європейського трава» та «Інструкції із заготівлі та сушіння трави підлісника європейського».

Ключові слова: підлісник європейський, трава, кореневища з коренями, фармакогностичне дослідження, біологічно активні речовини, екстракт, фармакологічна дія.

ANNOTATION

Legin N. I. Pharmacognostic investigation of *Sanicula europaea* L. – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

Thesis for the Scientific Degree of Candidate of Pharmaceutical Science (PhD) in Specialty 15.00.02 – Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy – Ivano-Frankivsk National Medical University, Ivano-Frankivsk, 2021.

Thesis is devoted to the complex pharmacognostic research of *Sanicula europaea* L. raw materials.

The analysis of scientific literature shows that in Ukraine the studies of the morphological and anatomical features, peculiarities of growing, the composition and the content of the major groups of biologically active substances and pharmacological effects of *Sanicula europaea* L. raw materials have never been conducted before.

Therefore, it was important to carry out the pharmacognostic study of aboveground and underground organs of *Sanicula europaea* L. to predict their pharmacological effects and to develop new drugs.

Different groups of biologically active substances, namely tannins, flavonoids, hydroxycinnamic acids, saponins, free sugars, amino acids, ascorbic acid, water-soluble polysaccharides and pectic substances were identified in aqueous and aqueous-alcoholic extracts of *Sanicula europaea* L. herb and rhizomes with roots using the reactions of identification and chromatographic analysis.

The presence of organic acids and amino acids in the herb and rhizomes with roots of *Sanicula europaea* L. was determined using the paper chromatography. The results of the chromatographic analysis of *Sanicula europaea* L. indicate the presence of ascorbic, malic, citric and oxalic acids in the herb and oxalic, citric and malic acids in the rhizomes with roots. According to the results of the chromatographic analysis, 11 amino acids, namely aspartic acid, glutamic acid, alanine, arginine, leucine, histidine, serine, valine, threonine, methionine, proline in *Sanicula europaea* L. raw materials were identified.

Using the two-dimensional paper chromatography it was established that the herb of *Sanicula europaea* L. contains 8 phenolic compounds (3 compounds were identified as flavonoids and 5 compounds were identified as hydroxycinnamic acids); the rhizomes with roots of *Sanicula europaea* L. contain 5 phenolic compounds (1 compound was identified as flavonoid and 4 compounds were identified as hydroxycinnamic acids).

For the first time using liquid-liquid fractionation method, silica gel columns chromatography, preparative paper chromatography and fractional crystallization 6 hydroxycinnamic acids, namely caffeic, chlorogenic, neochlorogenic, rosmarinic, ferulic and *p*-coumaric acids and 1 flavonoid rutin were isolated in individual state from the aboveground organs of *Sanicula europaea* L.; 5 hydroxycinnamic acids, namely caffeic, chlorogenic, neochlorogenic, rosmarinic and ferulic acids were isolated individually from the underground organs of *Sanicula europaea* L.

The elemental composition of the *Sanicula europaea* L. raw materials was studied using atomic absorption spectrophotometry. Among the macroelements in the herb of *Sanicula europaea* L. the highest accumulation was established for K (2740 mg/100 g) and among the microelements the highest accumulation was established for Fe (7.98 mg/100 g); in the rhizomes with roots of *Sanicula europaea* L. the highest content was established for Ca (2260 mg/100 g) and for Mn (of 5.81 mg/100 g). The content of heavy metals (Cd and Pb) was within acceptable concentrations in accordance with the requirements of SPU 2.0 for herbal remedies.

For the first time the fractions of water-soluble polysaccharides, pectic substances, hemicellulose A and hemicellulose B were extracted from the *Sanicula europaea* L. raw materials. Monomeric composition of polysaccharide complexes was studied using paper chromatography and thin-layer chromatography. To establish the composition of polysaccharides the dynamics of their hydrolysis with sulfuric acid during 1 hour, 3 hours and 5 hours was studied. It was found that the complete decomposition of polymer compounds to the molecules of monomers occurs within 3 hours. The total content of polysaccharides decreases after further hydrolysis, which indicates their destruction. On the basis of the conducted studies such monosaccharides as glucose, arabinose, xylose and fructose were identified in the fraction of water-soluble polysaccharides of *Sanicula europaea* L. herb; glucose, arabinose, xylose and glucuronic acid were identified in the fraction of pectic substances; glucose, xylose and galacturonic acid were identified in the fraction of hemicellulose A; glucose, arabinose, rhamnose, fructose, glucuronic acid were identified in the fraction of hemicellulose B. Glucose, arabinose, rhamnose and fructose were identified in the fraction of water-soluble polysaccharides of rhizomes with roots of *Sanicula europaea* L.; glucose, arabinose, rhamnose and glucuronic acid were identified in the fraction of pectic substances; glucose, arabinose, xylose, fructose and galacturonic acid were identified in the fraction of hemicellulose A; glucose, arabinose, rhamnose, xylose and glucuronic acid were identified in the fraction of hemicellulose B.

Studies of the amino acid composition of *Sanicula europaea* L. raw materials were performed using the amino acid analyzer AAA T-339 M in comparison with the concentration of standard amino acid hydrolysates in accordance with the National Standard of Ukraine ISO 13903: 2005. 17 amino acids were identified in *Sanicula europaea* L. raw materials including 7 essential and 10 non-essential amino acids. The total concentration of amino acids in *Sanicula europaea* L. herb is 100.10 mg/100 g (including 31.37 mg/100 g of essential amino acids), and in *Sanicula europaea* L. rhizomes with roots is 99.06 mg/100 g (including 14.49 mg/100 g of essential amino acids). The dominant amino acids in *Sanicula europaea* L. herb are aspartic acid (12.42 mg/100 g), glycine (12.21 mg/100 g), alanine (9.81 mg/100 g), arginine (9.12 mg/100 g).); in *Sanicula europaea* L. rhizomes with roots – arginine (25.38 mg/100 g), proline (11.54 mg/100 g), alanine and aspartic acid (10.77 mg/100 g).

14 phenolic compounds were identified in *Sanicula europaea* L. herb and 13 phenolic compounds were identified in *Sanicula europaea* L. rhizomes with roots using the reverse-phase high-performance liquid chromatography with UV detection. Among tannins the highest content in the herb of *Sanicula europaea* L. was of epicatechin gallate (1.11 %); in the rhizomes with roots – of galocatechin (0.31 %). The highest content of flavonoids in the herb of *Sanicula europaea* L. was detected for quercetin (0.012 %); in the rhizomes with roots – for apigenin (0.014 %). Among hydroxycinnamic acids the highest content in the herb and rhizomes with roots of *Sanicula europaea* L. was detected for rosmarinic acid – 0.49 % and 0.33 % relatively. Coumarins in the raw material of *Sanicula europaea* L. are represented by coumarin, the content of which was 0.009 %.

3 steroid compounds were identified in the herb of *Sanicula europaea* L. using gas chromatography/mass spectrometry, namely β -sitosterol (282.82 mg/kg), stigmastan-3,5-diene (112.72 mg/kg) and stigmasterol (39.16 mg/kg). 39 volatile compounds were determined, 14 of which are for more than 90 % likely to coincide with the library data of mass spectra: β -patchulene, β -cedrene, trans- α -bergamotene, β -heliangelen, α -cadinene, α -murolicene, bisabolene, (-)-calamenene, caryophyllene

oxide, 1-methyl-6-methylenebicyclo[3.2.0] heptane, heptacosane, 4,11-selinadiene and hexahydrofarnesyl acetone. Among the identified components of volatile compounds the dominant are sesquiterpenoids represented by acyclic, monocyclic, bicyclic and tricyclic compounds (bicyclic compounds dominate among them). Dominant compounds among sesquiterpenoids are monocyclic sesquiterpenoid bisabolene (36.34 mg/kg), bicyclic sesquiterpenoid β -helniascaphene (356.61 mg/kg), tricyclic sesquiterpenoid β -cedar (65.72 mg/kg) and the hydrocarbon 1-methyl-6-methylenebicyclo [3.2.0] heptane (126.68 mg/kg). 9 fatty acids were identified in *Sanicula europaea* L. herb, including palmitoleic, palmitic, linoleic, linolenic, stearic, behenic, tricosanoic, lignoceric and cerotic acids. The content of unsaturated and saturated acids is almost equal – 50.46 % and 49.54 % of the total content relatively. Linoleic acid (2892.98 mg/kg) and linolenic acid (1784.69 mg/kg) predominate among unsaturated fatty acids and palmitic acid (3400.77 mg/kg) predominates among saturated fatty acids.

The content of total polyphenols, tannins, flavonoids, hydroxycinnamic acids, saponins, oxidized phenols, organic acids, including ascorbic acid in the aboveground and underground organs of *Sanicula europaea* L. was determined using the methods of spectrophotometry, photoelectrocolorimetry and titrimetry. The content of total polyphenols in *Sanicula europaea* L. raw materials ranged from 2.17 % to 10.95 %; oxidized phenols – from 1.62 % to 4.68 %; tannins – from 1.21 % to 7.91%; the sum of flavonoids ranged from 0.087 % to 2.72 % depending on the type of raw material. The content of triterpene saponins in the studied raw materials ranged from 0.33 % to 1.05 %; hydroxycinnamic acids – from 0.55 % to 1.68 %. According to the results of the study it was found that the content of vitamin K_1 ranged from 0.37 % to 1.03 %, organic acids – from 1.15 % to 1.88 %, ascorbic acid – from 0.018 % to 0.067 % depending on the type of raw materials. The highest concentration of biologically active substances accumulates in the leaves of *Sanicula europaea* L. and slightly lower concentration accumulates in the herb of *Sanicula europaea* L.

The obtained results show that the maximum amount of biologically active substances accumulates in the leaves of *Sanicula europaea* L., and a slightly lower

amount – in the herb of *Sanicula europaea* L. Based on the conducted phytochemical and morphological researches and taking into account phytomass of leaves, the herb of *Sanicula europaea* L. was chosen for further research.

On the basis of the conducted studies the technological parameters of *Sanicula europaea* L. raw materials were determined and the optimal conditions for obtaining extracts of *Sanicula europaea* L. were established. The yield of the obtained extracts ranged from 21.57 % to 28.45 % depending on the type of the extractant and the type of raw material.

It was studied that the administration of herbal extracts of *Sanicula europaea* L. (extractant – purified water or 70 % ethanol) at a dose of 5000 mg/kg of animal's body weight did not cause death of animals; the structure of the internal organs remained unchanged; hematological and some biochemical parameters of blood were on the level of control group. This indicates the absence of toxicity of the extracts in the studied dose and gives us the possibility to classify them as substances of the toxicity class IV with $LD_{50} = 500 - 5000$ mg/kg (low-toxic substances).

The study of antimicrobial activity by agar diffusion using paper discs shows that extracts of *Sanicula europaea* L. herb have bacteriostatic activity against rod-shaped and coco-shaped microflora. The greatest activity was shown by the ethanolic extract of *Sanicula europaea* L. herb against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922 and by the aqueous extract of *Sanicula europaea* L. rhizomes with roots against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

It was studied that after the application of herbal ethanolic and aqueous extracts of *Sanicula europaea* L. on the wound the bleeding stopped 1.52 and 1.48 times faster than after the application of the reference drug, and relative to the control group – 1.98 and 1.93 times faster depending on the type of extractant. The reference drug “Liquid extract of *Persicaria hydropiper*” (PrJSC “Phytopharm”) reduced the bleeding time by 1.3 times compared with the control group. Method of obtaining the extract from the herb of *Sanicula europaea* L. with hemostatic activity is protected by the patent of Ukraine for utility model No. 132069.

It was found that using the aqueous and ethanolic extracts of *Sanicula europaea* L. herb causes the complete healing of the wound in 8 – 9 and 9 – 10 days respectively; using the reference drug “Rekutan” (LLC “Health”) causes the complete healing of the wound in 10 – 11 days; the complete healing of the wound in the control group of animals was observed in 15 – 16 days. The best wound-healing effect and dynamics of the wound process was observed after the application of aqueous extract of *Sanicula europaea* L. herb.

Based on the conducted screening pharmacological researches of *Sanicula europaea* L. extracts it was established that the considerable hemostatic, wound-healing, anti-inflammatory and antimicrobial activity have *Sanicula europaea* L. herb extracts.

It was established that aqueous and ethanolic extracts of *Sanicula europaea* herb have the anti-inflammatory effect in carrageenan edema model and are not inferior in their activity to the reference drug of plant origin – quercetin (PJSC SIC «Borshchahivskiy CPP»). Administration of aqueous and ethanolic extracts of *Sanicula europaea* L. herb to the animals was resulted in the decrease in the volume of the rat's paw relative to the control group by 36.40 % and 32.62 % through 5 hours after the introduction of the phlogogenic agent; administration of quercetin caused the decrease in the volume of the rat's paw by 29,40 %.

Standardization of the obtained extract was conducted according to the requirements of SPU 2.0 by the following parameters: description, solubility, identification (2.2.7), loss of mass on drying (2.8.17), total ash (2.4.16), heavy metals (2.4.8, method A), microbiological purity (5.1.4, 2.6.12, 2.6.13) and the content of total polyphenols.

Based on the conducted research the project of quality control methods «*Sanicula europaea* L. herb dry extract» was developed.

As the result of the conducted morphological and anatomical study, the main morphological diagnostic features of aboveground and underground parts of *Sanicula europaea* L. were determined.

Morphological features of the herb. Whole or partially crushed pieces of stems, leaves and flowers. The stem is glabrous, simple, up to 3.0 mm in diameter. Leaves are long- or short- stalked, finger-lobed, with 3 to 5 obovate two-, three-sectioned serrate lobes with spikes, which end in a bristle. On the upper side the leaves are dark green, on the lower – grayish-green. The flowers are small, gathered in 3 – 5-beams umbrellas, surrounded by a wrapper of lanceolate, toothed or pinnate leaves; petals are white or pale pink, notched, with a long concave tip. The smell is mild, specific.

Morphological features of the rhizome with roots. Pieces of rhizome are cylindrically spindle-shaped about 4 cm long and 1 – 2 cm in diameter, solid and little branched, with many lateral roots. The surface is coloured from deep yellow to yellowish-brown, wrinkled, with remnants of roots. Lateral roots are cylindrical, sometimes spirally twisted, up to 7 cm long and 0.1 – 0.2 cm in diameter, dark brown.

Anatomical features of the herb. The stem of *Sanicula europaea* L. is covered with a single-row epidermis. There are many vascular-fibrous bundles in the form of a ring in the parenchyma of the stem. In the phloem of the vascular-fibrous bundles, groups of sieve-like tubes are clearly visible, which are densely concentrated in the bast parenchyma. The cambium consists of three to four layers of thin-walled cells. In the xylem are vessels in small groups. The central part of the stem is occupied by the core with large thin-walled cells. The leaf blade has dorsiventral structure. Under the upper epidermis there is a single layer of hypodermis. The mesophyll of the leaf is heterogeneous, contains 2 – 3-row palisade parenchyma, formed by densely arranged prosenchymal cells of oval shape. The cells of the upper epidermis are slightly elongated in the tangential direction, with wavy-notched thin-walled membranes. Along the veins, the epidermal cells are small, prosenchymal, in some places their membranes are thickened. There are no stomata in the upper epidermis. Cells of the lower epidermis have tortuous membranes. There are numerous stomata, which are located on the same level with other epidermal cells or slightly submerged. Closing cells with thickened inner shells and a narrow slit are surrounded by three side cells, one of which is smaller or larger than the other two (anisocyte type of the stomata apparatus). The petiole of the leaf in cross section has a triangular shape with small

protrusions, the severity of which increases with age of the organ, as well as in the direction from the basal to the apical part of the petiole. In the middle part of the petiole there are five vascular-fibrous bundles, returned by the xylem to the center. Cells of the epidermis without thickenings alternate mosaically with cells having coronally thickened shells. In some parts, the cells of the epidermis are covered with a plicated cuticle.

Anatomical features of the rhizome with roots. The rhizome has a beamless structure. The cells of the cortex of the periderm in cross section are 2 times larger than the cells of the cortex of the lateral root. The core consists of large round cells. Lateral root of the beamless type of structure. The subepidermal collenchyma with unevenly thickened cell membranes forms a 3 – 4-row continuous ring. The main tissue is formed by two rows of small cells and 5 – 8 rows of thick-walled parenchymal cells. The periderm consists of 3 – 7 layers of thin-walled, flattened, dark brown cells of the cortex. In the cortical part and in the xylem there are rays of mechanical tissues that expand in the centrifugal direction. They are different in length and alternate fairly evenly with the rays of the parenchyma. Vessels are reticulate, rarely annular. The core in the central part is cylindrical. There are druses of calcium oxalate.

The results of resource studies indicate that the majority of known populations of *Sanicula europaea* L. occupy a small area, the number and density of plants are quite low. According to their age only generative plants are presented, which means that natural recovery of populations is not observed. The number of plants in populations is highly dependent on the vegetation period and they are often represented by single individuals, sometimes – several or in small groups. Therefore the priority measures for providing the distribution of *Sanicula europaea* L. was to conduct the study on introduction and acclimatization of species, the study of the stages of organogenesis and the development of methods of cultivation.

Studies on the cultivation of *Sanicula europaea* L. was carried out according to the requirements of Guidelines ST-N MOH 42-4.5: 2012 “Medicines. Good practice of cultivation and harvesting of raw materials of plant origin”. Seeds and seedling of *Sanicula europaea* L. harvested in the Ivano-Frankivsk region in 2012 were used to

develop the conditions of plant cultivation. It was established that the laboratory germination of *Sanicula europaea* L. seeds is 35 ± 2.3 %, and field germination is 20 ± 2 %.

The vegetative reproduction of *Sanicula europaea* L. was studied at the research areas of medicinal plants of the State Dendrological Park “Druzhba” named after Z. Pavlyk, in greenhouses and on the open ground, using cuttings with regeneration buds and cuttings with part of the rhizome. The highest percentage of rooting was observed in cuttings with regeneration buds (92 %), and when rooting cuttings with part of the rhizome we received a lower percentage (45 %). The plants planted in the spring began to grow the same year, were fully formed and gave fruits in the second year. Plants planted in autumn began to grow only the following spring, they were much lower, not fully formed and began to bear fruits only in the third year. Thus, it was found that vegetative reproduction by cuttings with regeneration buds is a more effective way of *Sanicula europaea* L. reproduction.

Phenological observations of *Sanicula europaea* L. samples were carried out in the natural phytocenosis (Vovchyntsi village, Ivano-Frankivsk region) and on the experimental areas of medicinal plants of IFNMU. It was established that the optimal months for harvesting the *Sanicula europaea* L. are June and July (the period of mass flowering of the plant).

According to the results of the research the following standardization parameters of the herb of *Sanicula europaea* L. have been offered: microscopic characteristics, identification of the phenolic compounds, loss of mass on drying (not more than 10 %), the total ash content (not more than 10 %), exterior impurities (not more than 2 %), the content of total polyphenols (not less than 8 %).

The projects of quality control methods “*Sanicula europaea* L. herb”, and “Instruction for harvesting and drying of *Sanicula europaea* L. herb” were developed.

Key words: *Sanicula europaea* L., herb, rhizomes with roots, pharmacological studies, biologically active substances, extract, pharmacological action.

Список публікацій здобувача:

1. Дослідження антимікробної активності екстрактів підлісника європейського / Л. М. Грицик, Н. І. Легінь, А. Р. Грицик, В. О. Гондарук. *Український вісник психоневрології*. 2012. Т. 20, вип. 2 (71) додаток. С. 66 – 67. (Особистий внесок – проведення експериментальних досліджень антимікробної активності підлісника європейського, узагальнення одержаних даних та оформлення статті до друку).
2. Ідентифікація видів роду *Sanicula* L. і *Astrantia* L. родини *Ariaceae* L. / Л. М. Грицик, Н. І. Легінь, Т. І. Коляджин, А. Р. Грицик. *Український вісник психоневрології*. 2013. Т. 21, вип. 2 (75) додаток. С. 76 – 78. (Особистий внесок – проведення аналізу досліджуваної сировини, обробка одержаних даних та оформлення статті до друку).
3. Морфолого-анатомічне дослідження підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) / Л. М. Грицик, Н. І. Легінь, А. Р. Грицик, М. В. Мельник. *Фармацевтичний журнал*. 2014. № 4. С. 53 – 58. (Особистий внесок – проведення макро- та мікроскопічного аналізу сировини підлісника європейського, обробка одержаних даних та оформлення статті до друку).
4. Грицик Л. М., Легінь Н. І., Грицик А. Р. Вивчення якісного складу та кількісного вмісту органічних кислот в сировині *Sanicula europaea* L. *Український вісник психоневрології*. 2014. Т. 22, вип. 2 (79) додаток. С. 105 – 107. (Особистий внесок – участь у проведенні експериментальних досліджень, статистична обробка даних та оформлення статті до друку).
5. Дослідження елементного складу підлісника європейського та астранції великої / Н. І. Легінь, Т. І. Коляджин, Л. М. Грицик, А. Р. Грицик. *Медична та клінічна хімія*. 2018. Т. 20, № 2. С. 112 – 116. (Особистий внесок – участь у проведенні аналізу сировини підлісника європейського, обробка одержаних результатів та оформлення статті до друку).
6. Легінь Н. І., Грицик Л. М. Вивчення гострої токсичності екстрактів з трави підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.). *Фармаком*. 2018. № 3.

С. 46 – 49. (Особистий внесок – проведення експериментальної частини, обґрунтування одержаних результатів та оформлення статті до друку).

7. Cultivation of *Apiaceae* L. family plants in Precarpathion region / L. M. Grytsyk, N. I. Legin, T. I. Kolyadzhyn, A. R. Grytsyk. *Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality*. Nitra: Slovak University of Agriculture. 2015. Part 1. P. 216 – 218. (Особистий внесок – проведення експериментальних досліджень, узагальнення одержаних даних, оформлення статті до друку).

8. Study of Amino Acid Composition of *Betonica* L., *Sanicula* L. and *Astrantia* L. Genera Species / L. M. Grytsyk, A. R. Grytsyk, I. A. Sas, N. I. Legin, T. I. Kolyadjin. *The Pharma Innovation Journal*. 2016. No 5 (7). P. 47 – 49. (Особистий внесок – аналіз літературних джерел, виконання експериментальної частини з дослідження амінокислотного складу сировини підлісника європейського, узагальнення одержаних даних, оформлення статті до друку).

9. Пошук перспективних джерел лікарських засобів з кровозупинною дією / Л. М. Грицик, І. Л. Бензель, Н. І. Легінь, Н. І. Тучак, О. В. Нейко, І. А. Сас, А. Р. Грицик. *Актуальні проблеми профілактичної медицини: зб. наук. праць (Присвячується 80-річчю від дня народження професора М. Й. Гжегоцького та 25-річчю заснування лабораторії промислової токсикології)*. Львів, 2012. № 10. С. 52 – 59. (Особистий внесок – аналіз літературних джерел, узагальнення одержаних даних, оформлення статті до друку).

10. Фенологічні особливості росту та розмноження підлісника європейського / Л. М. Грицик, А. Р. Грицик, Н. І. Легінь, Т. І. Козак. *Вода і здоров'я людини (До 150-річчя з дня народження В. І. Вернадського)*: матеріали міжнар. міждисциплінарної наук.-практ. конф., 19 – 20 квіт. 2013 р. Ужгород, 2013. С. 246 – 249. (Особистий внесок – виконання експериментальної частини з дослідження фенологічних особливостей розмноження підлісника європейського, оформлення статті до друку).

11. Біологічні особливості та агротехніка вирощування деревію звичайного, рути садової, буквиці лікарської, підлісника європейського та астранції великої / М. В. Мельник, А. Р. Грицик, О. В. Нейко, І. А. Сас, Н. І. Легінь, Т. І. Коляджин. *Сучасні аспекти збереження здоров'я людини:*

матеріали VIII міжнар. міждисциплінарної наук.-практ. конф. 17 – 18 квіт. 2015 р. Ужгород, 2015. С. 228 – 231. (Особистий внесок – аналіз літературних джерел, узагальнення одержаних даних, виконання експериментальної частини з агротехнології вирощування підлісника європейського, оформлення статті до друку).

12. Спосіб одержання екстракту з трави підлісника європейського з кровоспинною дією: пат. 132069 Україна: МПК А61К 9/00, А61К 36/23, А61Р 7/04. № у 201809017; заявл. 30.08.18 ; опубл. 11.02.19, Бюл. № 3. (Особистий внесок – здійснення патентного пошуку, проведення експериментальних досліджень, оформлення патенту).

13. Легінь Н. І. Досвід використання підлісника європейського в народній медицині. *Сучасні проблеми медицини і фармації в наукових розробках студентів і молодих вчених*: матеріали 81-ої наук.-практ. конф. студентів і молодих вчених з міжнар. участю, 29 – 30 берез. 2012 р. Івано-Франківськ, 2012. С. 201.

14. Грицик Л. М., Легінь Н. І. Дослідження полісахаридів трави підлісника європейського. *Хімія природних сполук*: матеріали III Всеукр. наук.-практ. конф., 30 – 31 жовт. 2012 р. Тернопіль, 2012. С. 13 – 14. (Особистий внесок – виконання експериментальної частини з дослідження полісахаридного складу сировини підлісника європейського, узагальнення даних, оформлення тез до друку).

15. Легінь Н. І. Дослідження органічних кислот в траві та кореневищах з коренями підлісника європейського. *Інновації в медицині*: матеріали 82-ої наук.-практ. конф. студентів і молодих вчених з міжнар. участю, 18 – 19 квіт. 2013 р. Івано-Франківськ, 2013. С. 224.

16. Грицик Л. М., Легінь Н. І., Грицик А. Р. Одержання екстрактів підлісника європейського. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів*: матеріали 5-ї наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 27 – 28 верес. 2013 р. Тернопіль : Укрмедкнига, 2013. С. 34 – 35. (Особистий внесок – проведення експериментальних досліджень, узагальнення даних, оформлення тез до друку).

17. Грицик Л. М., Легінь Н. І. Поширення підлісника європейського на території Західної України. *Теоретичні і практичні аспекти дослідження лікарських рослин*: матеріали I міжнар. наук.-практ. internet-конф., 20 – 21 берез. 2014 р. Х. : Вид-во НФаУ, 2014. С. 178 – 179. (Особистий внесок – збір матеріалу, його аналіз, оформлення тез до друку).

18. Легінь Н. І. Ідентифікація біологічно активних речовин підлісника європейського. *Інновації в медицині*: матеріали 83-ої наук.-практ. конф. студентів і молодих вчених з міжнар. участю, 27 – 28 берез. 2014 р. Івано-Франківськ, 2014. С. 196.

19. Грицик Л. М., Легінь Н. І., Грицик А. Р. Ідентифікація деяких біологічно активних речовин у надземних і підземних органах підлісника європейського *Sanicula europaea* L. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології та біотехнології*: матеріали IV наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 16 – 17 жовт. 2014 р. Х. : Вид-во НФаУ, 2014 С. 88. (Особистий внесок – проведення експериментальних досліджень, узагальнення даних, оформлення тез до друку).

20. Грицик Л. М., Легінь Н. І., Грицик А. Р. Дослідження гемостатичної активності екстрактів підлісника європейського. *Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії*: матеріали I Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., 7 – 8 листоп. 2014 р. Х. : НфаУ, 2014. С. 56 – 57. (Особистий внесок – проведення експериментальних досліджень, узагальнення даних, оформлення тез до друку).

21. Легінь Н. І. Визначення вмісту окиснюваних фенолів в сировині підлісника європейського. *Інновації в медицині*: матеріали 84-ої наук.-практ. конф. студентів і молодих вчених з міжнар. участю, 12 – 13 берез. 2015 р. Івано-Франківськ, 2015. С. 170 – 171.

22. Перспективи використання підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) та астранції великої (*Astrantia major* L.) в медицині та фармації / Л. М. Грицик, Н. І. Легінь, Т. І. Коляджин, А. Р. Грицик. Івано-Франківськ : Супрун В. П., 2017. 100 с. (Особистий внесок – збір матеріалів, узагальнення одержаних даних, оформлення монографії до друку).

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	29
ВСТУП.....	31
РОЗДІЛ 1 ПІДЛІСНИК ЄВРОПЕЙСЬКИЙ – ПЕРСПЕКТИВНА ЛІКАРСЬКА РОСЛИНА (огляд літератури).....	39
1.1 Ботанічна характеристика та розповсюдження рослин роду Підлісник.....	39
1.2 Хімічний склад.....	45
1.3 Фармакологічні властивості та застосування в медицині	51
Висновки до розділу 1.....	53
РОЗДІЛ 2 МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	55
2.1 Вибір загальної методології досліджень.....	55
2.2 Об'єкти дослідження.....	57
2.3 Методи дослідження.....	58
2.3.1 Ідентифікація БАР у траві та кореневищах з коренями підлісника європейського	58
2.3.2 Виявлення БАР у сировині підлісника європейського хроматографічними методами аналізу та виділення індивідуальних сполук.....	61
2.3.3 Дослідження амінокислотного складу сировини підлісника європейського.....	65
2.3.4 Ідентифікація та кількісне визначення мінерального складу.....	66
2.3.5 Ідентифікація та визначення кількісного вмісту фенольних сполук методом ВЕРХ.....	66
2.3.6 Ідентифікація та кількісне визначення стероїдних сполук.....	68
2.3.7 Дослідження компонентного складу летких сполук....	69

2.3.8	Дослідження якісного складу та кількісного вмісту жирних кислот.....	70
2.3.9	Кількісне визначення груп біологічно активних речовин в сировині підлісника європейського.....	71
2.3.10	Дослідження гострої токсичності та фармакологічної активності екстрактів з сировини підлісника європейського.....	80
2.3.11	Дослідження морфолого-анатомічних ознак надземних та підземних органів підлісника європейського..	84
2.3.12	Ресурсознавчі дослідження.....	84
2.3.13	Дослідження числових показників доброякісності сировини.....	84
2.3.14	Визначення технологічних параметрів рослинної сировини.....	85
2.3.15	Статистична обробка результатів.....	87
РОЗДІЛ 3	ВИВЧЕННЯ СКЛАДУ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН ПІДЛІСНИКА ЄВРОПЕЙСЬКОГО.....	88
3.1	Дослідження якісного складу біологічно активних речовин.....	88
3.2	Хроматографічний аналіз біологічно активних речовин.....	91
3.3	Виділення та ідентифікація фенольних сполук з підлісника європейського	98
3.4	Дослідження амінокислотного складу сировини підлісника європейського.....	106
3.5	Дослідження жирнокислотного складу трави підлісника європейського.....	108
3.6	Ідентифікація та визначення кількісного вмісту фенольних сполук методом ВЕРХ.....	110

3.7 Дослідження компонентного складу летких сполук в траві підлісника європейського.....	118
3.8 Ідентифікація та кількісне визначення стероїдних сполук методом газової хроматографії/мас-спектрометрії..	121
3.9 Дослідження мінерального складу.....	122
3.10 Визначення кількісного вмісту біологічно активних речовин у сировині підлісника європейського.....	124
3.11 Дослідження вмісту груп біологічно активних речовин в залежності від місця зростання підлісника європейського	129
Висновки до розділу 3.....	133
РОЗДІЛ 4 ВИДІЛЕННЯ КОМПЛЕКСІВ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН ПІДЛІСНИКА ЄВРОПЕЙСЬКОГО ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ЇХ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ.....	136
4.1 Встановлення технологічних параметрів сировини підлісника європейського.....	136
4.2 Встановлення параметрів екстракції біологічно активних речовин з сировини підлісника європейського....	138
4.3 Одержання сумарних екстрактів підлісника європейського та їх характеристика.....	144
4.4 Дослідження фармакологічної активності екстрактів підлісника європейського.....	158
4.4.1 Вивчення гострої токсичності екстрактів.....	159
4.4.2 Дослідження антимікробної активності екстрактів	162
4.4.3 Дослідження кровоспинної та ранозагоювальної дії екстрактів.....	163
4.4.4 Дослідження протизапальної та антиексудативної активності екстрактів підлісника європейського	166
Висновки до розділу 4.....	168

РОЗДІЛ 5	РЕСУРСО-БІОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА РОЗРОБКА НОРМАТИВНОЇ ДОКУМЕНТАЦІЇ НА СИРОВИНУ ПІДЛІСНИКА ЄВРОПЕЙСЬКОГО.....	171
5.1	Морфолого-анатомічне дослідження підлісника європейського та встановлення основних діагностичних ознак надземних та підземних органів	171
5.2	Природні та антропогенні чинники поширення підлісника європейського.....	175
5.3	Фенологічні спостереження за розвитком підлісника європейського.....	181
5.4	Культивування підлісника європейського в умовах Прикарпаття.....	184
5.5	Числові показники доброякісності рослинної сировини. Розробка проєктів нормативної документації на рослинну сировину.....	188
5.6	Визначення термінів придатності сировини.....	195
	Висновки до розділу 5.....	199
	ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ.....	201
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	204
	ДОДАТКИ.....	222

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

S. – *Sanicula*;

АНД – аналітична нормативна документація;

ААС – атомно-абсорбційна спектрометрія;

БАР – біологічно активні речовини;

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія;

ВРПС – водорозчинні полісахариди;

ВСА – вісмут-сульфіт агар;

ГХ/МС – газова хроматографія з мас-спектрометрією;

Гц – геміцелюлоза;

ГцА – геміцелюлоза А;

ГцБ – геміцелюлоза Б;

ДФУ – Державна фармакопея України;

завв. – заввишки;

завд. – завдовжки;

завш. – завширшки;

ЖСА – жовтково-сольовий агар;

ІФНМУ – Івано-Франківський національний медичний університет;

ЛРС – лікарська рослинна сировина;

МКЯ – методи контролю якості;

МПА – м'ясо-пептонний агар;

п. – підлісник;

ПЄ_{к.к.}-70 – екстракт кореневищ з коренями підлісника європейського (екстрагент – 70 % етанол);

ПЄ_{к.к.}-В – екстракт кореневищ з коренями підлісника європейського (екстрагент – вода очищена);

ПЄ_{тр.}-70 – екстракт трави підлісника європейського (екстрагент – 70 % етанол);

ПЄ_{тр.}-В – екстракт трави підлісника європейського (екстрагент – вода очищена);

ПР – пектинові речовини;

ПХ – паперова хроматографія;

Т. пл. – температура плавлення;

ТШХ – тонкошарова хроматографія;

УФ – ультрафіолетова спектроскопія.

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження

За оцінками експертів, близько 25 % лікарських засобів, що застосовують у медичній практиці в усьому світі, отримують з лікарської рослинної сировини. Одним з важливих завдань фармації та медицини є дослідження нових перспективних джерел біологічно активних речовин (БАР) серед представників флори України з метою розширення асортименту рослинних препаратів різного спектру дії. Фітопрепарати характеризуються низькою токсичністю, що дозволяє використовувати їх тривалий час для профілактики та лікування багатьох захворювань без ризику виникнення побічних явищ.

Велику увагу привертають рослини, які здавна використовують у народній медицині України та країн Європи. До них належить підлісник (п.) європейський (*Sanicula (S.) europaea* L.).

До роду Підлісник (*Sanicula* L.) родини Селерові (*Apiaceae* Lindl.) належать близько 50 видів, з яких на території країн СНД зростають 3 види: п. червоноквітковий (*S. rubrifolia* Fr. Schmidt.), п. європейський (*S. europaea* L.), п. китайський (*S. chinensis* Bge.). В Україні зростає тільки п. європейський, поширений у Карпатах, на Правобережжі, на лівобережному Поліссі та у Криму, в тінистих, добре зволжених лісах.

У народній медицині п. європейський використовують як кровоспинний, протизапальний, ранозагоювальний, відхаркувальний, жовчогінний, в'язучий, сечогінний, седативний, антибактеріальний та протигрибковий засіб. Настій трави або відвар кореневищ з коренями вживають при легеневих, шлункових, кишкових, ниркових, маткових та гемороїдальних кровотечах, при запальних захворюваннях шлунково-кишкового тракту, бронхітах та пневмоніях. Зовнішньо його використовують при лікуванні свіжих та гнійних ран, юнацьких вугрів, фурункулів та карбункулів, при лікуванні опіків, обморожень та інших шкірних пошкодженнях. Сировину п. європейського використовують для полоскань і промивань при запаленні ясен, слизової оболонки рота і горла, при

ангінах, стоматитах тощо. Рослина в Україні є неофіційною і лікарські засоби на її основі відсутні на фармацевтичному ринку.

Широкий спектр використання п. європейського у народній медицині вказує на доцільність встановлення його хімічного складу, який на сьогодні вивчено недостатньо. Тому актуальним є фармакогностичне дослідження сировини п. європейського з метою одержання фармакологічно активних субстанцій різної спрямованості дії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота є фрагментом науково-дослідних робіт кафедри фармації Івано-Франківського національного медичного університету: «Дослідження деяких дикорослих і культивованих лікарських рослин західного регіону України та розробка лікарських засобів на їх основі» (номер державної реєстрації 0110 U 006205) та «Дослідження культивованих і дикорослих рослин західного регіону України та розробка технологій їх застосування з лікувальною метою» (номер державної реєстрації 0118 U 003809).

Мета і завдання дослідження

Метою роботи було фармакогностичне дослідження п. європейського та встановлення можливості створення лікарських засобів на основі БАР досліджуваної сировини.

Для досягнення поставленої мети вирішувались такі завдання:

- проведення інформаційного пошуку та аналізу даних літератури щодо ботанічної характеристики, розповсюдження, хімічного складу і застосування п. європейського у медицині;
- вивчення основних груп БАР п. європейського;
- виділення та ідентифікація БАР із сировини п. європейського;
- кількісне визначення вмісту БАР у сировині п. європейського;
- встановлення параметрів технологічного процесу отримання екстрактів із сировини п. європейського, одержання екстрактів та їх стандартизація;
- дослідження фармакологічних властивостей екстрактів;

- вивчення природних запасів, встановлення можливості культивування п. європейського;
- встановлення основних морфолого-анатомічних діагностичних ознак підземних та надземних органів п. європейського;
- визначення терміну придатності сировини на основі моніторингу показників якості трави п. європейського;
- розробка проєктів методів контролю якості на траву та екстракт, інструкції із заготівлі та сушіння трави п. європейського.

Об'єкти дослідження: трава, листки, стебла, кореневища з коренями п. європейського, екстракти, індивідуальні БАР, умови зростання рослини.

Предмет дослідження: виділення, ідентифікація БАР досліджуваних об'єктів, кількісне визначення вмісту БАР, розробка технологічних параметрів одержання сухих екстрактів, їх стандартизація та вивчення фармакологічної активності, культивування п. європейського.

Методи дослідження

Морфолого-анатомічні та органолептичні – опис та ідентифікація п. європейського; ресурсознавчі – виявлення масивів заростей п. європейського, встановлення біологічного запасу сировини; фізичні та фізико-хімічні – тонкошарова і паперова хроматографія, спектроскопія та спектрофотометрія в ультрафіолетовій і видимій областях спектру, атомно-абсорбційна спектрометрія; хімічні – ідентифікація і визначення кількісного вмісту діючих речовин; токсикологічні, фармакологічні та мікробіологічні – дослідження гострої токсичності, кровоспинної, ранозагоювальної, протизапальної та антимікробної активності. Статистичну обробку експериментальних даних проводили відповідно до вимог ДФУ 2.0 Т.1 «Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту» та «Статистичний аналіз результатів біологічних випробувань та тестів».

Наукова новизна отриманих результатів

Вперше було проведено фармакогностичні, фармакологічні та ресурсознавчі дослідження п. європейського.

Вперше у надземних та підземних органах п. європейського встановлено наявність основних груп БАР. Визначено кількісний вміст окиснюваних фенолів, суми поліфенолів, танінів, флавоноїдів, тритерпенових сапонінів, гідроксикоричних та органічних кислот, в тому числі кислоти аскорбінової, вітаміну K_1 .

Вперше виділено та встановлено кількісний вміст фракцій водорозчинних полісахаридів (ВРПС), пектинових речовин (ПР), геміцелюлози А (ГцА) та геміцелюлози Б (ГцБ) у траві та кореневищах з коренями п. європейського; встановлено їх мономерний склад.

Вперше у траві п. європейського ідентифіковано 10 фенольних сполук: 6 метаболітів таніну – галокатехін, катехін, епікатехін, катехіну галат, епікатехіну галат, елагову кислоту; 2 флавоноїди – кемпферол, апігенін; кумарин; ферулову кислоту; 3 сполуки стероїдної природи – β -ситостерол, стигмастан-3,5-дієн, стигмастерол; у складі ефірної олії 13 компонентів летких сполук – β -патчулен, β -кедрен, транс- α -бергамотен, β -хелміскапен, α -кадінен, α -муурулен, бісаболен, (-)-каламенен, 1-метил-6-метиленбіцикло[3.2.0] гептан, гептакозан, 4,11-селінадієн, гексагідрофарнезилацетон; жирні кислоти – пальмітолеїнову, пальмітинову, лінолеву, ліноленову, стеаринову, бегенову, трикозанову, лігноцеринову, церотинову; амінокислоти – треонін, валін, метіонін, ізолейцин, лейцин, фенілаланін, лізин, гістидин, аспарагінову та глютамінову кислоти, серин, пролін, цистин, гліцин, аланін, тирозин, аргінін.

В кореневищах з коренями вперше виявлено 11 фенольних сполук: 7 метаболітів таніну – галову та елагову кислоти, галокатехін, епігалокатехін, катехін, епікатехін, епікатехіну галат; апігенін; кумарин; 2 гідроксикоричні кислоти – кофейну, ферулову; амінокислоти – треонін, валін, метіонін, ізолейцин, лейцин, фенілаланін, лізин, гістидин, аспарагінова та глютамінова кислоти, серин, пролін, цистин, гліцин, аланін, тирозин, аргінін.

Вперше методами рідинно-рідинного фракціонування, хроматографії на колонках силікагелю, препаративної хроматографії на папері, дробної кристалізації з трави п. європейського виділено в індивідуальному стані

6 гідроксикоричних кислот (кофейну, хлорогенову, неохлорогенову, розмаринову, ферулову, *n*-кумарову) та 1 флавоноїд (рутин); з підземних органів п. європейського – 5 гідроксикоричних кислот (кофейну, хлорогенову, неохлорогенову, розмаринову, ферулову).

Вперше досліджено елементний склад трави та кореневищ з коренями п. європейського.

Вперше встановлено морфолого-анатомічні діагностичні ознаки сировини п. європейського, числові показники доброякісності трави п. європейського, які використано для ідентифікації та стандартизації рослинної сировини.

Виявлено місця зростання рослини на території Івано-Франківської та Чернівецької областей. Вперше визначено запаси сировини п. європейського на Прикарпатті та Буковині. На основі проведених фенологічних та агротехнічних досліджень встановлено можливість культивування п. європейського в умовах Прикарпаття.

Новизну досліджень підтверджено та захищено патентом України на корисну модель № 132069 «Спосіб одержання екстракту з трави підлісника європейського з кровоспинною дією».

Практичне значення одержаних результатів

Отримані результати фармакогностичного дослідження вказують на можливість використання сировини п. європейського як перспективного джерела БАР з кровоспинними та ранозагоювальними властивостями.

Досліджено параметри екстракції БАР, отримано 4 сухі екстракти з сировини п. європейського. Доведено можливість використання екстрактів трави п. європейського як лікарських засобів з кровоспинною, ранозагоювальною, протизапальною та антимікробною дією.

Розроблено проекти методів контролю якості (МКЯ) «Підлісника європейського трава», «Підлісника європейського трави екстракт сухий» та «Інструкцію із заготівлі та сушіння трави підлісника європейського».

За матеріалами дисертаційної роботи видано монографію «Перспективи використання підлісника європейського (*Sanicula europea* L.) та астранції

великої (*Astrantia major* L.) в медицині та фармації», яку разом з іншими результатами досліджень впроваджено в навчальний процес кафедри хімії природних сполук Національного фармацевтичного університету; кафедри фармакогнозії з медичною ботанікою ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет ім. І. Я. Горбачевського МОЗ України»; кафедри фармації ДВНЗ «Буковинський державний медичний університет»; кафедри фармацевтичної хімії та фармакогнозії Київського медичного університету; кафедри контролю якості і стандартизації лікарських засобів Національної медичної академії післядипломної освіти імені П. Л. Шупика; кафедри фармакогнозії і ботаніки Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького; кафедри фармакогнозії, фармацевтичної хімії та технології ліків ФПО Запорізького державного медичного університету; кафедри фармації Івано-Франківського національного медичного університету; кафедри ботаніки Національного фармацевтичного університету; кафедри фармакогнозії, фармакології та ботаніки Запорізького державного медичного університету; кафедри фармакогнозії Національного фармацевтичного університету; кафедри фармацевтичної хімії та фармакогнозії ДЗ «Луганський державний медичний університет» (акти впровадження від 07.02.2018, 19.02.2018, 20.02.2018, 22.02.2018, 23.02.2018, 26.02.2018, 05.03.2018, 20.03.2018, 22.03.2018, 06.04.2018, 18.04.2018, 15.05.2018 рр. відповідно), практичну роботу випробувального центру ДП «Івано-Франківськстандартметрологія» та ТОВ «Фітолік» (акти впровадження від 14.03.2018 та 16.03.2018 р. відповідно).

Особистий внесок здобувача

Безпосередньо автором проведено патентно-інформаційний пошук та аналіз сучасного стану досліджень за темою дисертаційної роботи; виділено та ідентифіковано БАР, встановлено кількісний вміст основних груп БАР в траві та кореневищах з коренями п. європейського в залежності від місця зростання; опрацьовано оптимальні технологічні параметри одержання екстрактів з трави та кореневищ з коренями п. європейського та проведено їх стандартизацію;

досліджено фармакологічну активність та токсичність екстрактів п. європейського; встановлено морфолого-анатомічні діагностичні ознаки надземних та підземних органів п. європейського; виявлено масиви заростей п. європейського, встановлено урожайність, біологічний запас сировини; розроблено проєкти МКЯ «Підлісника європейського трава», «Підлісника європейського трави екстракт сухий» та «Інструкції із заготівлі та сушіння трави підлісника європейського».

Результати досліджень самостійно проаналізовано та систематизовано, оформлено у вигляді таблиць, рисунків, схем, актів впровадження, проєктів МКЯ, фотознімків. Постановка мети та завдань, обговорення результатів проведені разом з науковим керівником.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи викладено та обговорено на 81-ій науково-практичній конференції студентів і молодих вчених з міжнародною участю “Сучасні проблеми медицини і фармації в наукових розробках студентів і молодих вчених” (Івано-Франківськ, 2012); III Всеукраїнській науково-практичній конференції «Хімія природних сполук» (Тернопіль, 2012); Міжнародній міждисциплінарній науково-практичній конференції «Вода і здоров’я людини» (Ужгород, 2013); 82-ій, 83-ій, 84-ій науково-практичних конференціях студентів і молодих вчених з міжнародною участю “Інновації в медицині” (Івано-Франківськ, 2013, 2014, 2015); 5-ій науково-практичній конференції з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (Тернопіль, 2013); I міжнародній науково-практичній internet-конференції «Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин» (Харків, 2014); XI науково-практичній конференції за участю міжнародних спеціалістів «Слобожанські читання. Медичне та фармацевтичне право України: інновації, якість, безпека та перспективи розвитку» (Харків, 2014); IV науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні досягнення фармацевтичної технології та біотехнології» (Харків, 2014); I міжнародній науково-практичній internet-конференції «Технологічні та біофармацевтичні

аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії» (Харків, 2014); VIII міжнародній міждисциплінарній науково-практичній конференції «Сучасні аспекти збереження здоров'я людини» (Ужгород, 2015); II міжнародній науковій конференції «Агробіорізноманіття для покращення харчування, здоров'я та якості життя» (Nitra, 2015).

Апробацію дисертаційної роботи проведено на спільному засіданні професорсько-викладацького складу Івано-Франківського національного медичного університету та Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького 11 листопада 2020 року.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 22 наукові праці, у тому числі 11 статей (із них 6 – у фахових наукових виданнях України та 2 в іноземних виданнях), 1 патент України на корисну модель, 1 монографію і 9 тез доповідей.

Обсяг та структура дисертації. Дисертаційну роботу викладено на 260 сторінках машинописного тексту (обсяг основного тексту – 186 сторінок), вона складається з анотації, вступу, огляду літератури, експериментальної частини, яка містить розділ з описом об'єктів і методів дослідження та три розділи з результатами експериментальних досліджень, загальних висновків, списку використаних джерел та додатків. Дисертацію ілюстровано 31 рисунком та 54 таблицями. Список використаних джерел містить 160 найменувань, з яких 121 кирилицею та 39 латиною.

РОЗДІЛ 1
ПІДЛІСНИК ЄВРОПЕЙСЬКИЙ – ПЕРСПЕКТИВНА
ЛІКАРСЬКА РОСЛИНА
(огляд літератури)

1.1 Ботанічна характеристика та розповсюдження рослин роду Підлісник

До родини Селерові (*Apiaceae* Lindl.) належить близько 470 родів та 4050 видів рослин, поширених по всій земній кулі. Рід Підлісник налічує близько 50 видів, з яких на території країн СНД зростає 3 види: п. червоноквітковий (*S. rubrifolia* Fr. Schmidt.), п. європейський (*S. europaea* L.), п. китайський (*S. chinensis* Bge.); в Україні зростає тільки п. європейський [1, 2].

Назва рослини підлісник – *Sanicula* – походить від латинського слова *sano*, що означає «загоює», «зцілює» і в середньовічні часи це було відтворено в народній приказці «Celui qui sanicle a De mire affaire il n'a», що в перекладі означає «Той, хто має Sanicle не потребує хірурга» [3]. Народна назва – черевна трава, лікувальний зонтик.

Рослини роду Підлісник – це багаторічні та дворічні трав'янисті рослини з пальчасто-роздільними листками, частки яких надрізані та плівчасто-зубчасті. Квітки зібрані в прості зонтики, чоловічі – зовнішні, на ніжках; жіночі – сидячі. Чашечка з зубцями. Пелюстки виїмчасті, із загнутою кінцевою частинкою. Плід майже кулястий, густо вкритий гачкуватими шипиками [1, 2].

Види роду *Sanicula* L., за даними «Флори СРСР», за морфологічними ознаками поділяються на 2 секції [2].

Секція 1 – *Erythrosana* Baill. Hist., до якої належить п. червоноквітковий. Рослина має листочки з великими обгортками, пелюстки темно-червоні, плід розташований зверху і покритий гачкоподібними шипами [2].

П. червоноквітковий (*S. rubrifolia* Fr. Schmidt.) – багаторічна трав'яниста рослина з товстим кореневищем. Стебло пряме, 40 – 60 см заввишки (завв.) іноді до 1 м. Прикореневі листки в кількості 2 – 8, на тонких довгих черешках, які в

кілька разів довші за пластинки, останні майже трироздільні, 6 – 10 см завдовжки (завд.) і 4 – 8 см завширшки (завш.). Суцвіття до 10 см в довжину, листові обгортки ланцетні або лінійні до 3 см завд. і 4 мм завш. Пелюстки темно-червоні, серцеподібні. Плід майже сидячий, яйцеподібний, чашечка з зубцями 5 – 6 мм завд. [2].

Секція 2 – *Eusanicula* Wolff in Pflzr., до якої належить п. європейський та п. китайський. Рослини мають листочки з маленькими обгортками, пелюстки блідо-зелені, плід біля основи покритий гачкоподібними шипами [2].

П. європейський (*S. europaea* L.) – багаторічна трав'яниста рослина з повзучим коротким кореневищем і придатковими коренями. Стебло прямостояче, просте, 20 – 50 см завв. Прикореневі листки довгочерешкові, пальчатороздільні, з 3 – 5 обернено яйцеподібними дво- або тринадрізними пилчастими частками з зубцями, що закінчуються щетинкою; стеблові – трироздільні короткочерешкові або сидячі, дрібні. Квітки дрібні, 5-пелюсткові, двостатеві (сидячі) і тичинкові (на квітконіжках), у головчастих суцвіттях, зібраних у 3 – 5-променеви зонтик, оточений обгорткою з ланцетних, зубчастих або перистороздільних листочків; пелюстки білі до блідо-рожевих, виїмчасті, з довгою увігнутою всередину верхівкою. Плід – двосім'янка [1, 2, 4 – 18].

П. китайський (*S. chinensis* Bge.) – багаторічна трав'яниста рослина. Стебло 50 – 100 см завв., пряме, внизу просте, гіллясте, з гілочками, що закінчуються зонтиками. Прикореневі листки на довгих черешках, 20 – 35 см завд., пластинка округла, 3 – 5-роздільна, обернено яйцеподібна і трироздільна. Верхні листки менші, ланцетні. Листкові обгортки в кількості 5 – 7, нерівні, ланцетні, надрізані. В зонтику 1 – 2 тичинкові квітки, на коротких квітконіжках, пелюстки довжиною до 1 мм. Маточкові квітки сидячі, в кількості 3 – 4, їх пелюстки дещо більші, зеленуваті. Напівплодики 4 мм завдовжки, знаходяться в міжреберних каналцях [2].

У «Флорі Сибіру» описаний ще один вид роду Підлісник – *S. giraldii* H. Wolff – п. Жиральді. Це багаторічна трав'яниста рослина 40 – 80 см завв. з коротким кореневищем і придатковими коренями. Стебла голі. Черешки

прикореневих листків щільні, з виїмкою. Листкова пластинка серцеподібна, пальчасто-роздільна, гола. Стеблові листки трійчасті, сидячі. Квітки або двостатеві, або чоловічі. Пелюстки білі, голі, на кінці цілі, загнуті всередину, загострені. Плоди овальні, покриті білими глохідіями [8].

Відмітні морфологічні ознаки рослин роду Підлісник представлені в табл. 1.1.

Таблиця 1.1

Морфологічні ознаки видів роду Підлісник

Діагностичні ознаки	Підлісник європейський	Підлісник червоноквітковий	Підлісник китайський
1	2	3	4
Прикореневі листки	Пальчастороздільні на довгих черешках, з обернено яйцеподібними, з 2 – 3 надрізними, пилчастими частками, що мають зубці та закінчуються щетинкою	Трироздільні в кількості 2 – 8, середня частка обернено яйцеподібно-клиноподібна	Пластинка майже округла, 3 – 5 роздільна, обернено яйцеподібна, тринадрізна, з загостреними зубцями
Стеблові листки	3-роздільні, сидячі, дрібні	Сидячі, майже рівні з прикореневими листками	Менші за прикореневі листки з ланцетними частками
Стебло	Прямостояче, просте, вгорі розгалужене, 40 – 80 см завв.	Пряме, 40 – 60 см завв., іноді до 1 м, з 2 – 8 прикореневими листками	50 – 100 см завв., пряме, внизу просте, вище середини розгалужене
Квітки	Квітки в головчастих суцвіттях, що зібрані в 3 – 5-променеві зонтики.	Суцвіття – зонтик. Пелюстки темно-червоні, широко серцеподібні	Суцвіття – зонтик. Пелюстки зеленуваті

1	2	3	4
Квітки	Зонтик з обгорткою. У середніх головках квітки сидячі, двостатеві, у крайових – на квітконіжках, тичинкові. Зубці чашечки ланцетні, такої самої довжини, як пелюстки. Пелюстки від білого до блідо-рожевого кольору, виїмчасті, з довгою увігнутою всередину верхівкою	Суцвіття – зонтик. Пелюстки темно- червоні, широко серцеподібні	Суцвіття – зонтик. Пелюстки зеленуваті
Плоди	Плід – двосім'янка. Сім'янка яйце- подібно-кулеподібна, 4 – 5 мм завд., покрита гачкуватими шипи- ками	Плід – двосім'янка. Сидячі, яйцеподібні завд. 5 – 6 мм з зубцями, напівплодики зі спини сильно випуклі, зверху з загнутими гачкуватими 5 пластинками, канальці дуже великі	Плід – двосім'янка. Міжреберних канальців 5

Таким чином, відмітними діагностичними ознаками видів роду Підлісник є довжина стебла; будова листкової пластинки; забарвлення пелюсток квіток; форма плода.

Стебло у п. європейського просте, 40 – 80 см завв.; у п. червоноквіткового – 40 – 100 см; у п. китайського – 50 – 100 см. Листки *S. europaea* L. – пальчатороздільні на довгих черешках, з 2 – 3 надрізними пилчастими часточками, що закінчуються щетинкою; листки *S. rubrifolia* Fr. Schmidt. – трироздільні, середня частка обернено яйцеподібно-клиноподібні; листки *S. chinensis* Bge. – округлі, 3 – 5 роздільні, обернено яйцеподібні, з загостреними зубцями. Пелюстки квіток у п. європейського від білого до блідо-рожевого кольору, у п. червоноквіткового – темно-червоні, у п. китайського – зеленуваті; плоди *S. europaea* L. – яйцеподібно-кулеподібні з гачкуватими шипами, плоди *S. rubrifolia* Fr. Schmidt. – яйцеподібні з зубцями, плоди *S. chinensis* Bge. мають 5 міжреберних каналців [1 – 7].

Рослини роду Підлісник широко розповсюджені в природі [1 – 9].

П. європейський зростає в тінистих широколистих, рідше змішаних і хвойних лісах. Поширений в Європі, Західному Сибіру, Північній Африці, Західній Азії до Гімалаїв і Цейлону, на Кавказі [1, 2, 8, 9, 11 – 15].

П. червоноквітковий зростає на берегах річок та в лісах. Поширений на Далекому Сході [2].

П. китайський зростає на берегах лісових річок, в лісах та заростях кущів. Поширений на Далекому Сході [2, 19].

П. Жиральді зростає в соснових, сосново-осикових лісах, трав'яних борах. Поширений на Приураллі, в Китаї [8].

На території України *S. europaea* L. поширений у Карпатах і на Правобережжі (східна межа проходить через Київ – Житомир – Вінницю – Гайсин – Ольгопіль – Ямпіль), на лівобережному Поліссі (на вододілі Дніпра та Десни) і в Криму, де зростає поодинокі в тінистих лісах [4 – 6, 9 – 14].

В Карпатах п. європейський зростає на схилах передгір'я Чорногори в ялицево-ялиново-букових лісах, на зрубках Горган в чагарниках в ультратіньовій зоні разом з *Oxalis acetosella* L., *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott), *Dryopteris carthusiana* (Vill.) H.P.Fuchs, *Dryopteris austriaca* (Jacq.) Woytar, *Phegopteris connectilis* (Michx.) Watt, *Mercurialis perennis* L., *Paris quadrifolia* L.,

Gymnocarpium robertianum (Hoffm.) Newm., у Буковинському Прикарпатті у трав'яному ярусі разом з *Asarum europaeum* L., *Galium odoratum* (L.) Scop., *Majanthemum bifolium* (L.) F.W. Schmidt, *Hedera helix* L., *Pulmonaria obscura* Dumort., *Lamium galeobdolon* (L.) L., *Viola reichenbachiana* Jord. ex Boreau, *Athyrium filix-femina* (L.) Roth, *Mycelis muralis* (L.) Dumort., *Oxalis acetosella* L. та інших видів [20 – 22].

На території ДП «Калуське лісове господарство» п. європейський зростає у живому надґрунтовому покриві з копитняком європейським, маренкою запашною, осокою волосистою, медункою темною, зірочником гайовим та лісовим, купиною багатоквітковою, підмаренником запашним, фіалкою запашною та дивною, калюжницею болотною, підбілом звичайним, кропивою дводомною та іншими [23].

На Розточчі п. європейський зростає поряд з копитняком європейським, яглицею звичайною, зірочником лісовим, маренкою запашною, медункою темною, пшінкою весняною, купиною багатоквітковою [24].

У флорі Західного Полісся у межах Волинської обл. у дубово-грабових лісах з багатими ґрунтами як асектатори трапляються *S. europaea* L., *Euphorbia angulata* Jacq., *Pulmonaria mollis* Wulf. ex Hornem. [25].

У північних районах Сумської та Чернігівської областей виявлено місця зростання рідкісних і малопоширених видів рослин, серед яких є п. європейський [26].

Працівниками кафедри ботаніки, фізіології рослин і агробіотехнології Російського університету дружби народів було проведено дослідження особливості онтогенезу і структури популяцій п. європейського. Дослідження проводили на дослідних ділянках в природно-історичному парку «Битцевский лес». Аналізували по 10 особин різного вікового стану, у яких були виміряні і проаналізовані наступні параметри: довжина і ширина сім'ядолей, висота рослини, глибина кореневої системи, кількість і розмір долей листка, кількість суцвіть [27].

На території природно-історичного парку «Битцевский лес» були проведені спостереження і дослідження вікової популяційної структури п. європейського і встановлена вікова структура кожної ценопопуляційної групи даного виду. Дані дослідження свідчать про стійкість популяційних позицій. Встановлено, що популяційні групи *S. europaea* L. розвиваються не тільки в добре освітлених місцях, але й в затемнених фітоценозах [28].

Вченими Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu (Uniwerytet Przyrodniczy w Poznaniu) (Польща) було проведено флористичне дослідження заповідника „Jezioro Daisy”, який є затопленими кар’єром вапняку. За результатами дослідження було встановлено, що флора судинних рослин заповідника „Jezioro Daisy” та його найближчих околиць об’єднує 53 родини. Родина *Apiaceae* представлена наступними видами: *Actea spicata* L., *Aegopodium podagraria* L., *Alliaria petiolata* (M. Bieb.) Cavara & Grande, *Chaerophyllum aromaticum* L., *Daucus carota* L., *Pastinaca sativa* L., *Pimpinella saxifraga* L., *Sanicula europaea* L., *Torilis japonica* (Houtt.) DC. [29].

Враховуючи розповсюдження виду, можливість його культивування, перспективним є дослідження п. європейського, який зростає на території західного регіону України.

1.2 Хімічний склад

З літературних джерел відомо, що рослини роду Підлісник містять широкий спектр БАР, який представлений дубильними речовинами, флавоноїдами, органічними кислотами, сапонінами, полісахаридами, кумаринами, ефірною олією [9, 12, 19].

Підземні та надземні органи п. європейського вміщують різноманітні за хімічною будовою біологічно активні речовини: органічні кислоти; тритерпенові сапоніни: монодесмозиди кислі та нейтральні, санікулозиди А, В, С, D; азотовмісні сполуки; гідроксикоричні кислоти; вітаміни К та С; флавоноїди; дубильні та гіркі речовини; ефірну олію [9, 12, 19, 30, 31].

В кореневищах з коренями п. європейського містяться органічні кислоти: яблучна, лимонна, малінова, щавлева; тритерпенові сапоніни (3,3 – 5,5 %); азотовмісні речовини – алантоїн; гідроксикоричні кислоти і їх похідні: хлорогенова (0,8 %), розмаринова (1,4 %). Листки у своєму складі вміщують органічні кислоти: яблучну, лимонну, малінову, щавлеву; тритерпенові сапоніни (2,8 – 3,6 %); вітамін С; гідроксикоричні кислоти і їх похідні: хлорогенова 0,6 %, розмаринова (1,7 %); флавоноїди: кверцетин, ізокверцетин, рутин, астрагалін. Квітки та плоди містять органічні кислоти: яблучну, лимонну, малінову, щавлеву; тритерпенові сапоніни (3,0 – 3,6 %); гідроксикоричні кислоти і їх похідні: хлорогенова (0,95 і 1,05 %), розмаринова (3,1 і 1,1 %) відповідно. У плодах виявлено жирну олію, в склад якої входять петрозелінова (79,3 %), олеїнова і ліноленова кислоти [15, 19, 30, 31].

Хімічний склад деяких видів роду Підлісник представлено в табл. 1.2.

Таблиця 1.2

Хімічний склад деяких видів роду Підлісник

Назва ЛРС	Хімічний склад	Література
1	2	3
Підлісник європейський		
Підземна частина	Органічні кислоти: яблучна, лимонна, малінова, щавлева; гідроксикоричні кислоти та їх похідні: хлорогенова (0,8 %), розмаринова (1,4 %); тритерпенові сапоніни (3,3 – 5,5 %); азотовмісні сполуки: алантоїн.	15, 19, 30, 32
Надземна частина	Сапоніни; азотовмісні сполуки: алантоїн; флавоноїди: рутин, ізокверцетин, астрагалін.	15, 19, 30, 31, 35

Листки	Органічні кислоти: яблучна, лимонна, маленова, щавлева; компоненти ефірних олій: β -селінен (40,4 – 44,2 %), каріофілену оксид (17,9 – 1,2 %), α -селінен (3,7 – 4,0); тритерпенові сапоніни (2,8 – 3,6 %); вітамін С; гідроксикоричні кислоти та їх похідні: хлорогенова (0,6 %), розмаринова (1,7 %); флавоноїди: кверцетин, ізокверцетин, рутин, астрагалін.	15, 19, 30, 32 – 35
Квітки	Органічні кислоти: яблучна, лимонна, маленова, щавлева; тритерпенові сапоніни (3,0 – 3,6 %); гідроксикоричні кислоти та їх похідні: хлорогенова (0,95 %), розмаринова (3,1 %).	15, 19, 30, 32
Плоди	Органічні кислоти: яблучна, лимонна, маленова, щавлева; тритерпенові сапоніни (0,6 – 1,2 %); гідроксикоричні кислоти та їх похідні: хлорогенова (1,05 %), розмаринова (1,1 %); жирна олія: петрозелінова (79,3 %), олеїнова, лінолева кислоти.	14, 15, 19, 31
Підлісник китайський		
Корені	Сапоніни; кумарини (0,14 %).	19
Надземна частина	Ефірна олія (0,15 – 0,42 %).	19
Плоди	Жирна олія 25,2 %, яка містить кислоту петрозелінову (65,8 %).	19
Підлісник червоноквітковий		
Корені	Кумарини (0,04 %).	19

Milica Pavlović та співавтори (Сербія та Чорногорія, Греція) досліджували хімічний склад ефірних олій листя п. європейського за допомогою ГХ та ГХ/МС. Встановлено, що основними сполуками є β -селінен (40,4 – 44,2 %), каріофілен оксид (17,9 – 19,2 %) та α -селінен (3,7 – 4,0 %) [33].

Remigius Chizzola (Австрія) вивчав хімічний склад ефірних олій понад 150 видів рослин з 50 родів родини *Ariacaea* L. Компонентний склад ефірних олій в рослинах родини Селерові представлений монотерпенами, сесквітерпенами, дитерпенами, фенілпропаноїдами, складними ефірами, триметилбензальдегідами та аліфатичними альдегідами. Встановлено, що сировина п. європейського містить β -селінен, каріофілен оксид, як основні компоненти ефірних олій [34].

Nazlı Arda та співавт. (Туреччина) виділили з трави п. європейського новий глікозид тритерпенового сапоніну – санікулозид N, а також ідентифікували розмаринову та кофейну кислоти (рис. 1.1) [36].

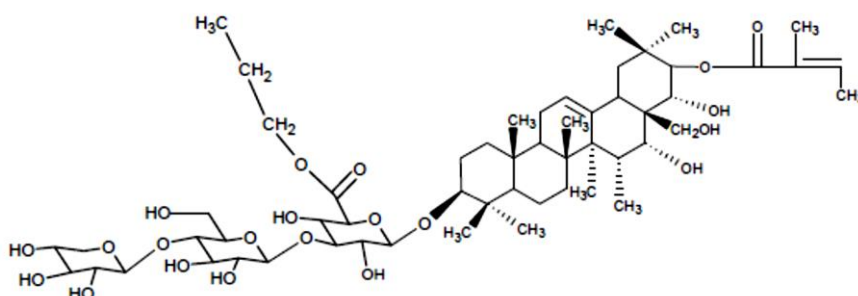


Рис. 1.1 Санікулозид N

У 1998 році вченими Фармацевтичного інституту Німеччини (м. Берлін) був виділений новий тритерпеновий сапонін з листків *S. europaea* L., а саме Санікулозид R-1. Його структуру було встановлено за допомогою ЯМР, мас-спектроскопії й хімічної дериватизації (рис. 1.2).

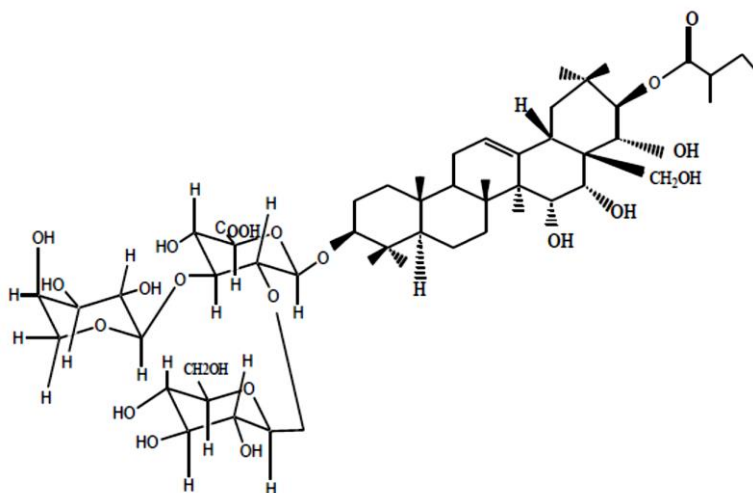


Рис. 1.2 Санікулозид R-1

Санікулодид R-1 – це білий аморфний порошок з температурою плавлення 182 – 185 °С, ТШХ: $R_f = 0,45$ в рухомій фазі хлороформ-метанол-вода (7:4:1) [35, 37].

Вперше китайськими вченими методом спектроскопії було ідентифіковано і встановлено хімічні структури п'ятнадцяти сесквітерпенів і норсесквітерпен, які були виділені з *S. lamelligera* L. (рис. 1.3) [38].

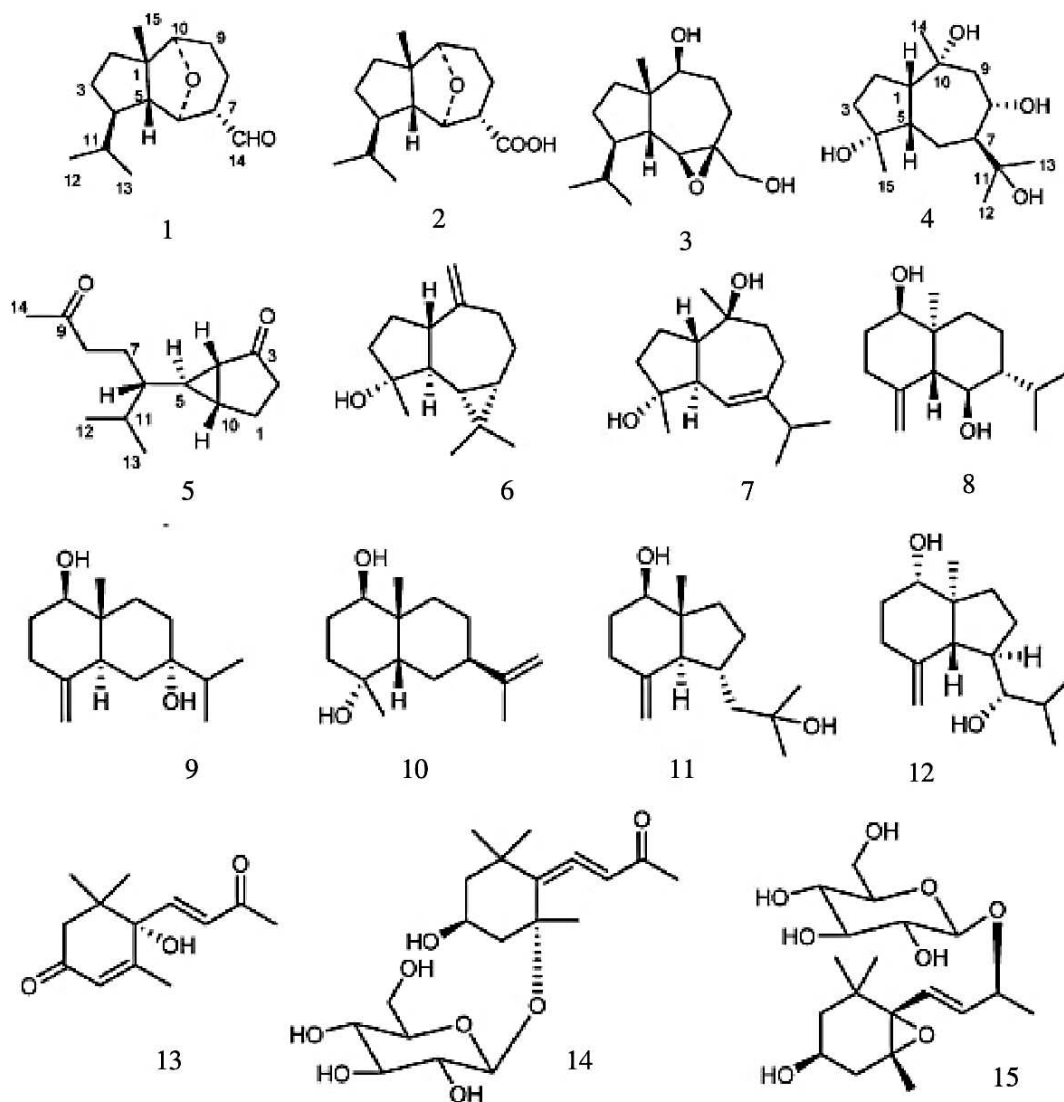
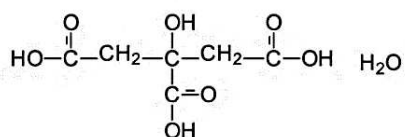
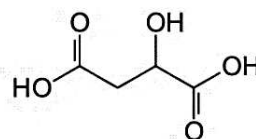


Рис. 1.3 Структурні формули сесквітерпенів виділених з *Sanicula lamelligera* L. 1 – санікулозид А, 2 – санікулозид 1А, 3 – санікулозид В, 4 – санікулозид С, 5 – санікулозид D, 6 – 1H-циклопропіл[е]азулен-7-ол, 7 – 1H-циклопропіл[е]азулен-7-ол-алісмоксид, 8 – 1,5-нафталендіол, 9 – 4(15)-еудисмен-1 α ,7 β -діол, 10 – циперизол С, 11 – оксіт-4(15)-ен-1 β ,11-діол, 12 – октагідро-4-гідрокси-3R-метил-7-метилен-R-(1-метилетил)-1H-інден-1-метанол, 13 – (6S)-дегідровоміфоліол, 14 – цитрозид В, 15 – фломорозид

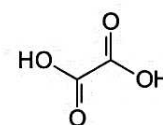
Формули деяких біологічно активних речовин рослин роду Підлісник наведено на рис. 1.4.



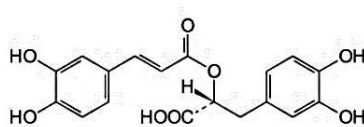
Кислота лимонна



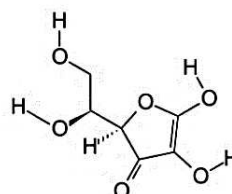
Кислота яблучна



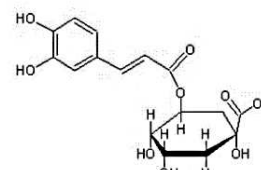
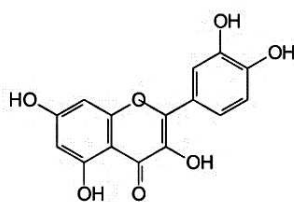
Кислота щавлева



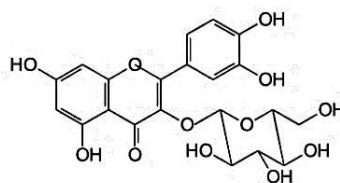
Кислота розмаринова



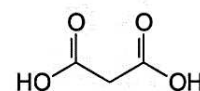
Кислота аскорбінова

Кислота
хлорогенова

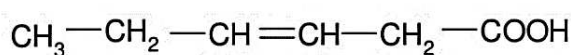
Кверцетин



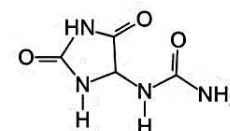
Ізокверцетин



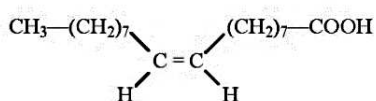
Кислота маленова



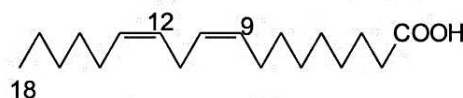
Кислота петрозелінова



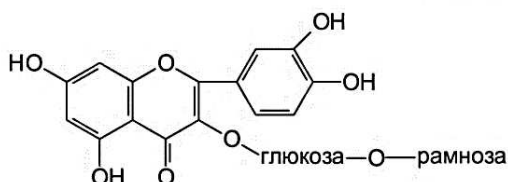
Алантиїн



Кислота олеїнова



Кислота лінолева



Рутин

Рис. 1.4 Основні діючі речовини рослин роду Підлісник

У Франції п. європейський використовують як гомеопатичний засіб. Стандартизацію матричної настойки трави п. європейського проводять методом

ТШХ, а саме ідентифікацію гідроксикоричних кислот (хлорогенової, кофейної, розмаринової кислот) проводять в системах розчинників вода-метанол-оцтова кислота-метиленхлорид (2:3:8:15) та етилацетат-вода-пропанол (30:30:40) в порівнянні з вірогідними зразками гідроксикоричних кислот [39].

Аналіз даних літератури свідчить, що п. європейський є цінним джерелом біологічно активних речовин. Дослідження хімічного складу та кількісного вмісту БАР п. європейського в Україні не проводилися. Тому актуальним є фітохімічне дослідження сировини п. європейського як джерела БАР.

1.3 Фармакологічні властивості та застосування в медицині

В Україні п. європейський є неофіційною рослиною, його використовують тільки в народній медицині та гомеопатії. До фармакопеї Франції включена монографія на сировину п. європейського (*S. europaea* for homeopathic preparations).

Народна медицина пропонує використовувати п. європейський як кровоспинний, ранозагоювальний, протизапальний, жовчогінний, сечогінний, відхаркувальний, седативний, антимікробний, протигрибковий та в'яжучий засіб. Настій трави або відвар кореневищ з коренями вживають при легневих, шлункових, кишкових, ниркових, маткових та гемороїдальних кровотечах, при запальних захворюваннях шлунково-кишкового тракту, бронхітах та пневмоніях. Зовнішньо його використовують при лікуванні свіжих та гнійних ран, юнацьких вугрів, фурункулів та карбункулів. Як припарки *S. europaea* L. використовують при лікуванні опіків, обморожень та інших шкірних пошкодженнях. Також сировину використовують для полоскань і промивань при запаленні ясен, слизової оболонки рота і горла, при ангінах, стоматитах тощо [7, 10, 14, 40 – 42].

Настойка кореневищ з коренями вважається засобом, який посилює статеву функцію у чоловіків. Екстракти з надземних органів п. європейського використовують для загоєння ран і зупинки кровотечі [7, 10, 42].

У Чехії екстракти з сировини *S. europaea* L. використовують при лікуванні ран, які погано загоюються; на Кавказі – при респіраторних захворюваннях та як ранозагоювальний засіб; в Болгарії – при шкірних захворюваннях [19].

В народній медицині Румунії використовують настої та відвари з надземних і підземних органів п. європейського як відхаркувальний, жовчогінний, сечогінний, седативний засоби, а також при ниркових захворюваннях, розладах нервової системи. Зовнішньо використовують для кращого загоєння ран [43].

Нідерландський вчений Е. F. Steinmetz (доктор філософії) зазначає, що настій з трави п. європейського використовують при кровотечах легень та інших внутрішніх органів, при гемороїдальних кровотечах, а також при рясних менструальних виділеннях [44].

Німецькі дослідники встановили, що *S. europaea* L. проявляє м'яку в'язучу, відхаркувальну, антимікробну та протигрибкову дії [45].

Екстракт п. європейського, при інтрагастральному введенні щурам, виявляє виражену протизапальну дію, про що свідчить зниження запальних реакцій після ін'єкції в задню лапу щура натрієвої солі нуклеїнової кислоти або овальбуміну [46].

Австрійськими вченими досліджено протизапальну активність *in vitro* метанольних і дихлорметанових екстрактів коренів п. європейського. Встановлено, що екстракти зменшують утворення інтерлейкіну-8 і Е-селектину, тому володіють сильними протизапальними властивостями [47].

Вченими інституту географії імені В. Б. Сочави Сибірського відділення РАН за допомогою статистичного критерію Фішера досліджено 674 види рослин, які застосовують при 21 вірусній інфекції. Встановлено, що за оцінкою зв'язку «таксон-інфекція» і «захворювання-захворювання» *S. europaea* L. доцільно використовувати при респіраторних інфекціях [48].

Алі Karagöz та співавтори (Туреччина, Японія) дослідили активність екстрактів п. європейського щодо вірусу грипу людини типу 2 (HPIV-2). Встановлено, що водний екстракт з листків п. європейського виявляє протівірусний ефект, тоді як етанольний екстракт (екстрагент – 50 % етанол) не має такої дії [49].

Kadir Turan та співавтори (Туреччина, Японія) вивчали противірусну дію екстрактів з листя *S. europaеа* L. на клітини, що інфіковані вірусом грипу A/PR/8/34 та B/Lee/40. Встановлено, що екстракти п. європейського пригнічують ріст клітин грипу A/PR/8/34, що вказує на присутність лікарських речовин, які проявляють противірусну дію [50].

Вченими Німеччини проведено дослідження гомеопатичного препарату RICURA® spag. Reka N., до складу якого входить п. європейський, при лікуванні гострих синуситів. За результатами дослідження було встановлено, що RICURA® spag. Reka N. позитивно впливає на перебіг захворювання і рекомендований для застосування при неускладнених риносинуситах [51].

Відділом охорони здоров'я і старіння (Австралія) дозволено застосовувати гомеопатичні засоби, які включено до Британської та Індійської фармакопей, до складу яких входить п. європейський [52].

В гомеопатичній практиці США, Європи та Індії сировину п. європейського використовують як в'язучий засіб [53].

Українська компанія «Нутрімед» розробила фітокомплекс «Камавіт» для лікування урологічних захворювань у чоловіків. До складу гомеопатичного препарату входить: айр болотний, квітковий пилок, ехінацея пурпурова, імбир, лимонник китайський, ярутка польова, п. європейський. «Камавіт» вміщує БАР, які позитивно впливають на функціональний стан центральної нервової системи та рекомендований для застосування при порушенні сексуальної функції чоловіків. В рекомендованих дозах фітокомплекс не впливає на систему гемодинаміки, показники периферичної крові, функцію печінки й нирок, тому він може бути рекомендованим для комплексного лікування сексуальних розладів у чоловіків [54].

Висновки до розділу 1

П. європейський розповсюджений на території України, проявляє різноманітну фармакологічну дію і використовується в народній медицині. Однак, методи виділення біологічно активних речовин з лікарської рослинної

сировини та можливості використання в медицині п. європейського не вивчено, лікарські форми на основі обраної рослинної сировини в Україні відсутні.

Тому виділення і дослідження діючих речовин п. європейського, вибір методів стандартизації, встановлення показників якості, а також спроможності використання в науковій медицині є актуальним.

Результати даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Пошук перспективних джерел лікарських засобів з кровозупинною дією / Л. М. Грицик, І. Л. Бензель, Н. І. Легінь, Н. І. Тучак, О. В. Нейко, І. А. Сас, А. Р. Грицик. *Актуальні проблеми профілактичної медицини: зб. наук. праць (Присвячується 80-річчю від дня народження професора М. Й. Гжегоцького та 25-річчю заснування лабораторії промислової токсикології)*. Львів, 2012. № 10. С. 52 – 59.

2. Перспективи використання підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) та астранції великої (*Astrantia major* L.) в медицині та фармації / Л. М. Грицик, Н. І. Легінь, Т. І. Коляджин, А. Р. Грицик. Івано-Франківськ : Супрун В. П., 2017. 100 с.

3. Легінь Н. І. Досвід використання підлісника європейського в народній медицині. *Сучасні проблеми медицини і фармації в наукових розробках студентів і молодих вчених*: матеріали 81-ої наук.-практ. конф. студентів і молодих вчених з міжнар. участю, 29 – 30 берез. 2012 р. Івано-Франківськ, 2012. С. 201.

РОЗДІЛ 2

МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Вибір загальної методології досліджень

Лікарські рослини є невичерпним джерелом для створення нових лікарських засобів для лікування та профілактики різноманітних захворювань. Пошук перспективних джерел біологічно активних речовин серед дикорослих і культивованих рослин України з багатим хімічним складом, широким спектром дії та достатньою сировинною базою є актуальним завданням сучасної наукової та практичної фармації.

З метою розширення асортименту лікарських засобів з кровоспинною та ранозагоювальною дією були проведенні дослідження п. європейського.

Відповідно до даних опрацьованих джерел літератури, в Україні п. європейський є неофіційною лікарською рослиною та практично не вивченою. Необхідно було провести інтерпретацію практичного досвіду народної медицини у світлі новітніх сучасних технологій офіційної фармацевтичної науки для створення ефективних, безпечних, якісно нових лікарських засобів.

Взявши за основу матеріали наведених джерел літератури, необхідно було дослідити хімічний склад п. європейського в залежності від місця зростання; виділити індивідуальні речовини та ідентифікувати їх; опрацювати параметри екстракції рослинної сировини; провести стандартизацію екстрактів з сировини п. європейського; дослідити фармакологічні властивості екстрактів; вивчити сировинні ресурси п. європейського (розповсюдження, урожайність, біологічні запаси, обсяг можливих щорічних заготівель), провести фенологічні спостереження та встановити можливість культивування досліджуваної рослини.

В дослідженнях використовували наступні методи: фізико-хімічні: тонкошарова (ТШ) і паперова хроматографія (ПХ), гравіметрія,

спектрофотометрія в УФ- та видимій областях спектру, атомно-абсорбційна спектрометрія (ААС), високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), газова хроматографія з мас спектрометрією (ГХ/МС), фотоколориметрії; хімічні – реакції ідентифікації та кількісне визначення вмісту БАР у сировині та екстрактах; фізичні – визначення втрати в масі при висушуванні, загальної золи, розчинності; фармакологічні дослідження з використанням стандартних методик. Обробку експериментальних даних проводили за допомогою математично-статистичних методів.

Для виконання даних досліджень була вибудована структура дисертаційної роботи, яка складалася із п'яти етапів.

Виконання першого етапу дослідження полягало у проведенні патентно-інформаційного пошуку та аналізу літературних джерел про розповсюдження, хімічний склад та застосування сировини п. європейського.

Другий етап був присвячений вибору загальної методології та методів дослідження.

На третьому етапі роботи було проведено вивчення складу біологічно активних речовин п. європейського, а саме досліджено якісний склад та кількісний вміст біологічно активних сполук у сировині.

Четвертий етап включав виділення комплексів біологічно активних речовин п. європейського та дослідження їх токсичності, фармакологічної активності. Досліджено гостру токсичність екстрактів, протизапальну, кровоспинну, ранозагоювальну та антимікробну дії екстрактів п. європейського.

Стандартизацію екстракту трави п. європейського проводили відповідно до вимог ДФУ 2.0, а саме: опис, ідентифікація, втрата в масі при висушуванні, загальна зола, важкі метали, мікробіологічна чистота та кількісне визначення діючих речовин. Отримані результати були включені до проєкту МКЯ «Підлісника європейського трави екстракт сухий».

П'ятим етапом роботи було вивчення сировинних ресурсів п. європейського (розповсюдження, біологічні запаси, урожайність), дослідження макро- та мікроскопічної будови трави та кореневищ з коренями

п. європейського, проведення фенологічних спостережень, вивчення умов культивування п. європейського.

Дослідження показників якості трави п. європейського, в тому числі їх зміни в процесі зберігання сировини, було використано при підготовці проєктів МКЯ «Підлісника європейського трава» та «Інструкції із заготівлі та сушіння трави підлісника європейського».

2.2 Об'єкти дослідження

З метою комплексного використання рослинної сировини і створення на її основі нових лікарських засобів актуальним є вивчення різних класів біологічно активних речовин трави та кореневищ з коренями п. європейського. Сировину заготовляли у фазу масового цвітіння та відмирання надземної частини відповідно, з врахуванням особливостей заготівлі та дбайливого відношення до флори в різних районах Івано-Франківської та Чернівецької областей.

Об'єктами фармакогностичного дослідження були трава, листки, стебла та кореневища з коренями п. європейського. Місця зростання та заготівлі п. європейського представлено в табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Місця заготівлі сировини підлісника європейського

№ з/п	Місце та рік заготівлі	Досліджувана частина сировини
1	2	3
Івано-Франківська область		
1.	Тисменицький район, околиці с. Вовчинці, 2012 – 2018 рр.	Трава, листки, стебла, кореневища з коренями
2.	Галицький район, околиці с. Вікторів, 2013 – 2018 рр.	Трава, листки, стебла, кореневища з коренями

1	2	3
3.	Калуський район, околиці с. Завій, 2014 р.	Трава, кореневища з коренями
4.	Калуський район, околиці с. Яворівка, 2013 р.	Трава, листки, стебла, кореневища з коренями
5.	Навчально-дослідні ділянки лікарських рослин ІФНМУ 2012 – 2018 рр.	Трава, листки, стебла, кореневища з коренями
Чернівецька область		
6.	Сторожинецький район, околиці с. Глибочок, 2014 – 2016 рр.	Трава, кореневища з коренями
7.	Кіцманський район, околиці с. Ревне, 2014 р.	Трава, листки, стебла, кореневища з коренями

2.3 Методи дослідження

2.3.1 Ідентифікація БАР у траві та кореневищах з коренями підлісника європейського

Дослідження груп БАР та їх вмісту проводили за допомогою якісних хімічних реакцій, хроматографічних методів аналізу – паперової хроматографії, тонкошарової хроматографії та інструментальних методів аналізу – абсорбційної спектрофотометрії, газової хроматографії, хромато-мас-спектрометрії, високоефективної рідинної хроматографії, фотоколориметрії; титриметричних методів, гравіметричного методу.

Для визначення вмісту біологічно активних речовин траву та кореневища з коренями п. європейського екстрагували водою очищеною, 70 % етанолом або

водою, підкисленою хлористоводневою кислотою, у співвідношенні сировина – екстрагент 1:10. Отримані витяжки досліджували на наявність основних груп біологічно активних речовин, використовуючи реакції ідентифікації за фармакопейними та описаними в літературі методиками [55 – 61].

Водні витяжки досліджували на наявність антраценпохідних, простих фенолів, танінів, вільних цукрів, водорозчинних полісахаридів, аскорбінової кислоти, сапонінів, амінокислот. Спиртові витяжки досліджували на наявність флавоноїдів, кумаринів, кардіостероїдів, хромонів. Підкислені водні витяжки досліджували на наявність алкалоїдів, пектинових речовин [57, 59].

Водні витяжки одержували екстракцією 4,0 г подрібненої рослинної сировини та 40 мл води очищеної при нагріванні на киплячому водяному нагрівнику протягом 30 хв. Отримані витяжки фільтрували через паперовий складчастий фільтр і використовували для проведення дослідження.

Антраценпохідні виявляли за допомогою реакції Чірха і Борнтрєгера. До 1 мл витяжки додавали 2 краплі 5 % розчину натрію гідроксиду.

Наявність у досліджуваній витяжці *танінів* підтверджували за допомогою наступних реакцій:

- ✓ до 2 – 3 мл витяжки додавали 2 – 3 краплі ферум (III) амоній сульфату;
- ✓ до 2 мл витяжки додавали краплями 1 %-й розчин желатини;
- ✓ до 2 мл витяжки додавали кілька крапель 1 %-го розчину хініну гідрохлориду.

Виявлення похідних простих фенолів проводили за допомогою реакцій:

- ✓ до 1 мл витяжки додавали кристалик ферум (II) сульфату;
- ✓ до 1 мл витяжки додавали 4 мл розчину аміаку та 1 мл 10 % розчину натрію фосфорно-молібденовокислого в хлористоводневій кислоті.

Наявність *вільних цукрів* підтверджували за допомогою реакції з розчином мідно-тарtratного реактиву. До 1 мл водної витяжки додавали 1 мл свіжоприготовленого розчину мідно-тарtratного реактиву і нагрівали на водяному нагрівнику.

Для виявлення *водорозчинних полісахаридів* до 10 мл витяжок додавали по 30 мл 95 % етилового спирту.

Наявність *аскорбінової кислоти* встановлювали за реакцією з розчином натрію 2,6-дихлорфеноліндофеноляту. Результати реакції ідентифікації підтверджували хроматографічно після обробки специфічними реактивами.

Виявлення *сапонінів* проводили за допомогою наступних реакцій:

✓ реакція піноутворення в кислому або лужному середовищах. У дві пробірки однакового діаметра та кольору вносили по 2 мл досліджуваної витяжки; в першу додавали 2 мл 0,5 % розчину хлористоводневої кислоти, а в другу – 2 мл 0,5 % розчину натрію гідроксиду та енергійно їх струшували. Відзначали висоту піноутворення та робили висновок про належність сапонінів до групи тритерпенових або стероїдних сполук;

✓ до 2 мл витяжки додавали кілька крапель 10 % розчину плюмбуму ацетату.

Для виявлення *амінокислот* змішували рівні об'єми досліджуваної витяжки й 0,1 % свіжоприготовленого розчину нінгідрину, одержану суміш обережно нагрівали й при охолодженні спостерігали за зміною забарвлення.

Для приготування спиртових витяжок до 4,0 г подрібненої сировини додавали 50 мл 70 % етилового спирту і нагрівали в колбі зі зворотним холодильником на киплячому водяному нагрівнику протягом 30 хв.

Виявлення *кардіостероїдів* проводили за допомогою реакцій Келлера-Кіліані, Бальє, Лібермана-Бурхарда, Легалє.

Виявлення *кумаринів* проводили за допомогою лактонної проби та з діазореактивом в лужному середовищі [60, 61]:

✓ лаконна проба. До 2 мл спиртової витяжки додавали 5 крапель 10 % спиртового розчину калію гідроксиду, нагрівали на водяному нагрівнику протягом 5 хв. Вміст пробірки охолоджували, додавали 2 мл води очищеної, перемішували, додавали 10 % розчин хлористоводневої кислоти до кислої реакції (за лакмусом);

✓ реакція з діазореактивом в лужному середовищі. До 2 мл спиртової витяжки додавали 5 крапель 10 % спиртового розчину калію гідроксиду і нагрівали на водяному нагрівнику протягом 3 – 5 хв, додавали 5 крапель свіжоприготовленої діазотованої сульфанілової кислоти.

Для виявлення *хромонів* використовували реакцію спікання з лугом. 2 мл досліджуваної витяжки поміщали у фарфорову чашку і випарювали. До сухого залишку додавали кристалик калію гідроксиду.

Наявність *флавоноїдів* встановлювали за результатами реакцій [59 – 61]:

✓ ціанідинова реакція за Бріантом. До 1 мл спиртової витяжки додавали близько 0,1 г порошку магнію і 0,5 мл хлористоводневої кислоти концентрованої та нагрівали 2 – 3 хв на водяному нагрівнику. З метою з'ясування природи флавоноїдів після проведення ціанідинової реакції реакційну суміш розбавляли рівною кількістю води, додавали 1 мл октанолу і збовтували;

✓ до 1 мл витяжки додавали рівну кількість 3 % розчину феруму (III) хлориду;

✓ до 1 мл витяжки додавали рівну кількість 5 % розчину алюмінію хлориду.

Для приготування підкислених водних витяжок до 2,0 г сировини додавали 20 мл 1 % розчину хлористоводневої кислоти й нагрівали в колбі зі зворотним холодильником на киплячому водяному нагрівнику протягом 10 хв; охолоджені витяжки фільтрували [57].

Одержані витяжки досліджували на наявність *алкалоїдів* за допомогою крапельних реакцій на предметному склі із загальноосадовими реактивами Драгендорфа, Вагнера, Бушарда, Зоненштейна; 10 % розчином таніну, 1 % розчином пікринової кислоти [60, 61].

Для виявлення *пектинових речовин* до 10 мл витяжок додавали по 30 мл 95 % етилового спирту.

2.3.2 Виявлення БАР у сировині підлісника європейського хроматографічними методами аналізу та виділення індивідуальних сполук

Хроматографічні дослідження проводили на хроматографічному папері

марки «Filtrak» (FN – 1), на папері сорту А, В, С паперової фабрики № 2 ім. Володарського (м. Санкт-Петербург), на пластинках «Sorbfil» із шаром силікагелю для ТШХ у наступних рухомих фазах (співвідношення у рухомих фазах, позначені цифрами, брали в об'ємних частках):

А – *n*-бутанол *P* – оцтова кислота *P* – вода *P* (4:1:5);

Б – *n*-бутанол *P* – оцтова кислота *P* – вода *P* (4:1:2);

В – *n*-бутанол *P* – оцтова кислота *P* – вода *P* (3:1:1);

Г – *n*-бутанол *P* – оцтова кислота *P* – вода *P* (18:2:5);

Д – *n*-бутанол *P* – ацетон *P* – вода *P* (4:1:5)

Е – *n*-бутанол *P* – оцтова кислота *P* – мурашина кислота *P* – вода *P* (18:3:1:4);

Ж – *n*-бутанол *P* – 95 % етанол *P* – 0,1 % розчин хлористоводневої кислоти *P* (1:10:5);

К – *n*-бутанол *P* – мурашина кислота *P* – вода *P* (75:15:10);

Л – *n*-бутанол *P* – етанол *P* – вода *P* – 25 % розчин аміаку *P* (40:10:49:1)

М – ізопропіловий спирт *P* – 25 % розчин аміаку *P* (7:3);

Н – 15 % розчин кислоти оцтової *P*.

На хроматограмах речовини ідентифікували за значеннями R_f аутентичних сполук, за забарвленням плям у денному світлі та за флюоресценцією в УФ-світлі до і після обробки відповідними хромогенними реактивами (270, 354 нм):

1. пари розчину аміаку концентрованого;
2. 3 % спиртовий розчин алюмінію хлориду;
3. розчин анілінфталату;
4. 0,1 % розчин нінгідрину в етанолі;
5. 0,1 % спиртовий розчин натрію 2,6-дихлорфеноліндофеноляту;
6. 0,05 % спиртовий розчин бромтимолового синього.

Органічні кислоти виявляли методом паперової хроматографії. Сировину екстрагували сумішню ацетон–диетиловий ефір (7:3) і 1 мл 20 % сульфатної кислоти (з розрахунку на 1 г сировини) на водяному нагрівнику зі зворотним

холодильником за температури кипіння екстрагенту. Одержані витяжки фільтрували у вакуумі, концентрували й вивчали методом висхідної хроматографії у рухомих фазах Д і К у порівнянні з вірогідними зразками. Хроматограми обробляли 0,05 % спиртовим розчином бромтимолового синього та 0,1 % спиртовим розчином натрію 2,6-дихлорфеноліндофеноляту [62 – 64].

Якісний склад амінокислот в досліджуваних об'єктах визначали за допомогою висхідної паперової хроматографії. Аналітичну пробу сировини подрібнювали до розміру частинок, які проходять через сито з отворами розміром 2,5 мм. 1,0 г подрібненої сировини поміщали у колбу, додавали 10 мл води (1:10) і нагрівали на киплячому водяному нагрівнику протягом 30 хв. Одержані витяжки упарювали у фарфорових чашках на киплячому водяному нагрівнику до густої консистенції, залишок розчиняли в невеликому об'ємі 96 % етилового спирту (3 – 4 мл). Хроматографічний аналіз проводили в рухомих фазах Б, Г на папері марки «Filtrak FN-1». Як зразки для порівняння використовували розчини амінокислот у 0,1 н розчині хлористоводневої кислоти. Для проявлення амінокислот використовували 0,1 % розчин нінгідрину в етанолі з наступним нагріванням у сушильній шафі протягом декількох хвилин при температурі 80 – 100 °С [65 – 67].

Для виявлення фенольних сполук використали методи одно- і двовимірної паперової хроматографії. Для цього 2,0 г кожного виду сировини екстрагували 70 % етанолом у співвідношенні (1:10) на киплячому водяному нагрівнику зі зворотним холодильником протягом 1 год при температурі кипіння екстрагента. Отримані витяжки фільтрували, упарювали досуха, залишок розчиняли в 1 мл 70 % етанолу і наносили на хроматографічний папір марки «Filtrak FN-1». Хроматографічний аналіз проводили в рухомих фазах: Б і Н. Висушені хроматограми вивчали в УФ-світлі до та після обробки 3 % спиртовим розчином алюмінію хлориду та парами аміаку [68, 69].

Для виділення та ідентифікації гідроксикоричних кислот в сировині п. європейського по 0,3 кг повітряно-сухої сировини (трави та кореневищ з коренями) подрібнювали до розміру частинок 2 – 3 мм та екстрагували

послідовно 96 % та 70 % етанолом протягом 30 хв при співвідношенні сировина-екстрагент 1:10. Екстракцію повторювали двічі. Витяжки об'єднували, фільтрували та концентрували. З метою розділення суми гідроксикоричних кислот на індивідуальні компоненти фільтрат послідовно екстрагували хлороформом, етилацетатом та *n*-бутанолом шляхом обробки водного залишку в ділільній лійці з рівною кількістю органічних розчинників.

Для виділення БАР з трави та кореневищ з коренями п. європейського та поділу їх на індивідуальні сполуки використовували методи розподільного фракціонування в системі “рідина – рідина”, колонкової хроматографії на силікагелі, препаративної хроматографії на папері з наступною рехроматографією та дробною кристалізацією. Виділені речовини ідентифікували на основі їх спектральних та хроматографічних характеристик; температури плавлення у порівнянні із вірогідними зразками відповідних сполук [70].

Вивчення мономерного складу ВРПС, ПР та Гц проводили методом тонкошарової та паперової хроматографії після попереднього гідролізу сульфатною кислотою. 0,1 г полісахаридів розчиняли у 2 мл води очищеної та гідролізували 2 мл 20 % розчину сульфатної кислоти на киплячому водяному нагрівнику.

Для дослідження мономерного складу полісахаридів вивчали динаміку їх гідролізу сульфатною кислотою протягом 1, 3 та 5 годин [71].

Гідролізати нейтралізували насиченим розчином барію гідроксиду до нейтральної реакції за універсальним індикатором, розчини фільтрували, фільтри та осад на фільтрах промивали водою. Фільтрати упарювали до сухого залишку і розчиняли в 1 мл 70 % етанолу.

Моносахаридний склад отриманих розчинів визначали методом паперової хроматографії на папері марки «Filtrak FN-1» в рухомих фазах Д, Л, М та в тонкому шарі сорбенту на пластинках “Sorbfil” в рухомій фазі В в порівнянні зі зразками нейтральних моносахаридів.

Розчин, що вміщував кислі моносахариди, хроматографували на папері марки «Filtrak FN-1» в рухомій фазі Е та в тонкому шарі сорбенту на пластинках «Sorbfil» в рухомій фазі Ж у порівнянні з вірогідними зразками моносахаридів.

Хроматограми після висушування на повітрі обробляли анілінфталатним реактивом і нагрівали у сушильній шафі протягом 10 хв при температурі 100 – 105 °С [71].

Ідентифікацію вітаміну K_1 у сировині проводили з використанням методу ТШХ на пластинах «Sorbfil» у системі розчинників бензол - петролейний ефір (1:1).

Наважку (1,0 г) подрібненої рослинної сировини до діаметра частинок 1 мм поміщали в колбу місткістю 15 мл, додавали 10 мл гексану і перемішували на механічному струшувальному пристрої протягом 3 год, фільтрували, розчинник відганяли на роторному випарнику за температури не вище 45 °С до об'єму 2 – 3 мл. 0,1 мл витяжки наносили на пластину «Sorbfil». Пластинку підсушували на повітрі 3 – 5 хв і хроматографували. Пластинки висушували на повітрі протягом 2 – 3 хв і витримували в УФ-світлі протягом 2 хв. Вітамін K_1 ідентифікували за забарвленням плям в УФ-світлі та після обробки 5 % розчином фосфорно-молібденової кислоти та величиною R_f в порівнянні з вірогідним зразком – препаратом вікасол 1 % [72].

2.3.3 Дослідження амінокислотного складу сировини підлісника європейського

Дослідження амінокислотного складу сировини п. європейського проводили у лабораторії Інституту тваринництва НААН на амінокислотному аналізаторі ААА Т-339 М. Аналіз проводили у порівнянні з концентрацією стандартних гідролізатів амінокислот згідно з ДСТУ ISO 13903: 2005 “Складові кормів для тварин. Визначення вмісту амінокислот”.

Для визначення амінокислотного складу білка до 0,1 г досліджуваної сировини, висушеної при температурі 60 °С, додавали по 5 мл води очищеної та

концентрованої хлористоводневої кислоти й поміщали у пробірку для гідролізу. Гідроліз проводили при температурі 120 °С протягом 15 хв. Гідролізат нейтралізували сухим натрію гідроксидом до рН 11 і переносили у фарфорову чашку на 1 год з метою прискорення випаровування аміаку. Потім додавали розчин хлористоводневої кислоти до встановлення рН 2,2. Пробу фільтрували, відбирали 0,1 – 0,5 мл рідини, доводили до об'єму 2 мл буферним розчином з рН 2,2 і вносили в амінокислотний аналізатор [73 – 74].

2.3.4 Ідентифікація та кількісне визначення мінерального складу

Встановлення якісного складу та кількісного вмісту макро- та мікроелементів проводили методом атомно-абсорбційної спектроскопії на приладах ААС-30 ("Carl Zeiss", Німеччина) та С-115 ПК з полум'яним фотометром FLAFON-4.

Підготовку проб сировини здійснювали методом озолення. Озолення досліджуваних зразків сировини проводили концентрованою хлористоводневою кислотою [75].

Принцип методу ААС базується на явищі поглинання світла вільними атомами хімічних елементів згідно з ГОСТом 27995-88. Кожний хімічний елемент має свої визначені енергетичні стани та довжини хвиль, при яких спостерігається його атомне поглинання. У ААС використовують резонансні переходи атомів з не збудженого у збуджений стан на певній довжині хвилі поглинання. У якості атомізатора використовують полум'я або електричну дугу [76, 77].

2.3.5 Ідентифікація та визначення кількісного вмісту фенольних сполук методом ВЕРХ

Дослідження суми фенольних сполук проводили на вискоєфективному рідинному хроматографі Agilent 1200 3 D LC System Technologies (США), який укомплектований фотометричним діодно-матричним детектором

UV-Vis G1315C, проточним вакуумним дегазатором G1322A, чотириканальним насосом градієнта низького тиску G13111A, автосамплером (автоматичний інжектор) G1329A, термостатом колонки G1316A, детекторами діодноматричним G1315C та рефрактометричним G1362A, в комплексі з персональним комп'ютером з програмним забезпеченням Agilent ChemStation [78].

Для виділення фенольних сполук проводили обернено-фазну хроматографію, використовуючи хроматографічну колонку Discovery C₁₈ розміром 250×4,6 мм із сорбентом: силікагель, модифікований октадецильними групами, який має діаметр зерен 5 мкм. Для розділення гідроксикоричних кислот, флавоноїдів, кумаринів як рухому фазу використовували 0,005 N ортофосфорну кислоту (елюент А) та ацетонітрил (елюент В); для розділення танінів – суміш 0,1 % трифлуороцтової кислоти, 5 % ацетонітрилу та деіонізованої води (елюент А) та 0,1 % трифлуороцтову кислоту в ацетонітрилі (елюент В).

Параметри режиму хроматографування та градієнтного елюювання наведені в табл. 2.2. та 2.3.

Таблиця 2.2

Режими градієнтного елюювання фенольних сполук

Флавоноїди, кумарини								
Час, хв	0	30	33	38	40	41	49 – 60	
Елюент В, %	12	25	25	30	40	80	12	
Гідроксикоричні кислоти								
Час, хв	0	8	15	30	40	41 – 42	43 – 50	
Елюент В, %	5	8	10	20	40	75	5	
Таніни								
Час, хв	0	8	10	15	20	25	28	29
Елюент В, %	0	12	12	25	25	75	75	0

Режим хроматографування фенольних сполук

Режим хроматографування	Група БАР		
	Флавоноїди	Гідроксикоричні кислоти	Таніни
Швидкість подачі рухомої фази, мл/хв	0,8	0,7	0,1
Робочий тиск елюента, bar (кПа)	156 bar (15600)	100 – 120 bar (10000 – 12000)	400 bar (40000)
Температура термостата колонки, °C	25		
Об'єм введеної проби, мкл	5 – 20		
Час хроматографування, хв	60	50	40
Довжина хвилі, нм	255, 340	320, 330	280, 255

Пробопідготовка. Подрібнену ЛРС масою 1,00 г (точна наважка) поміщали в круглодонну колбу місткістю 50 мл, додавали 25 мл 60 % розчину метанолу (для визначення гідроксикоричних кислот, кумаринів та флавоноїдів), 25 мл води бідистильованої (для визначення танінів); екстрагували на киплячому водяному нагрівнику зі зворотним холодильником при перемішуванні впродовж 30 хв. Екстракти охолоджували, фільтрували, кількісно переносили в мірну колбу місткістю 50 – 100 мл і доводили об'єм розчину до мітки 60 % метанолом або водою бідистильованою. Отриманий розчин відфільтровували через мембранний фільтр з розміром пор 0,45 мкм [78 – 80].

Ідентифікацію компонентів проводили за часом утримання стандартів та спектральними характеристиками, їх кількісний вміст визначали, обчислюючи площу піків на хроматограмі.

2.3.6 Ідентифікація та кількісне визначення стероїдних сполук

Дослідження стероїдних сполук проводили методом ГХ/МС на хроматографі Agilent Technologies 6890 з мас-спектрометричним детектором

5973 та з капілярною колонкою HP- 5ms (діаметр 0,25 мм, довжина – 30 м). Швидкість газу-носія (гелію) становила 1,0 мл/хв, температура нагрівача вводу проби – 350 °С, температура термостату 150 °С – 300 °С зі швидкістю 7 град/хв.

Для ідентифікації компонентів використовували бібліотеку мас-спектрів у поєднанні з програмами для ідентифікації AMDIS та NIST [81, 82].

Пробопідготовка. 0,05 г подрібненої сировини поміщали у віалу місткістю 20 мл, додавали тридекан як внутрішній стандарт та 6 мл розчинника метиленхлориду. Віали витримували протягом 3 год в ультразвуковому екстракторі або при кімнатній температурі протягом доби. Одержану витяжку переносили до віали місткістю 2 мл та концентрували, продуваючи потоком особливо чистого нітрогену (швидкість потоку – 100 мл/хв) до залишкового об'єму витяжки 10 мкл. Введення проби (3 мкл) в хроматографічну колонку проводили в режимі splitless протягом 0,5 хв.

Визначення кількісного вмісту стероїдів (X, мг/кг) визначали за формулою 2.1:

$$X = \frac{\Pi_1 \times 50}{\Pi_2 \times m}, \quad (2.1)$$

де: Π_1 – площа піка речовини, що вивчалася; 50 – маса внутрішнього стандарту, що вводився в зразок, мкг; Π_2 – площа піка стандарту; m – наважка сировини, г.

2.3.7 Дослідження компонентного складу летких сполук

Компонентний склад летких фракцій визначали методом ГХ/МС на хроматографі Agilent Technologies 6890 з мас-спектрометричним детектором 5973. При хроматографуванні дотримувалися наступних умов: хроматографічна колонка – капілярна HP-5ms (0,25 мм × 30 м); швидкість газу-носія (гелію) 1,0 мл/хв; температура нагрівача вводу проби – 250 °С, температура термостату 60 °С – 320 °С зі швидкістю 7 град/хв [83, 84].

Пробопідготовка. 1,0 г повітряно-сухої сировини поміщали до віали місткістю 20 мл, додавали тридекан 50 мкг з розрахунку на наважку (внутрішній

стандарт), з наступним розрахунком концентрації внутрішнього стандарту. До проби додавали 10 мл води очищеної та відганяли леткі компоненти з водяною парою протягом 2 годин з використанням зворотного холодильника з повітряним охолодженням.

В процесі відгонки леткі компоненти адсорбувалися на внутрішній поверхні зворотного холодильника. Адсорбовані речовини після охолодження системи змивали повільним додаванням 3 мл чистого пентану в суху віалу місткістю 10 мл. Змив концентрували продувкою (100 мл/хв) чистим азотом до залишкового об'єму екстракту 10 мкл, який повністю відбирали хроматографічним шприцом. Подальше концентрування проби проводили в самому шприці до об'єму 2 мкл.

Для ідентифікації компонентів використовували бібліотеку мас-спектрів NIST 05 та WILEY 2007 із загальною кількістю спектрів більше як 470000 у поєднанні з програмами для ідентифікації AMDIS та NIST [83, 84].

Для розрахунку кількісного вмісту застосовували метод внутрішніх стандартів. Розрахунок вмісту компонентів (X, мг/кг) проводили за формулою 2.1.

2.3.8 Дослідження якісного складу та кількісного вмісту жирних кислот

Дослідження жирнокислотного складу досліджуваної сировини проводили методом ГХ-МС на хроматографі Agilent Technologies 6890 з мас-спектрометричним детектором 5973 з капілярною колонкою HP-5ms (діаметр – 0,25 мм, довжина – 30 м) [85].

Для отримання метилових естерів жирних кислот 0,05 г подрібненої сировини поміщали у віали місткістю 2 мл, додаючи при цьому тридекан як внутрішній стандарт та 2 мл 2 % розчину ацетилхлориду в метанолі. Віали витримували протягом 2 год за температури 37 °С. Метилові естери жирних кислот екстрагували 500 мкл гексану. Компоненти ідентифікували з використанням бібліотеки мас-спектрів у поєднанні з програмами для ідентифікації AMDIS та NIST.

Кількісний вміст жирних кислот (X , мг/кг) визначали за методом внутрішніх стандартів за формулою 2.1.

2.3.9 Кількісне визначення груп біологічно активних речовин в сировині підлісника європейського

Визначення кількісного вмісту тритерпенових сапонінів. Визначення вмісту тритерпенових сапонінів проводили фотоколориметричним методом після гідролізу концентрованою сульфатною кислотою з подальшим вимірюванням оптичної густини [86, 87].

5,0 г сировини (точна наважка) поміщали в колби місткістю 100 мл і додавали 50 мл води очищеної. Екстрагували на киплячому водяному нагрівнику зі зворотними холодильниками протягом двох годин. Отримані витяжки фільтрували в мірну колбу місткістю 50 мл і доводили водою очищеною до мітки.

5 мл витяжки поміщали в колбу, додавали 3 мл суміші концентрованої сульфатної кислоти та води в співвідношенні 1:1, нагрівали на киплячому водяному нагрівнику зі зворотним холодильником протягом 30 хвилин. Отриманий розчин охолоджували під струменем холодної води й зливали в ділильну лійку. Колбу, в якій проводили гідроліз, ополіскували 5 мл води та додавали змив в ділильну лійку, сюди ж вносили 20 мл суміші хлороформ-етанол 96 % (5:1) і збовтували протягом 10 хвилин. Хлороформні витяги фільтрували через фільтри з 5 г безводного натрію сульфату в скляні колонки з 2 г алюмінію оксиду. Операцію повторювали 3 рази, використовуючи кожен раз по 20 мл суміші хлороформ-спирт етиловий.

Хлороформний елюат упарювали на киплячому водяному нагрівнику до сухого залишку, який переносили в мірну колбу місткістю 25 мл, додавали 70 % етиловий спирт до мітки. До 5 мл отриманого розчину додавали 5 мл концентрованої сульфатної кислоти. Через 30 хвилин вимірювали оптичну

густину на фотоколориметрі KF 77 при довжині хвилі 490 нм, використовуючи як розчин порівняння воду [86, 87].

Кількісний вміст тритерпенових сапонінів (X, %), в перерахунку на олеанолову кислоту, розраховували за формулою 2.2:

$$X = \frac{D \times V \times 100}{22,9 \times m (100 - W)} \quad (2.2)$$

де: D – оптична густина досліджуваного розчину; m – маса сировини, г; V – розведення; W – втрата в масі при висушуванні сировини, %; 22,9 – показник поглинання кислоти олеанолової.

Визначення кількісного вмісту суми вільних органічних кислот проводили титриметричним методом за фармакопейною методикою [88]. Точну наважку сировини подрібнювали до розміру частинок, що проходять крізь сито з діаметром отворів 2 мм поміщали у колбу місткістю 250 мл, заливали 200 мл води очищеної й витримували протягом 2 год на киплячому водяному нагрівнику, охолоджували, кількісно переносили у мірну колбу місткістю 250 мл, доводили об'єм водою до мітки та перемішували (розчин А).

Розчин А (10 мл) поміщали у колбу місткістю 500 мл, додавали 200 мл свіжо прокип'яченої води очищеної, 1 мл 1 % спиртового розчину фенолфталеїну, 2 мл 0,1 % розчину метиленового синього і титрували 0,1 М розчином натрію гідроксиду до появи в піні лілово-фіолетового забарвлення.

Вміст вільних органічних кислот (X, %), у перерахунку на кислоту яблучну в абсолютно сухій сировині, обчислювали за формулою 2.3:

$$X = \frac{V \times 0,0067 \times 250 \times 100 \times 100}{m \times 10 \times (100 - W)}, \quad (2.3)$$

де: 0,0067 – кількість яблучної кислоти, що відповідає 1 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду, г; V – об'єм 0,1 М розчину натрію гідроксиду, який витратили на титрування, мл; m – маса сировини, г; W – втрата в масі при висушуванні сировини, % [89].

Визначення кількісного вмісту аскорбінової кислоти здійснювали за фармакопейною методикою [88]. Наважку 20 г подрібненої сировини поміщали у фарфорову ступку, додавали близько 5 г скляного порошку та ретельно

розтирали, поступово додаючи 300 мл води очищеної й настоювали протягом 10 хв. Потім витяжку фільтрували.

В конічну колбу місткістю 100 мл вносили 1 мл фільтрату, 1 мл 2 % розчину хлористоводневої кислоти, 13 мл води очищеної, перемішували та титрували із мікробюретки 0,001 М розчином натрію 2,6-дихлорфеноліндофеноляту до появи рожевого забарвлення, яке не зникало протягом 30 – 60 с [90, 91].

Кількісний вміст аскорбінової кислоти (X, %), в перерахунку на абсолютно суху сировину, обчислювали за формулою 2.4:

$$X = \frac{V \times 0,000088 \times 300 \times 100 \times 100}{m \times 1 \times (100 - W)}, \quad (2.4)$$

де: 0,000088 – кількість аскорбінової кислоти, яка відповідає 1 мл розчину натрію 2,6-дихлорфеноліндофеноляту (0,001 моль/л), г; V – об'єм розчину натрію 2,6-дихлорфеноліндофеноляту (0,001 моль/л), витраченого на титрування, мл; m – маса сировини, г; W – втрата в масі при висушуванні, %.

Визначення вмісту окиснюваних фенолів в сировині п. європейського проводили фармакопейним методом (метод Левенталя-Нейбауєра в модифікації А. Л. Курсанова) [92].

Близько 2 г (точна наважка) подрібненої сировини, просіяної крізь сито з діаметром отворів 3 мм, поміщали в конічну колбу місткістю 500 мл, заливали 250 мл нагрітої до кипіння води очищеної й кип'ятили зі зворотним холодильником на водяному нагрівнику протягом 30 хв при періодичному перемішуванні. Витяжку охолоджували до кімнатної температури, проціджували близько 100 мл в конічну колбу місткістю 250 мл через вату так, щоб частинки сировини не потрапили в колбу. Відбирали 25 мл отриманої витяжки в іншу конічну колбу місткістю 750 мл, додавали 500 мл води очищеної, 25 мл індігосульфокислоти й титрували при постійному перемішуванні 0,02 М розчином калію перманганату до золотисто-жовтого кольору.

Паралельно проводили контрольний дослід. До 25 мл індігосульфокислоти, додавали 525 мл води очищеної й титрували 0,02 М

розчином калію перманганату до золотисто-жовтого забарвлення. 1 мл 0,02 М розчину калію перманганату відповідає 0,004157 г окиснюваних фенолів в перерахунку на танін [92, 93].

Вміст окиснюваних фенолів (X, %), в перерахунку на абсолютно суху сировину, обчислювали за формулою 2.5:

$$X = \frac{(V - V_0) \times 0,004157 \times 250 \times 100 \times 100}{m \times 25 \times (100 - W)}, \quad (2.5)$$

де: V – об'єм 0,02 М розчину калію перманганату, який витратили на титрування витяжки, мл; V_0 – об'єм 0,02 М розчину калію перманганату, який витратили на титрування витяжки в контрольному досліді, мл; 0,004157 – кількість окиснюваних фенолів, що відповідає 1 мл 0,02 М розчину калію перманганату, г; m – маса сировини, г; W – втрата в масі при висушуванні сировини, %. 250 – загальний об'єм витяжки, мл; 25 – об'єм витяжки, взятий на титрування, мл.

Визначення кількісного вмісту суми поліфенолів у сировині п. європейського проводили спектрофотометричним методом в перерахунку на пірогалол [55].

0,5 г здрібненої на порошок сировини поміщали в круглодонну колбу місткістю 250 мл, додавали 150 мл води очищеної й нагрівали на водяному нагрівнику зі зворотним холодильником протягом 30 хв. Охолоджували під проточною водою та кількісно переносили у мірну колбу місткістю 250 мл. Круглодонну колбу обполіскували водою очищеною, промивні води переносили в мірну колбу і доводили об'єм розчину водою очищеною до 250 мл. Відстоювали та фільтрували через фільтрувальний папір діаметром 125 мм. Перші 50 мл фільтрату відкидали (Розчин А)

5 мл розчину А доводили водою очищеною до об'єму 25 мл. До 2 мл одержаного розчину додавали 1 мл фосфорномолібденово-вольфрамового реактиву і 10 мл води очищеної та доводили розчином натрію карбонату (290 г/л) до об'єму 25 мл. Через 30 хв вимірювали оптичну густину розчину при довжині хвилі 760 нм (A_1), використовуючи як компенсаційний розчин воду очищену.

Розчин порівняння. Безпосередньо перед випробуванням 50,0 мг пірогалолу розчиняли у воді очищеній і доводили об'єм розчину тим самим розчинником до 100 мл. 5 мл одержаного розчину доводили водою очищеною до об'єму 100 мл.

Суміш 2 мл одержаного розчину, 1 мл фосфорномолібденово-вольфрамового реактиву і 10 мл води очищеної доводили розчином натрію карбонату (290 г/л) до об'єму 25 мл. Через 30 хв вимірювали оптичну густину розчину при довжині хвилі 760 нм (A_0), використовуючи як компенсаційний розчин воду очищену.

Вміст суми поліфенолів (X, %), у перерахунку на пірогалол, обчислювали за формулою 2.6:

$$X = \frac{62,5 \times A_1 \times m_2}{A_0 \times m_1} \quad (2.6)$$

де: m_1 – маса наважки досліджуваної сировини, мг; m_2 – маса наважки пірогалолу, мг; A_1 – оптична густина досліджуваного розчину; A_0 – оптична густина розчину порівняння [93].

Кількісне визначення танінів у сировині п. європейського проводили спектрофотометричним методом (ДФУ 2.0. – 2.8.14) [55].

До 10 мл розчину А, приготовленого відповідно методики визначення кількісного вмісту суми поліфенолів, додавали 0,10 г шкірного порошку і енергійно струшували протягом 60 хв. Суміш фільтрували та доводили 5 мл фільтрату водою очищеною до об'єму 25 мл. Суміш 2 мл одержаного розчину, 1 мл фосфорномолібденово-вольфрамового реактиву і 10 мл води очищеної доводили розчином натрію карбонату (290 г/л) до об'єму 25 мл. Через 30 хв вимірювали оптичну густину розчину при довжині хвилі 760 нм (A_2), використовуючи як компенсаційний розчин воду очищену.

Розчин порівняння. Безпосередньо перед випробуванням 50,0 мг пірогалолу розчиняли у воді очищеній і доводили об'єм розчину тим самим розчинником до 100 мл. 5 мл одержаного розчину доводили водою очищеною до об'єму 100 мл. Суміш 2 мл одержаного розчину, 1 мл фосфорномолібденово-вольфрамового реактиву і 10 мл води очищеної доводили розчином натрію карбонату (290 г/л) до об'єму 25 мл. Через 30 хв вимірювали оптичну густину

розчину при довжині хвилі 760 нм (A_3), використовуючи як компенсаційний розчин воду очищену.

Вміст суми танінів (X , %), у перерахунку на пірогалол, обчислювали за формулою 2.7:

$$X = \frac{62,5 \times (A_1 - A_2) \times m_2}{A_3 \times m_1} \quad (2.7)$$

де: m_1 – маса наважки досліджуваної сировини, г; m_2 – маса наважки пірогалолу, г.

Визначення кількісного вмісту гідроксикоричних кислот у сировині п. європейського проводили спектрофотометричним методом в перерахунку на розмаринову кислоту [94, 95].

2,0 г подрібненої сировини поміщали в колбу місткістю 200 мл, додавали 70 мл води очищеної, нагрівали зі зворотним холодильником на водяному нагрівнику протягом 15 хв. Екстрагування проводили ще двічі. Витяжки охолоджували та фільтрували крізь паперові фільтри. Витяжку кількісно переносили в мірну колбу місткістю 200 мл і доводили об'єм розчину водою до 200 мл (Розчин А).

У мірну колбу на 25 мл вносили 1 мл розчину А і доводили об'єм 20 % етанолом до мітки та перемішували.

Оптичну густину розчину вимірювали на спектрофотометрі Specord M 40 при довжині хвилі 325 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм.

Розчин порівняння. Як розчин порівняння використовували 20 % етанол.

Вміст суми гідроксикоричних кислот (X , %), у перерахунку на розмаринову кислоту та абсолютно суху сировину, обчислювали за формулою 2.8:

$$X = \frac{A \times 200 \times 25 \times 100 \times 100}{E_{1\text{ cm}}^{1\%} \times m \times 1 \times (100 - W)}, \quad (2.8)$$

де: A – оптична густина досліджуваного розчину; m – наважка сировини, г; $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ – питомий показник поглинання розмаринової кислоти, який дорівнює 500; W – втрата в масі при висушуванні, %.

Визначення кількісного вмісту флавоноїдів проводили методом УФ-спектрофотометрії в перерахунку на рутин (ДФУ 2.0 – 2.2.25) [55, 96 – 98].

Аналітичну пробу сировини подрібнювали до розміру частинок, які проходять крізь сито з отворами діаметром 3 мм. Близько 1,0 г (точна наважка) подрібненої сировини поміщали в пакет з фільтрувального паперу й очищали хлороформом в апараті Сокслета до знебарвлення розчинника. Пакетики з сировиною висушували на повітрі, поміщали в круглодонну колбу зі шліфом місткістю 100 мл і екстрагували 70 % етанолом у співвідношенні 1:30 на водяному нагрівнику зі зворотним холодильником протягом 30 хв при температурі кипіння розчинника. Витяжку фільтрували в мірну колбу на 100 мл, а сировину екстрагували ще двічі в аналогічних умовах. Об'єднані витяжки в колбі на 100 мл доводили екстрагентом до мітки та перемішували (розчин А).

У мірну колбу місткістю 25 мл поміщали 1 мл розчину А, додавали 1 мл 3 % розчину алюмінію хлориду у 70 % етанолі та доводили об'єм розчину 70 % етанолом до мітки (розчин Б). Оптичну густину розчину вимірювали на спектрофотометрі Specord M 40 при довжині хвилі 408 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм.

Компенсаційний розчин. У мірну колбу місткістю 25 мл вносили 1 мл розчину А і доводили об'єм розчину 70 % етанолом до мітки. Паралельно, в тих же умовах, вимірювали оптичну густину розчину стандартного зразка рутину, питомий показник поглинання ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) якого з 3 % розчином алюмінію хлориду при 408 нм становить 220.

Кількісний вміст флавоноїдів (X, %), в перерахунку на рутин і абсолютно суху сировину, обчислювали за формулою 2.9:

$$X = \frac{A \times 25 \times 100 \times 100 \times 100}{E_{1\text{cm}}^{1\%} \times m \times V \times (100 - W)}, \quad (2.9)$$

де: А – оптична густина випробуваного розчину; 25 – об'єм розчину Б, мл; 100 – об'єм розчину А, мл; $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ – питомий показник поглинання комплексу рутину з алюмінію хлоридом ($\lambda = 408$ нм); m – маса наважки сировини, г; V – об'єм розчину А, взятий для приготування розчину Б, мл; W – втрата в масі при висушуванні, %.

Визначення кількісного вмісту вітаміну K_1 у сировині п. європейського проводили методом спектрофотометрії [99]. Аналітичну пробу сировини подрібнювали до діаметра часток, що проходять крізь сито № 10. Точну наважку (0,5 г) поміщали в конічну колбу місткістю 100 мл та екстрагували тричі по 25 мл 70 % етиловим спиртом, нагріваючи на киплячому водяному нагрівнику 15 хв. Гарячі витяжки фільтрували у колбу місткістю 100 мл так, щоб сировина не потрапила на фільтр, який промивали 10 мл 70 % спирту етилового. У гарячі витяжки додавали 4 мл розчину плюмбуму ацетату 10 %, нагріваючи на киплячому водяному нагрівнику 3 хв до коагуляції осаду, охолоджували та фільтрували у мірну колбу місткістю 100 мл, доводили 70 % етиловим спиртом до мітки.

5 мл отриманого розчину переносили у мірну колбу місткістю 50 мл і доводили 70 % етиловим спиртом до мітки.

Оптичну густину розчину вимірювали на спектрофотометрі при довжині хвилі 230 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Паралельно вимірювали оптичну густину 1 % розчину вікасолу.

Вміст вітаміну K_1 (X, %), в перерахунку на вікасол та абсолютно суху сировину, розраховували за формулою (2.10):

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 50 \cdot 100}{420 \cdot m \cdot 5 \cdot (100 - W)}, \quad (2.10)$$

де: A — оптична густина досліджуваного розчину; m — наважка сировини, г; 420 — коефіцієнт питомого поглинання вікасолу в 70 % етанолі; W — втрата в масі при висушуванні, %.

Кількісне визначення полісахаридів у досліджуваній сировині проводили гравіметричним методом [100 – 102].

Сировину висушували, подрібнювали до розміру частинок, які проходять через сито з діаметром отворів 2,5 мм і екстрагували хлороформом в апараті Сокслета для видалення ліпофільних фракцій.

Для виділення фракцій полісахаридів повітряно-сухий шрот сировини, який залишився після трьохкратної екстракції фенольних сполук 70 % етанолом,

екстрагували різними розчинниками: водою очищеною, 0,15 % розчином хлористоводневої кислоти; 7 % розчином натрію гідроксиду [100, 102].

Виділення ВРПС проводили водою очищеною у співвідношенні сировина-екстрагент 1:10 на водяному нагрівнику зі зворотним холодильником при нагріванні до температури 95 °C протягом 1 год при постійному перемішуванні. Отриману витяжку фільтрували, а сировину ще двічі екстрагували водою очищеною в аналогічних умовах. Отримані витяжки об'єднували і упарювали до 1/5 від початкового об'єму. Полісахариди осаджували трикратною кількістю 96 % етанолу і залишали на 24 год. Осади, що утворились, центрифугували при 4000 об/хв протягом 5 хв, промивали 96 % етанолом, висушували та зважували [100, 101].

Зі шроту, що залишився після вилучення ВРПС, виділяли ПР шляхом екстракції сировини 0,15 % розчином хлористоводневої кислоти у співвідношенні 1:10 на киплячому водяному нагрівнику протягом 1 години. Одержану витяжку фільтрували, додавали трикратну кількість 96 % етанолу і залишали на 24 години для осадження пектинових речовин. Осад центрифугували, промивали 96 % етанолом, висушували та зважували.

Геміцеллюлозу виділяли зі шроту, що залишився після послідовного отримання ВРПС і ПР. Екстракцію проводили 7 % розчином натрію гідроксиду у співвідношенні сировина-екстрагент 1:10 при кімнатній температурі на апараті для струшування протягом 12 годин. Витяжку нейтралізували оцтовою кислотою до нейтральної реакції (за універсальним індикатором) і залишали на 24 години. Утворений осад ГцА, який відділяли центрифугуванням при 4000 об/хв протягом 5 хв, висушували та зважували. До надосадової рідини додавали трикратну кількість 96 % етанолу і залишали на 24 години для осадження ГцБ. Отриманий осад відділяли центрифугуванням, висушували та зважували.

Визначення кількісного вмісту фракцій полісахаридів проводили гравіметричним методом (X, %) і розраховували за формулою 2.11, у перерахунку на абсолютно суху сировину:

$$X = \frac{m_1 \times 100 \times 100}{m_2 \times (100 - W)}, \quad (2.11)$$

де: X – вміст фракції полісахаридів, %; m_1 – маса осаду, г; m_2 – маса сировини, г; W – втрата в масі при висушуванні, %.

2.3.10 Дослідження гострої токсичності та фармакологічної активності екстрактів з сировини підлісника європейського

Гостру токсичність та фармакологічну активність отриманих екстрактів п. європейського досліджували при консультативній допомозі завідувача кафедри анатомії людини професора О. Г. Попадинець та доцента кафедри анатомії людини В. М. Іваночка. Вивчення біохімічних та гематологічних показників крові дослідних тварин проводили на базі «Центру біоелементології» Івано-Франківського національного медичного університету (свідectvo про технічну компетентність № 037/19 від 13 червня 2019 р. до 12 червня 2024 р.).

Вивчення гострої токсичності екстрактів з трави та кореневищ з коренями п. європейського було проведено на білих нелінійних статевозрілих мишах-самцях масою 18 – 22 г, які були вирощені у віварію ІФНМУ та стандартизовані за фізіологічними та біохімічними показниками [103].

Для визначення гострої токсичності використовували методику доклінічного вивчення нешкідливості лікарських засобів [103]. Дослідження проведено в скороченому об'ємі, лише на одному виді тварин, оскільки надалі планується повне доклінічне вивчення. Тварини були розділені на 5 групи по 6 тварин у кожній. Досліджувані екстракти вводили внутрішньошлунково в дозі 5000 мг/кг. Тваринам першої та другої груп вводили екстракти трави п. європейського (екстрагенти – вода або 70 % етанол); тваринам третьої та четвертої груп – екстракти кореневищ з коренями підлісника європейського (екстрагент – вода або 70 % етанол); тварини п'ятої групи – контрольні. За тваринами спостерігали протягом 14 діб. На 15-й день дослідження тварин виводили з експерименту методом цервікальної дислокації шийних хребців під ефірним наркозом [103].

Ступінь токсичності екстрактів оцінювали за загальним станом тварин експериментальних груп (їх апетитом, зміною кольору шкіри та слизових оболонок, станом волосяного покриву, диханням, наявності судом, летальності, гематологічними та біохімічними показниками крові тварин, морфологічними ознаками внутрішніх органів), клас токсичності екстрактів п. європейського визначали за загальноприйнятою класифікацією [103].

Дослідження протизапальної активності. Для вивчення впливу одержаних екстрактів п. європейського на протікання ексудативної фази запалення нами використовувалась модель набряку лапи щура, викликана субплантарним введенням флогогенного агенту [103]. З цією метою під апоневроз підшви задньої лапи вводили 0,1 мл 1 % розчину карагеніну. Досліди проводили на білих нелінійних щурах-самцях масою 190 – 230 г.

Тварини були розділені на 6 групи по 6 тварин у кожній.

За 1 годину і зразу після введення флогогенного агенту тваринам першої та другої груп внутрішньошлунково вводили водні розчини екстрактів трави п. європейського (екстрагент – вода очищена або 70 % етанол) в дозі 100 мг/кг; тваринам третьої та четвертої груп – екстракти кореневищ з коренями п. європейського (екстрагент – вода очищена або 70 % етанол) в дозі 100 мг/кг відповідно; тваринам п'ятої групи – рослинний препарат порівняння кверцетин (ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ») (препарат рослинного походження з доведеною протизапальною активністю в умовно-ефективній дозі 5 мг/кг); тварини шостої групи – контрольні [104].

Вимірювання об'єму лапи виконували онкометрично до початку експерименту, через 1 год, через 3 год і в момент найбільшого розвитку набряку – через 5 год після введення флогогенного агенту.

Вплив екстрактів з сировини п. європейського оцінювали за здатністю пригнічувати набряк лап щурів в динаміці у порівнянні з тваринами контрольної групи та дією препарату порівняння. Отримані показники оцінювали за допомогою статистичних методів аналізу.

Показник пригнічення запальної реакції (X, %) обчислювали за формулою 2.12:

$$X = \frac{\Delta V_k - \Delta V}{\Delta V_k} \times 100 \quad (2.12),$$

де: X – антиексудативна активність, %; ΔV_k – приріст об'єму набряклої лапи в контролі; ΔV – приріст об'єму набряклої лапи в досліді.

Вивчення кровостинної дії екстрактів з трави та кореневищ з коренями п. європейського було проведено на статевозрілих мурчаках, які були вирощені у віварію ІФНМУ та стандартизовані за фізіологічними та біохімічними показниками.

Гемостатичні властивості досліджуваних екстрактів визначали за тривалістю кровотечі (за методом Дюке), яка спостерігалася після нанесення різаної рани тваринам та фіксували з використанням секундоміру.

Лінійну різану рану у мурчаків моделювали шляхом розрізу за допомогою скальпеля усіх шарів попередньо депільованої шкіри на боковій поверхні стегна задньої лапки. Стандартна різана рана мала розміри 2,5×0,3 см. Перед нанесенням рани мурчакам проводили місцеве знеболення 2 % розчином новокаїну [105].

Тварини були поділені на 6 груп (по 6 голів у кожній). Тваринам першої та другої груп відразу після моделювання різаної рани на раневу поверхню накладали марлеву серветку, складену вчетверо, просочену водним розчином екстрактів трави п. європейського (екстрагент – вода очищена або 70 % етанол); тваринам третьої та четвертої груп – водним розчином екстрактів кореневищ з коренями п. європейського (екстрагент – вода очищена або 70 % етанол); тваринам п'ятої групи – препаратом порівняння «Екстракт перцю водяного рідкий» (ПрАТ «Фітофарм»); тварини шостої групи – контрольні.

Вивчення ранозагоювальної дії екстрактів з трави та кореневищ з коренями п. європейського було проведено на статевозрілих мурчаках. У досліді моделювали асептичну різану рану. Для цього тваринам під місцевою анестезією на депільованій ділянці шкіри бокової поверхні стегна задньої лапки робили надріз довжиною 25 мм та глибиною 5 мм [106].

Тварини були поділені на 6 груп (по 6 голів у кожній). Тваринам першої та другої груп після моделювання різаної рани 2 рази на день наносили водний розчин екстрактів трави п. європейського (екстрагент – вода очищена або 70 % етанол); тваринам третьої та четвертої груп – водний розчин екстрактів кореневищ з коренями п. європейського (екстрагент – вода очищена або 70 % етанол); тваринам п'ятої групи – препарат порівняння «Рекутан» (ТзОВ «Здоров'я»); тварини шостої групи – контрольні.

Планіметрію ран проводили до повного їх загоєння у всіх групах досліджуваних тварин [107].

Вивчення антимікробної активності екстрактів п. європейського проводили методом дифузії активних речовин в агар із застосуванням паперових дисків за методикою А. М. Чорномірдіка [108, 109].

Концентрація активної речовини на дисках складала 5 мг. Як універсальне поживне середовище використовували 5 % кров'яний агар та добові бульйони культур на основі 1 % цукрового бульйону в суспензії щільністю 1 млрд мікробних тіл. Для цього 1 мл бактеріальної суспензії наносили на поверхню 5 % кров'яного агару та рівномірно втирали в нього. Посіви інкубували при температурі 37 °С впродовж 24 – 72 годин залежно від особливостей досліджуваних культури. Оцінку активності досліджуваних екстрактів проводили на стандартних штаммах мікроорганізмів: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 33420, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

Активність екстрактів трави та кореневищ з коренями п. європейського визначали за здатністю затримувати ріст мікроорганізмів (в мм) навколо паперового диска, насиченого досліджуваною речовиною.

Для порівняння бактеріостатичної активності досліджуваних препаратів використовували паперові диски з антибіотиками: ампіцилін – 30 мкг/диск, олеандоміцин – 30 мкг/диск [109].

2.3.11 Дослідження морфолого-анатомічних ознак надземних та підземних органів підлісника європейського

Дослідження морфолого-анатомічних ознак сировини п. європейського проводили за методиками ДФУ (2.0 – 2.8.3, 2.8.23). Для дослідження використовували повітряно-суху та свіжозібрану і фіксовану у суміші гліцерин-спирт-вода (1:1:1) рослинну сировину [55].

Вивчення макроскопічних ознак проводили при денному освітленні неозброєним оком або з використанням лупи ($\times 10$).

Анатомічні діагностичні ознаки визначали під мікроскопами ЛОМО Р-1 (Росія) та REICHERT L.4 (Австрія) (окуляри – $\times 7$, $\times 10$, $\times 15$, об'єктиви – $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$). Отримані дані фіксували за допомогою схематичних рисунків та мікрофотознімків, зроблених цифровою фотокамерою Samsung ST65.

2.3.12 Ресурсознавчі дослідження

Визначення сировинних запасів проводили шляхом визначення площі заростей, їх урожайності та біологічного запасу. При визначенні урожайності встановлювали два параметри: загальну площу зарості (візуально прирівнювали межі зарості до геометричної фігури та обчислювали її площу згідно з правилами геометрії) та загальну кількість зібраної якісної сировини (згідно з вимогами АНД). Для визначення урожайності траву разом з прикореневими листками на ділянках площею 1 м² зрізали серпами, ножами або секаторами та зважували. Перерахунок на повітряно-суху сировину проводили за допомогою встановленого коефіцієнту висушування сировини. Біологічний запас визначали як загальну кількість сировини, що можна заготовити на певній території та обчислювали добуток урожайності на площу зарості [110, 111].

2.3.13 Дослідження числових показників доброякісності сировини

Визначення втрати в масі при висушуванні, вмісту загальної золи, вмісту сторонніх домішок проводили за методиками ДФУ 2.0 [55].

2.3.14 Визначення технологічних параметрів рослинної сировини

Визначення технологічних параметрів трави та кореневищ з коренями п. європейського проводили за загальноприйнятими методиками ДФУ 2.0 [55].

Питому густину визначали як відношення маси абсолютно сухої подрібненої сировини до об'єму рослинної сировини. Близько 5,0 г (точна наважка) подрібненої сировини поміщали в пікнометр місткістю 100 мл, заливали водою очищеною на 2/3 об'єму і витримували на киплячому водяному нагрівнику протягом 1,5 – 2 год, періодично перемішуючи з метою повного видалення повітря з сировини. Потім пікнометр охолоджували до 20 °С, доводили об'єм до мітки водою очищеною. Таким чином, визначали вагу пікнометра з сировиною і водою. Попередньо визначали вагу пікнометра з водою.

Розрахунок питомої густини проводили за формулою (2.13):

$$d_{\pi} = \frac{P \cdot d_{\text{ж}}}{P + G - F}, \quad (2.13)$$

де: P – вага абсолютно сухої подрібненої сировини, г; G – вага пікнометра з водою, г; F – вага пікнометра з водою і сировиною, г; $d_{\text{ж}}$ – питома вага води, г/см³ ($d_{\text{ж}} = 0,9982$ г/см³)

Об'ємну густину визначали як співвідношення маси подрібненої сировини при природній або заданій вологості до її повного об'єму, що вміщує пори, тріщини й капіляри, заповнені повітрям. Близько 5,0 г (точна наважка) подрібненої сировини поміщали у пікнометр місткістю 100 мл. Заливали водою очищеною з бюретки до мітки. Періодично збовтували вміст пікнометра для змочування частинок подрібненої сировини. За різницею об'ємів мірної колби та об'єму, який витратили з бюретки, визначали об'єм, який займає сировина (формула 2.14):

$$d_o = \frac{P_o}{V_o}, \quad (2.14)$$

де: P_o – вага подрібненої сировини при природній або заданій вологості, г; V_o – об'єм, який займає сировина, см³.

Насипну густину визначали як відношення подрібненої сировини при природній або заданій вологості до повного об'єму, що займає сировина разом з порами часток та вільним об'ємом між ними. У мірний циліндр завантажували подрібнену сировину, злегка струшуючи для вирівнювання, і визначали повний об'єм, який вона займає. Після цього сировину зважували. Розрахунок насипної густини рослинної сировини проводили за формулою (2.15):

$$d_n = \frac{P_n}{V_n}, \quad (2.15)$$

де: P_n – вага подрібненої сировини при природній або заданій вологості, г;
 V_n – об'єм, який займає сировина, см^3 .

За результатами визначення питомої, об'ємної та насипної густини були проведені розрахунки пористості, порізності та вільного об'єму шару сировини.

Пористість сировини визначали як величину порожнин всередині частинок сировини і визначали як відношення різниці між питомою і об'ємною густиною до питомої густини. Пористість сировини розраховували за формулою (2.16):

$$\Pi_c = \frac{d_n - d_o}{d_n}, \quad (2.16)$$

де: d_n – питома густина сировини, г/см^3 ; d_o – об'ємна густина сировини, г/см^3 .

Порізність шару характеризували як величину порожнин між частинками рослинного матеріалу і визначали як відношення різниці між об'ємною і насипною густиною до об'ємної густини (формула 2.17):

$$\Pi_{ш} = \frac{d_o - d_n}{d_o}, \quad (2.17)$$

де: d_o – об'ємна густина сировини, г/см^3 ; d_n – насипна густина сировини, г/см^3 .

Вільний об'єм шару характеризували як відносний об'єм вільного простору в одиниці шару сировини (порожнини всередині частинок і між ними). Його розраховували як відношення різниці між питомою і насипною густиною до питомої густини. Вільний об'єм шару розраховували за формулою (2.18):

$$V = \frac{d_n - d_n}{d_n}, \quad (2.18)$$

де: d_n – питома густина сировини, г/см^3 ; d_n – насипна густина сировини, г/см^3 .

2.3.15 Статистична обробка результатів

Статистичну обробку результатів проводили, обчислюючи середню арифметичну величину, середню похибку арифметичної величини, вірогідність різниць результатів методам варіаційної статистики. Кількість повторень дослідів (n) дорівнює 3, 6, 9 [55, 112, 113, 114].

РОЗДІЛ 3

ВИВЧЕННЯ СКЛАДУ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН ПІДЛІСНИКА ЄВРОПЕЙСЬКОГО

3.1 Дослідження якісного складу біологічно активних речовин

Результати аналізу літературних джерел, наведених у розділі 1, свідчать, що хімічний склад трави та кореневищ з коренями п. європейського, який зростає на території України, не вивчено. Тому виділення і дослідження основних діючих речовин п. європейського є актуальним.

Виявлення груп БАР проводили у надземних та підземних органах п. європейського, які були заготовлені на околицях с. Вовчинці Тисменицького району Івано-Франківської області. За результатами реакцій ідентифікації у водних витяжках з сировини п. європейського встановлено наявність вільних цукрів, водорозчинних полісахаридів, сапонінів, танінів, аскорбінової кислоти, пектинових речовин; у спиртових витяжках – речовин фенольного характеру: флавоноїди, гідроксикоричні кислоти та кумарини. В досліджуваній сировині алкалоїдів не виявлено [115, 116].

Результати реакцій ідентифікації основних груп БАР у досліджуваній сировині наведено у табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Основні групи БАР у траві та кореневищах з коренями підлісника європейського

Реактив.	Аналітичний ефект	Наявність аналітичного ефекту *	
		Надземні органи	Підземні органи
1	2	3	4
<i>Алкалоїди</i>			
Реактив Драгендорфа	Не виявлено	-	-
Реактив Бушарда	Не виявлено	-	-
Реактив Зонненштейна	Не виявлено	-	-

1	2	3	4
10 % розчин таніну	Не виявлено	-	-
1 % розчин пікринової кислоти	Не виявлено	-	-
<i>Амінокислоти</i>			
0,1 % розчин нінгідрину	Синьо-фіолетове забарвлення	++	+
<i>Антраценпохідні</i>			
Реакція Чірха	Не виявлено	-	-
Реакція Борнтрєгера	Не виявлено	-	-
<i>Аскорбінова кислота</i>			
Розчин натрію 2,6-дихлорфеноліндофеноляту	Знебарвлення розчину	+	-
<i>Вільні цукри</i>			
Мідно-тарtratний реактив	Червоно-бурий осад	+++	++
<i>Водорозчинні полісахариди</i>			
95 % етанол	Аморфний світло-коричневий осад	+++	++
<i>Кардіостероїди</i>			
Реакція Келлера-Кіліані	Не виявлено	-	-
Реакція Легалє	Не виявлено	-	-
Реакція Бальє	Не виявлено	-	-
Реакція Лібармана-Бухарда	Не виявлено	-	-
<i>Кумарини</i>			
Лактонна проба	Помутніння розчину	±	±
Сульфанілова кислота діазотована	Коричневе забарвлення розчину	±	±
<i>Пектинові речовини</i>			
95 % етанол	Аморфний світло-коричневий осад	+++	++
<i>Похідні простих фенолів</i>			
Кристалік ферума (II) сульфату	Синьо-фіолетове забарвлення	++	++

1	2	3	4
10 % розчин натрію фосфорно-молібденового в хлористоводневій кислоті	Синьо-зелене забарвлення	++	++
<i>Сапоніни</i>			
Вода очищена	Стійка піна	+++	++
Кислота хлористоводнева 0,1 М	Стійка піна	+++	++
Натрію гідроксид 0,1 М	Стійка піна	+++	++
<i>Таніни</i>			
Розчин ферум (III) амоній сульфату	Чорно-зелене забарвлення	+++	+++
1 % розчин желатини	Аморфний осад, який при надлишку желатини зникає	+++	+++
1 % розчин хініну гідрохлориду	Світло-коричневий аморфний осад	+++	++
<i>Флавоноїди</i>			
Ціанідинова реакція за Бріантом	Червоно-коричнєве забарвлення	++	+
5 % розчин ферум (III) хлориду	Брудно-зелене забарвлення	++	+
2 % розчину натрію карбонату	Жовте забарвлення	++	+
5 % спиртовий розчин алюмінію хлориду	Жовте забарвлення	++	+
<i>Хромони</i>			
Реакція спікання з лугом	Не виявлено	-	-

Примітки: «+» – реакція позитивна, кількість знаків вказує на інтенсивність; «-» – реакція негативна.

Наведені дані в табл. 3.1 свідчать, що сировина п. європейського вміщує таніни конденсованої групи, флавоноїди, похідні простих фенолів, сапоніни, вільні цукри, амінокислоти, аскорбінову кислоту, водорозчинні полісахариди та пектинові речовини, кумарини.

При проведенні реакцій ідентифікації основних груп сполук у сировині п. європейського не виявлено алкалоїдів, антраценпохідних, хромонів, кардіостероїдів.

3.2 Хроматографічний аналіз біологічно активних речовин

Важлива роль у профілактиці та лікуванні багатьох захворювань належить комплексним препаратам рослинного походження, компонентами яких є органічні кислоти. Органічні кислоти мають широкий спектр біологічної дії на організм людини, сприяють зменшенню процесів нітрузування в організмі та зниженню хімічного канцерогенезу. Деякі кислоти мають антиоксидантні, протиалергічні, антимікробні та протизапальні властивості, а також беруть участь в обміні речовин, підвищують захисні сили й життєвий тонус організму. Вони є проміжними продуктами оксидації вуглеводів, жирів, амінокислот і білків, а також використовуються в синтезі амінокислот, алкалоїдів, стероїдів [94, 95, 116, 117].

Виявлення *органічних кислот* проводили хроматографічним методом в порівнянні з вірогідними зразками (розділ 2.3.2).

Результати хроматографічного дослідження органічних кислот трави та кореневищ з коренями п. європейського представлено у табл. 3.2.

Методом паперової хроматографії встановлено наявність аскорбінової, щавлевої, лимонної та яблучної кислот у траві п. європейського; лимонної, щавлевої та яблучної кислот в кореневищах з коренями [117, 118].

Амінокислоти відіграють значну роль у процесі нормального кровотворення та зупинці кровотеч. Рослинні фітопрепарати, де разом з біологічно активними речовинами містяться амінокислоти, виявляють більш виражену кровоспинну та протизапальну дію [119].

Якісний склад *амінокислот* в досліджуваних об'єктах визначали за допомогою методу паперової хроматографії (розділ 2.3.2). Амінокислоти ідентифікували за забарвленням плям і величиною R_f в порівнянні з вірогідними зразками [65 – 67].

**Хроматографічне дослідження органічних кислот трави та кореневищ з
коренями підлісника європейського**

№ речовини	Назва кислоти	Величини Rf в рухомих фазах				Забарвлення плям реактивом	
		К		А		0,05 %спиртовий розчин бромтимолового синього	0,1 % спиртовий розчин 2,6-дихлорфенол- індофенолят натрію
		Трава	Кореневища з коренями	Трава	Кореневища з коренями		
1.	Аскорбінова	0,40	-	0,40	-	Ясно-жовте (на синьому фоні)	Рожеве (на блакитному фоні)
2.	Щавлева	0,09	0,09	0,40	0,39	-//-	-//-
3.	Лимонна	0,89	0,90	0,89	0,89	-//-	-//-
4.	Яблучна	0,19	0,18	0,17	0,18	-//-	-//-

Якісний амінокислотний склад сировини п. європейського в рухомій фазі Г представлений на рис. 3.1.

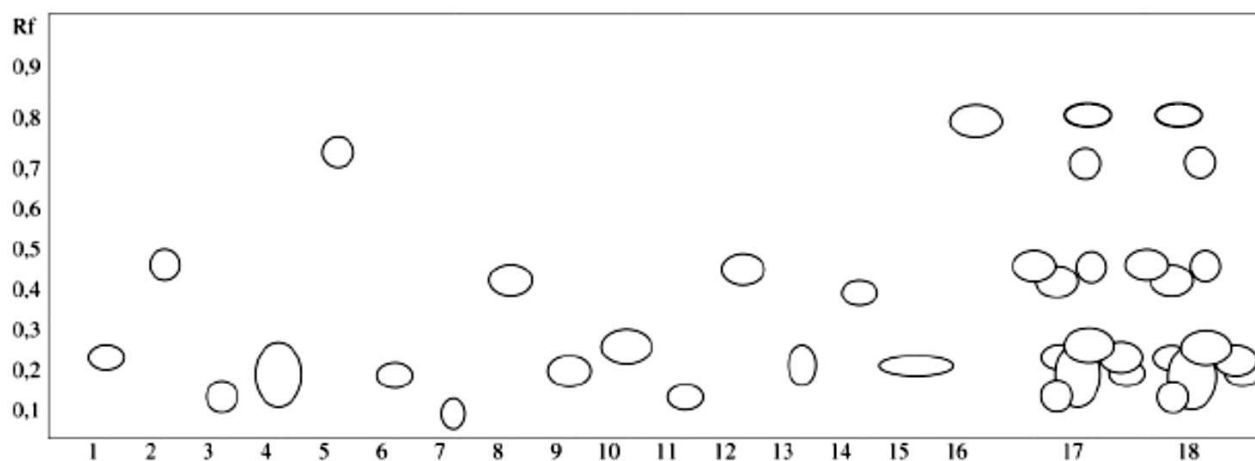


Рис. 3.1 Схема хроматограми амінокислот підлісника європейського. Рухома фаза *n*-бутанол-оцтова кислота-вода (4:1:2): 1 – аланін, 2 – валін, 3 – гістидин, 4 – аспарагінова кислота, 5 – лейцин, 6 – серин, 7 – орнітин, 8 – метіонін, 9 – аргінін, 10 – пролін, 11 – глютамін, 12 – треонін, 13 – аспаргін, 14 – фенілаланін, 15 – глютамінова кислота, 16 – ізатин, 17 – витяжка з трави п. європейського, 18 – витяжка з кореневищ з коренями п. європейського

За результатами хроматографічного аналізу в траві та кореневищах з коренями п. європейського методом паперової хроматографії ідентифіковано аспарагінову та глютамінову кислоти, аланін, аргінін, лейцин, гістидин, серин, валін, треонін, метіонін, пролін [115, 120, 121].

Фітопрепарати на основі фенольних сполук широко використовують як протимікробні, кровоспинні, протизапальні, жовчогінні, сечогінні, гіпотензивні, тонізуючі, в'язучі та проносні засоби. Фенольні сполуки рослинного походження малотоксичні та практично не проявляють побічних ефектів [122].

Якісний склад *фенольних сполук* трави та кореневищ з коренями п. європейського вивчали методом двовимірної паперової хроматографії. Хроматограми розглядали у видимому та УФ-світлі. Речовини, які в УФ-світлі мали темне забарвлення змінювали його до жовтого під дією парів аміаку; які мали в УФ-світлі блакитну флуоресценцію після обробки парами аміаку підсилювали забарвлення або змінювали на блакитно-зелене.

Результати двовимірної хроматографії фенольних сполук трави та кореневищ з коренями п. європейського представлено в табл. 3.3 та рис. 3.2 і 3.3.

Таблиця 3.3

**Фенольні сполуки трави та кореневищ з коренями
підлісника європейського**

Пляма	Rf (15% оцтова кислота)	Rf (БОВ (4:1:2))	Rf (15% оцтова кислота)	Rf (БОВ (4:1:2))	Флуоресценція в УФ-світлі	Флуоресценція в УФ-світлі після обробки парами аміаку	Забарвлення плями після обробки 3 % розчином алюмінію (ІІІ) хлориду
	Трава		Кореневища з коренями				
1	2	3	4	5	6	7	8
1	0,26	0,19	-	-	-	темна	жовта
2	0,43	0,84	0,34	0,77	блакитна	блакитна	-

1	2	3	4	5	6	7	8
3	0,56	0,59	0,49	0,51	блакитна	блакитна	-
4	0,69	0,62	0,59	0,63	жовта	жовта	-
5	0,86	0,91	0,84	0,89	блакитна	блакитно-зелена	-
6	0,60	0,48	-	-	блакитна	блакитна	блакитна
7	0,51	0,47	-	-	яскраво-жовта	яскраво-жовта	яскраво-жовта
8	0,11	0,92	0,18	0,96	блакитна	блакитна	блакитна

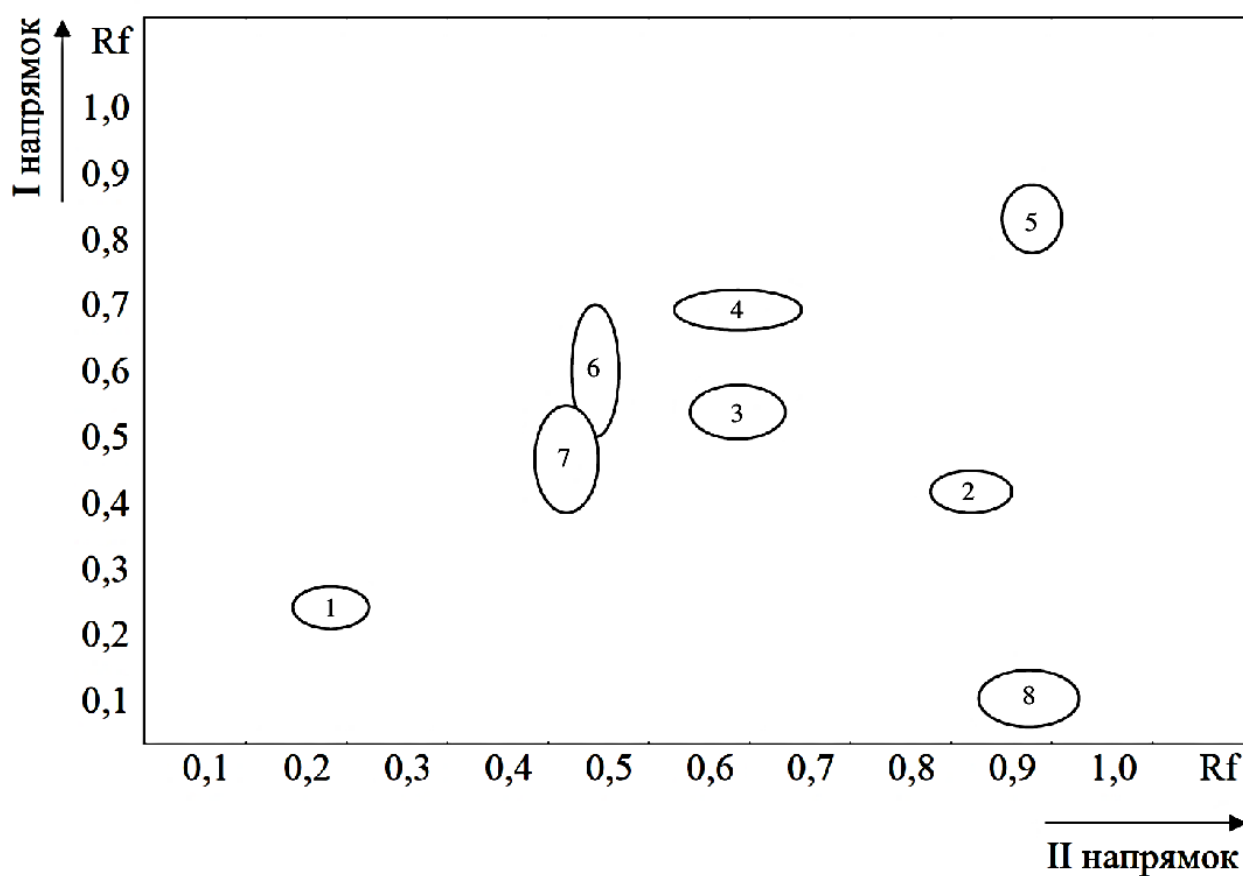


Рис. 3.2 Схема двовимірної хроматограми фенольних сполук трави підлісника європейського. Рухома фаза: I напрямок – 15 % оцтова кислота, II – напрямок *n*-бутанол-оцтова кислота-вода (4:1:2)

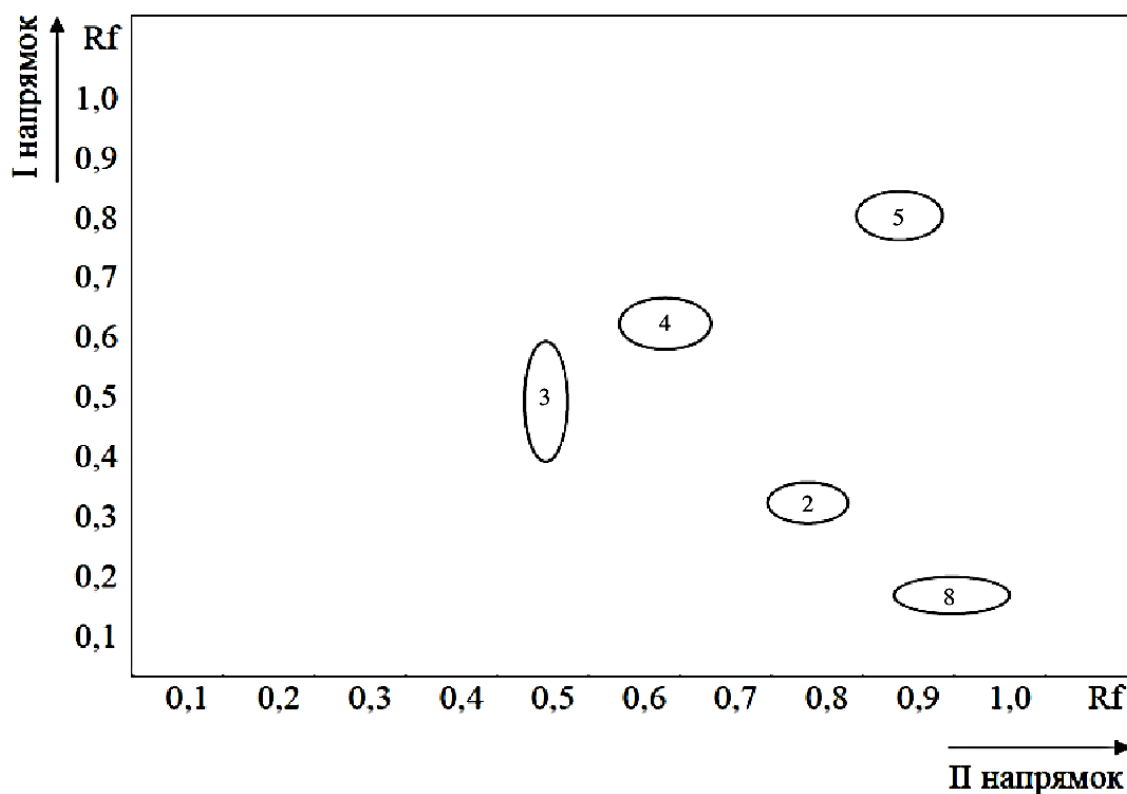


Рис. 3.3 Схема двовимірної хроматограми фенольних сполук кореневищ з коренями підлісника європейського. Рухома фаза: I напрямок – 15 % оцтова кислота, II – напрямок *n*-бутанол-оцтова кислота – вода (4:1:2)

Методом двовимірної висхідної хроматографії на основі флуоресценції в УФ-світлі, рухливості речовин на хроматографах у траві та кореневищах з коренями п. європейського виявлено 8 та 5 речовини фенольної природи відповідно, які представлені флавоноїдами та гідроксикоричними кислотами. За значенням R_f та зміною забарвлення плям 3 речовини (1, 4, 7) попередньо нами ідентифіковані як флавоноїди, 5 речовини (2, 3, 5, 6, 8) – як гідроксикоричні кислоти (табл. 3.3, рис. 3.2 та 3.3).

Вивчення *мономерного складу полісахаридних комплексів* проводили методом тонкошарової та паперової хроматографії. Для більш точного вивчення полісахаридних комплексів проводили визначення динаміки гідролізу полісахаридів сульфатною кислотою при нагріванні протягом 1, 3 та 5 годин. Результати хроматографічного дослідження моносахаридного складу полісахаридних комплексів наведено в табл. 3.4.

За результатами аналізу одержаних даних було встановлено, що повне розщеплення полімерних сполук до молекул мономерів відбувається протягом 3 год. При подальшому гідролізі зменшується кількість мономерів, що свідчить про їх деструкцію.

На основі проведених досліджень в траві п. європейського в ВРПС було виявлено такі моносахариди як глюкозу, арабінозу, ксилозу, фруктозу; в ПР – глюкозу, арабінозу, ксилозу, глюкуронову кислоту; в ГцА – глюкозу, ксилозу, галактуонову кислоту; в ГцБ – глюкозу, арабінозу, рамнозу, фруктозу, глюкуронову кислоту.

В кореневищах з коренями п. європейського в ВРПС було ідентифіковано глюкозу, арабінозу, рамнозу, фруктозу; в ПР – глюкозу, арабінозу, рамнозу, глюкуронову кислоту; в ГцА – глюкозу, арабінозу, ксилозу, фруктозу, галактуонову кислоту; в ГцБ – глюкозу, арабінозу, рамнозу, ксилозу, глюкуронову кислоту [123].

Таблиця 3.4

Мономерний склад полісахаридних комплексів з надземних і підземних органів підлісника європейського

Об'єкт дослідження	Час екстракції, год	Гідролізат комплексів	Назва моносахариду						
			Глюкоза	Арабіноза	Рамноза	Ксилоза	Фруктоза	Глюкуронова кислота	Галактуоронова кислота
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Трава підлісника європейського	1	ВРПС	+	-	-	-	-	-	-
		ПР	+	-	-	+	-	+	-
		ГцА	+	-	+	-	-	-	+
		ГцБ	+	-	+	+	+	+	-

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Трава підлісника європейського	3	ВРПС	+	+	-	+	+	-	-
		ПР	+	+	-	+	-	+	-
		ГцА	+	-	-	+	-	-	+
		ГцБ	+	+	+	-	+	+	-
	5	ВРПС	+	+	-	-	+	-	-
		ПР	+	+	-	-	-	+	-
		ГцА	+	-	+	+	+	-	+
		ГцБ	+	-	-	+	+	+	-
Кореневища з коренями підлісника європейського	1	ВРПС	+	+	-	-	+	-	-
		ПР	+	-	+	-	+	+	-
		ГцА	+	+	-	+	-	-	+
		ГцБ	+	-	-	-	-	+	-
	3	ВРПС	+	+	+	-	+	-	-
		ПР	+	+	+	-	-	+	-
		ГцА	+	+	-	+	+	-	+
		ГцБ	+	+	+	+	-	+	-
	5	ВРПС	+	+	+	-	-	-	-
		ПР	+	-	-	+	-	-	-
		ГцА	+	-	-	+	-	+	+
		ГцБ	+	-	-	+	+	-	-

Примітка: + – виявлено моносахарид,

- – не виявлено моносахарид.

При ідентифікації вітаміну K_1 методом тонкошарової хроматографії на пластинках «Sorbfil» спостерігали появу плям з жовто-зеленою флуоресценцією, що свідчило про наявність вітаміну K_1 ($R_f = 0,67$) у траві та кореневищах з коренями п. європейського. При обприскуванні отриманих хроматограм 5 % розчином фосфорно-молібденової кислоти спостерігали буро-цегляне забарвлення плям, що підтверджувало наявність вітаміну K_1 у досліджуваній сировині.

3.3 Виділення та ідентифікація фенольних сполук з підлісника європейського

За результатами попереднього фітохімічного аналізу (розділ 3.1 та 3.2) в сировині п. європейського було встановлено наявність гідроксикоричних кислот, флавоноїдів, кумаринів. Отримані результати показали, що трава п. європейського характеризувалась більш значним вмістом фенольних сполук (за інтенсивністю забарвлення та величиною плям) у порівнянні з кореневищами з коренями. Виділення гідроксикоричних кислот проводили з трави та кореневищ з коренями п. європейського [124].

З метою виділення гідроксикоричних кислот в індивідуальному стані використовували методи розподільного фракціонування в системі “рідина – рідина”, колонкової хроматографії на силікагелі, препаративної хроматографії на папері з наступною рехроматографією та дробною кристалізацією (розділ 2.3.2).

На рис. 3.4. наведена схема виділення індивідуальних фенольних сполук з трави п. європейського.

Розділення речовин здійснювали методом адсорбційної хроматографії на колонках силікагелю з наступною повторною хроматографією, дробною кристалізацією, препаративною хроматографією на папері. Хроматографічному розділенню піддавали етилацетатну, *n*-бутанольну та водну фракції.

15,0 г упареного екстракту етилацетатної фракції розчиняли в 96 % етанолі, змішували з рівною кількістю силікагелю, підсушували до сипкості і

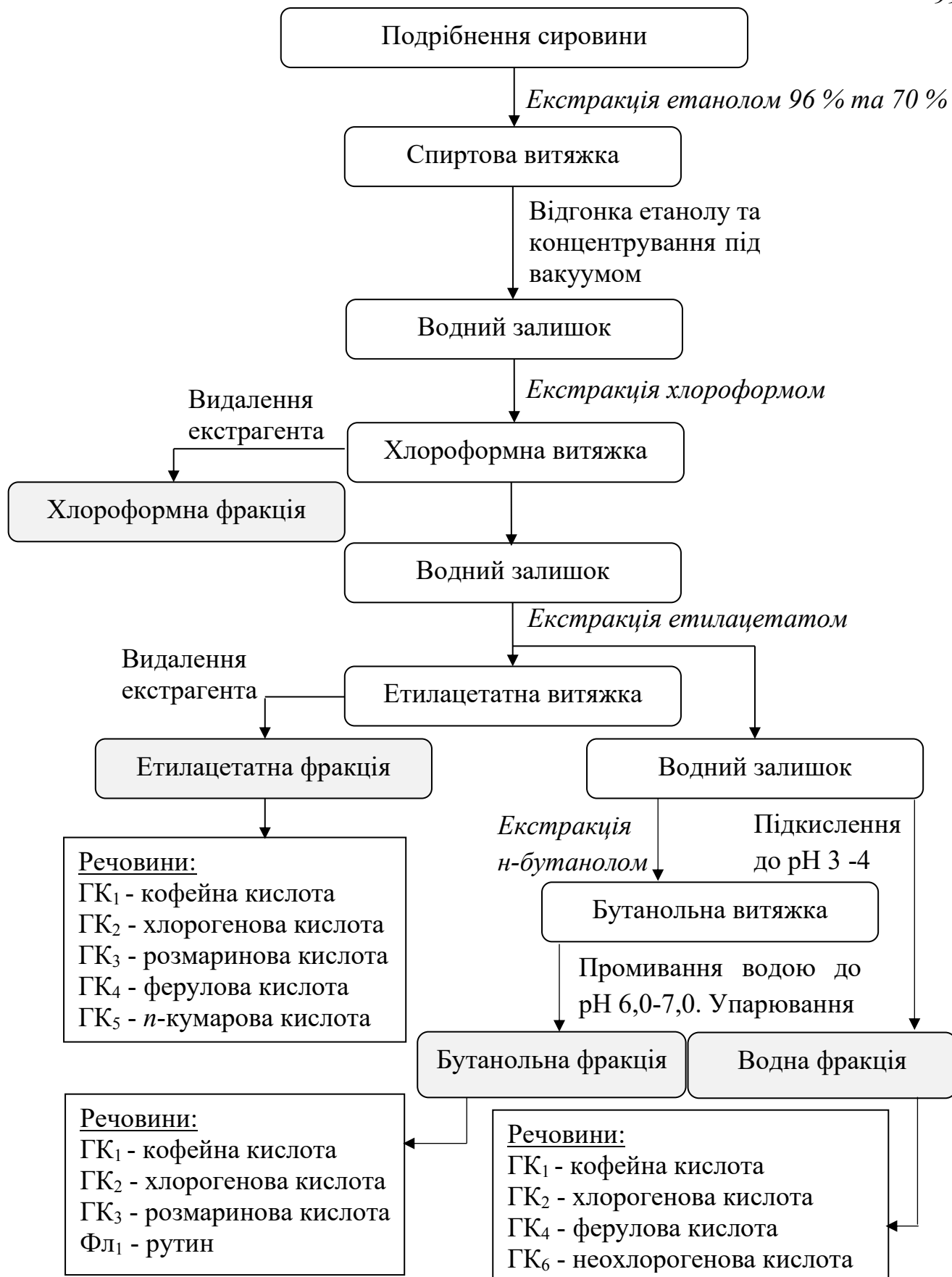


Рис. 3.4. Схема виділення індивідуальних фенольних сполук з трави підлісника європейського

наносили на підготовлену колонку. Компоненти фракції розподіляли на колонці силікагелю у співвідношенні фракція – сорбент (1:30). Елюювали водою та сумішшю води та етанолу з поступовим зростанням частки етанолу в суміші. Контроль процесу проводили переглядом колонки в УФ-світлі та методом ПХ в системах розчинників: *n*-бутанол – оцтова кислота – вода (4:1:2), 2 % оцтова кислота, 6 % оцтова кислота, 15 % оцтова кислота, 30 % оцтова кислота та 60 % оцтова кислота. Фракції збирали по 50 мл. Після хроматографування на папері марки «FiltrakFN- 1» в 15 % оцтовій кислоті однорідні за вмістом фракції об'єднували та упарювали досуха. Оскільки для деяких речовин були зафіксовані дуже близькі значення R_f , необхідним було проведення рехроматографування сумішей. З відібраних фракцій після перекристалізації були виділені речовини: ГК₁, ГК₂, ГК₃, ГК₄, ГК₅.

10,0 г бутанольної фракції розчиняли в 50 % етанолі, змішували з силікагелем, підсушували до сипкості та наносили у вигляді суспензії з водою на підготовлену колонку. Компоненти бутанольної фракції розподіляли на колонці у співвідношенні фракція – сорбент (1:30). Елюювали водою та сумішшю води з етанолом із поступовим зростанням концентрації етилового спирту до 80 %. Процес контролювали шляхом перегляду колонки в УФ-світлі та методом ПХ в системах розчинників: *n*-бутанол – оцтова кислота – вода (4:1:2), 2 % оцтова кислота, 6 % оцтова кислота, 15 % оцтова кислота, 30 % оцтова кислота та 60 % оцтова кислота. Фракції збирали по 50 мл. Упарювали та хроматографували та, у випадку їх ідентичності, об'єднували. З відібраних фракцій після перекристалізації з 96 % етанолом було виділено речовини: ГК₁, ГК₂, ГК₃, Фл₁.

5,0 г упареного екстракту водної фракції розчиняли в 50 мл води очищеної, змішували з рівною кількістю силікагелю, підсушували до сипкості та наносили на підготовлену колонку. Компоненти фракції розподіляли на колонці у співвідношенні фракція – сорбент (1:30). Елюювали водою та сумішшю води з етанолом з поступовим зростанням концентрації етилового спирту до 10 %. Процес контролювали шляхом перегляду колонки в УФ-світлі та методом ПХ в системах розчинників: *n*-бутанол – оцтова кислота – вода (4:1:2), 2 % оцтова кислота, 6 % оцтова кислота, 15 % оцтова кислота, 30 % оцтова кислота та 60 %

оцтова кислота. Фракції збирали по 50 мл. Упарювали та хроматографували та, у випадку їх ідентичності, об'єднували. З відібраних фракцій після перекристалізації з 96 % етанолом було виділено речовини: ГК₁, ГК₂, ГК₄, ГК₆.

Для ідентифікації виділених сполук використовували паперову хроматографію, УФ-спектроскопію та інші фізико-хімічні методи.

Речовина ГК₁ – *кофейна кислота* – безбарвні кристали, добре розчинні в етанолі, малорозчинні в ацетоні, нерозчинні у хлороформі та бензолі, Т. пл. 194 – 195 °С. При проведенні ПХ в УФ-світлі речовина має блакитну флуоресценцію, яка при обробці парами аміаку стає яскраво-блакитною. Спектральні дослідження УФ-області показують максимуми поглинання при 245, 299 і 325 нм, дозволяє віднести досліджувану речовину до гідроксикоричних кислот. В продуктах лужної деструкції речовини ГК₁ знайдено протокатехову кислоту. Порівняльне хроматографічне дослідження речовини ГК₁ з вірогідним зразком кофейної кислоти вказує на їх ідентичність, що дає змогу охарактеризувати речовину ГК₁ як 3,4-дигідроксикоричну кислоту або кофейну кислоту.

Речовина ГК₂ – *хлорогенова кислота* – безбарвні кристали, легко розчинні у воді та спирті, важко розчинні у диетиловому ефірі, нерозчинні у хлороформі. Т. пл. 203 – 205 °С. На хроматограмах в УФ-світлі речовина ГК₂ має блакитну флуоресценцію, в парах аміаку – зеленувату, при обробці розчином калію гідроксиду – жовту. Спектральні дослідження в УФ-області дозволили віднести досліджувану речовину до гідроксикоричних кислот (максимум поглинання при 240, 298 і 325 нм). В продуктах лужної деструкції речовини ГК₂ знайдено протокатехову та кофейну кислоти. Хроматографічне порівняння речовини ГК₂ з вірогідним зразком хлорогенової кислоти в різних системах розчинників підтверджує її ідентичність і дозволяє охарактеризувати речовину ГК₂ як 5-О-кофеїл-D-хінну кислоту або хлорогенову кислоту.

Речовина ГК₃ – *розмаринова кислота* – червоно-оранжевий порошок, погано розчинний у воді, легко розчинний в етанолі, метанолі, хлороформі, диетиловому ефірі та бензолі, Т. пл. 171 – 175 °С. При проведенні ПХ в УФ-світлі речовина має зеленувато-блакитну флуоресценцію, яка при обробці парами аміаку стає яскравішою. Спектральні дослідження в УФ-області

показують максимум поглинання при 220, 290 і 326 нм. Це дозволяє віднести досліджувану речовину до гідроксикоричних кислот. В продуктах лужного гідролізу речовини ГК₃ знайдено кофейну кислоту. Порівняльне хроматографічне дослідження речовини ГК₃ з вірогідним зразком розмаринової кислоти вказує на її ідентичність, що дає змогу охарактеризувати речовину ГК₃ як 1-карбокси-2-(2,4-дигідроксифеніл) етиловий ефір *транс*-кофейну кислоту або розмаринову кислоту.

Речовина ГК₄ – *ферулова кислота* – білий кристалічний порошок, Т. пл. 167 – 169 °С, на хроматограмах в УФ-світлі має блакитну флуоресценцію, яка переходить під дією парів аміаку в яскраво-блакитну. Спектральні дослідження в УФ-області дозволили віднести досліджувану речовину до гідроксикоричних кислот (максимуми поглинання при 230, 291 і 323 нм). В продуктах лужної деструкції речовини ГК₄ ідентифіковано ванілінову кислоту, а змішана проба її з вірогідним зразком ферулової кислоти не призводила до виникнення депресії Т. пл. При хроматографуванні методом ПХ вказана проба проявляється як одна нероздільна пляма. Таким чином речовину ГК₄ можна охарактеризувати як 3-метокси-4-гідроксикоричну кислоту або ферулову кислоту.

Речовина ГК₅ – *n-кумарова кислота* – малорозчинна у воді, добре розчинна в спирті та диетиловому ефірі. Т. пл. 212 – 214 °С. На хроматограмах в УФ-світлі має блакитну флуоресценцію, яка переходить в жовто-блакитну. У продуктах лужної деструкції речовини ГК₅ встановлено *n*-гідроксибензойну кислоту. Спектральні дослідження в УФ-області дозволили віднести досліджувану речовину до гідроксикоричних кислот (максимуми поглинання при 220 і 310 нм). Змішана проба речовини ГК₅ з *n*-кумаровою кислотою не давала депресії температури плавлення. Таким чином, на підставі проведених досліджень речовину ГК₅ можна охарактеризувати як 4-гідроксикоричну кислоту або *n*-кумарову кислоту.

Речовина ГК₆ – *неохлорогенова кислота* – білий аморфний порошок, має однакову флуоресценцію як і речовина ГК₂. Різні величини R_f даних сполук в системах розчинників свідчать, що вони є ізомерами. УФ-спектр речовини має максимуми поглинання при 235, 299 і 325 нм, які характерні для гідроксикоричних кислот. В продуктах лужного гідролізу речовини ГК₆

знайдено протокатехову та кофейну кислоти. В результаті лужного гідролізу речовини ГК₆ утворювались кофейна та D-хінна кислоти в еквімолекулярних кількостях. Місце приєднання кофейної кислоти до D-хінної встановлено за результатами лактонізації цих сполук: утворення лактону хінідіну спостерігається для речовини ГК₆, що вказує на наявність гідроксигрупи в С-3-положенні D-хінної кислоти. Отже, речовина ГК₆ є складним ефіром кофейної та D-хінної кислот. При хроматографічних дослідженнях в різних системах розчинників з вірогідним зразком неохлорогенової кислоти одержували одну нероздільну пляму. На основі одержаних результатів можна охарактеризувати речовину ГК₆ як 3-О-кофеїл-D-хінну кислоту або неохлорогенову кислоту.

Речовина Фл₁ – *рутин* – жовті кристали, Т. пл. 189 – 192 °С. УФ-спектр речовини Фл₁ має максимуми поглинання при 257, 265, 360 нм. Глікозидна природа речовини Фл₁ доведена негативним результатом ціанідинової проби за Бріантом (утворені червоні продукти реакції не переходять в октанольний шар), відновленням реактиву Фелінга після кислотного гідролізу, в УФ-світлі на хроматограмах речовина має темно-коричневу флуоресценцію, яка переходить в жовту під дією пари аміаку. При дослідженні продуктів кислотного гідролізу речовини Фл₁ було встановлено аглікон, який за фізико-хімічними властивостями ідентифіковано з кверцетином. В нейтралізованому гідролізаті хроматографією на папері в системі розчинників *n*-бутанол-піридин-вода (6:4:3) в порівнянні з вірогідними зразками було виявлено D-глюкозу і L-рамнозу. Змішана проба речовини Фл₁ і вірогідного зразка рутину не викликала депресії температури плавлення і на хроматограмах давала одну нероздільну пляму. Згідно з одержаними результатами речовину Фл₁ можна охарактеризувати як 3-О-β-D-рутинозид-5,7,3',4'-тетрагідроксифлавіон або рутин.

За інтенсивністю плям, їх флуоресценцією в УФ-світлі під дією хромогенних реактивів в етилацетантій, *n*-бутанольній та водній фракціях екстракту трави п. європейського виявлено 6 гідроксикоричних кислот (кофейна, хлорогенова, неохлорогенова, розмаринова, ферулова, *n*-кумарова) та 1 флавоноїд (рутин), а у фракціях екстракту кореневищах з коренями –

5 гідроксикоричних кислот (кофейна, хлорогенова, неохлорогенова, розмаринова, ферулова).

Схема проведених хімічних перетворень виділених гідроксикоричних кислот трави п. європейського наведена на рис. 3.5.

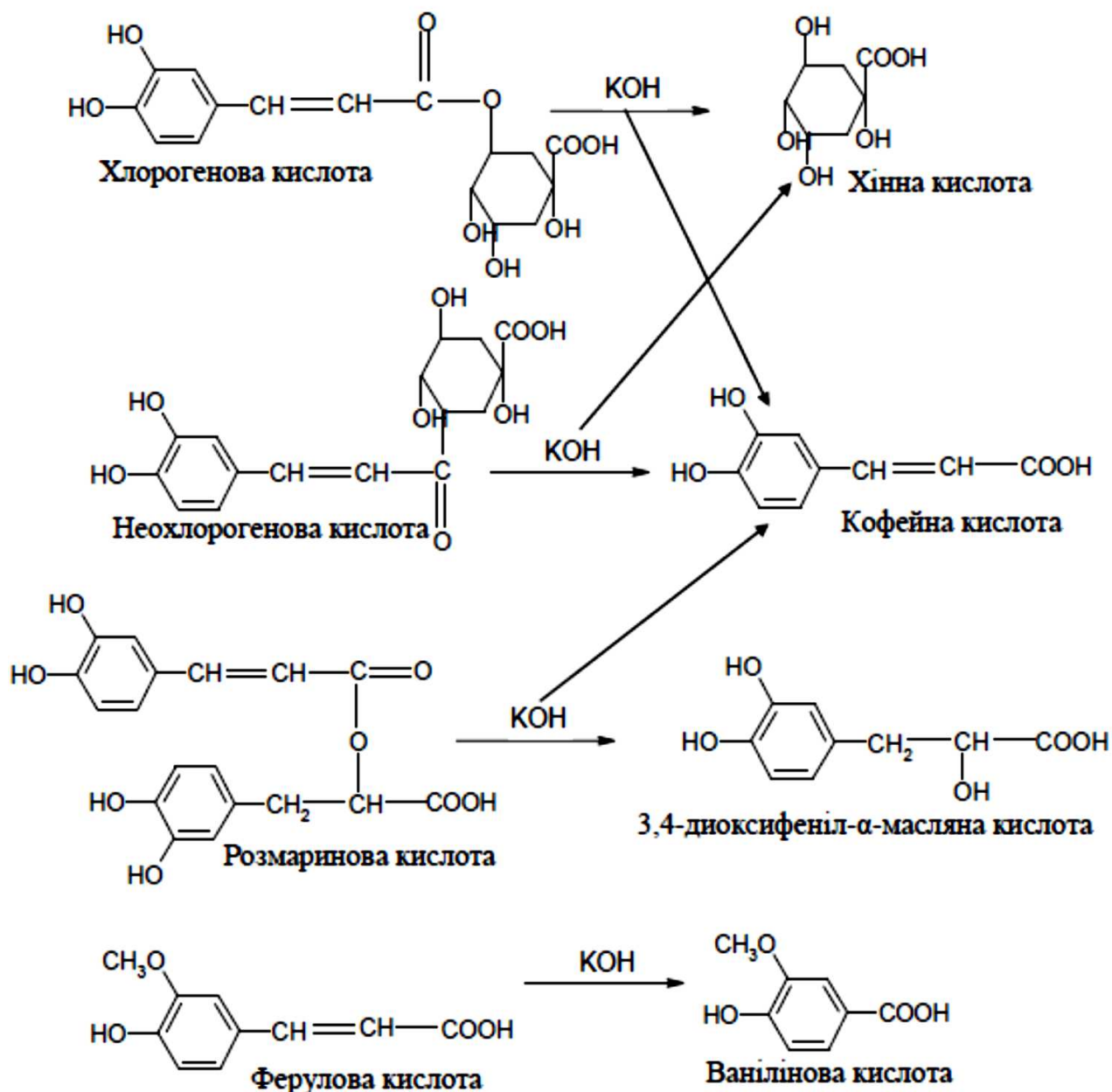


Рис. 3.5 Схема хімічних перетворень гідроксикоричних кислот трави підлісника європейського: хлорогенової, неохлорогенової, розмаринової та ферулової кислот

Основні фізико-хімічні властивості виділених сполук з трави та кореневищ з коренями п. європейського наведені в табл. 3.5.

Таблиця 3.5

Фізико-хімічні властивості фенольних сполу підлісника європейського

Шифр	Сполука	Загальна формула	Т.пл., °C	УФ-спектр, λ, нм	Значення Rf в системі розчинників	Джерело одержання
ГК ₁	Кофейна кислота (3,4–дигідроксикорична кислота)	C ₉ H ₈ O ₄	194-195	245, 299, 325	0,81 (А); 0,34 (Б); 0,62 (Г); 0,86 (В)	Трава, кореневища з коренями
ГК ₂	Хлорогенова кислота (5-О-кофеїл-D-хінна кислота)	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	203-205	240, 298, 325	0,62 (А); 0,65 (Б); 0,66 (В); 0,77 (Г); 0,84 (Д); 0,87 (Е)	-//-
ГК ₃	Розмаринова кислота (естер кофейної й 3,4-дигідроксифеніл молочної кислоти)	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	171-175	220, 290, 326	0,87 (А), 0,40 (Б)	-//-
ГК ₄	Ферулова кислота (3-метокси-4-оксикорична кислота)	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	167-169	230, 291, 323	0,43 (А); 0,47 (Б); 0,62 (В); 0,55 (Г); 0,90 (Д); 0,92 (Е)	-//-
ГК ₅	<i>n</i> – кумарова кислота (4 – гідроксикорична кислота)	C ₉ H ₈ O ₃	212-214	220, 310	0,48 (А), 0,89 (Б)	Трава
ГК ₆	Неохлорогенова кислота (3-О-кофеїл-D-хінна кислота)	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	аморф	235, 299, 325	0,38 (А); 0,60 (Б); 0,70 (В); 0,88 (Г); 0,88 (Д); 0,90 (Е)	Трава, кореневища з коренями
ФЛ ₁	Рутин (3-О-β-D-рутинозид-5,7,3',4'-тетрагідроксифлавонон)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	189-192	257, 265, 360	0,46 (А)	Трава

Примітка. Система розчинників: А – *n*-бутанол-оцтова кислота-вода (4:1:2); Б – 2,5 % оцтова кислота; В – 6 % оцтова кислота; Г – 15 % оцтова кислота; Д – 30 % оцтова кислота; Е – 60 % оцтова кислота

Таким чином, методами розподільного фракціонування в системі “рідина – рідина”, колонкової хроматографії на силікагелі, препаративної хроматографії на папері з трави п. європейського виділено в індивідуальному стані 7 сполук (кофейна, хлорогенова, неохлорогенова, розмаринова, ферулова, *n*-кумарова кислоти та рутин), а з кореневищ з коренями п. європейського – 5 сполук (кофейна, хлорогенова, неохлорогенова, розмаринова, ферулова кислоти).

3.4 Дослідження амінокислотного складу сировини підлісника європейського

Самостійно організм може синтезувати 12 амінокислот, а інші 8 (треонін, валін, метіонін, ізолейцин, лейцин, триптофан, фенілаланін, лізин) в організмі людини не синтезуються і тому отримали назву незамінні (есенціальні). Забезпечення організму людини цими амінокислотами відбувається за рахунок надходження їх із продуктами харчування, також у вигляді харчових добавок та лікарських препаратів. В організмі людини амінокислоти відіграють важливе значення, оскільки кожна з них виконує свої особливі функції [119 – 121, 125].

Вивчення якісного складу та кількісного вмісту амінокислот в сировині п. європейського раніше в Україні не проводились. За результатами ПХ в траві та кореневищах з коренями п. європейського нами встановлено наявність 11 амінокислот, але чіткого їх розділення досягнути не вдалося. Тому було проведено дослідження якісного складу та кількісного вмісту амінокислот сировини п. європейського на амінокислотному аналізаторі ААА Т-339 «Mikrotechna» (Прага, Чехія) [115, 125].

Результати проведених досліджень представлені в табл. 3.6.

Аналіз результатів (табл. 3.6) свідчить про наявність у сировині п. європейського 17 амінокислот, серед яких 7 незамінних (треонін, валін, метіонін, ізолейцин, лейцин, фенілаланін, лізин) та 10 замінних (гістидин, аспарагінова та глютамінова кислоти, серин, пролін, цистин, гліцин, аланін,

тирозин, аргінін). Загальна сума амінокислот у траві п. європейського становить 100,10 мг/100 г (з них 31,37 мг/100 г незамінних), а у кореневищах з коренями п. європейського – 99,06 мг/100 г (з них 14,49 мг/100 г незамінних).

Таблиця 3.6

**Якісний склад та кількісний вміст амінокислот в сировині
підлісника європейського**

Амінокислота	Вміст амінокислот, мг/100 г		
	Хімічна формула	Трава <i>Sanicula europaea</i> L.	Кореневища з коренями <i>Sanicula europaea</i> L.
1	2	3	4
Незамінні			
Треонін	C ₄ H ₉ O ₃ N	3,25	2,88
Валін	C ₅ H ₁₁ O ₂ N	6,43	6,92
Метіонін	C ₅ H ₁₁ O ₂ NS	1,42	0,23
Ізолейцин	C ₆ H ₁₃ O ₂ N	2,62	1,50
Лейцин	C ₆ H ₁₃ O ₂ N	5,01	1,31
Фенілаланін	C ₉ H ₁₁ O ₂ N	5,23	0,38
Лізин	C ₆ H ₁₄ O ₂ N	7,41	1,27
Сума		31,37	14,49
Замінні			
Гістидин	C ₆ H ₉ O ₂ N	1,31	0,77
Аспарагінова кислота	C ₄ H ₇ O ₄ N	12,42	10,77
Серин	C ₃ H ₇ O ₃ N	7,63	10,15
Глутамінова кислота	C ₅ H ₉ O ₄ N	5,67	5,19
Пролін	C ₅ H ₉ O ₂ N	5,23	11,54
Цистин	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₄ S ₂	4,36	0,38
Гліцин	C ₂ H ₅ O ₂ N	12,21	5,77
Аланін	C ₃ H ₇ O ₂ N	9,81	10,77

1	2	3	4
Тирозин	$C_9H_{11}O_3N$	0,97	3,85
Аргінін	$C_6H_{14}O_2N$	9,12	25,38
Сума		68,73	84,57

Амінокислоти характеризуються вираженими фармакологічними властивостями та відіграють важливу роль у функціонуванні людського організму. Так, антиоксидантними, мембраностабілізуючими властивостями характеризується аргінін, лейцин та глутамінова кислота; у процесах регенерації пошкоджених тканин беруть участь аланін, гліцин, гістидин, аргінін та лейцин; імуностимульовальні властивості виявляє аспарагінова кислота, треонін та серин; пролін та цистеїн сприяють формуванню колагену і покращують еластичність і текстуру шкіри; лізин необхідний для нормального формування кісток і росту дітей, сприяє засвоєнню кальцію; серин та валін впливає на обмін речовин в організмі.

Зважаючи на амінокислотний склад сировини п. європейського, перспективним є дослідження ранозагоювальної та антиоксидантної дій.

3.5 Дослідження жирнокислотного складу трави підлісника європейського

Жирні кислоти є обов'язковим компонентом біологічних мембран, вони відіграють важливу роль в енергетиці живої клітини, метаболізмі стероїдних сполук, беруть участь у біосинтезі жирів.

Визначення компонентного складу та вмісту жирних кислот проводили методом ГХ/МС на хроматографі Agilent Technologies 6890 з мас-спектрометричним детектором 5973 [126, 127].

Результати дослідження представлено на рис. 3.6 та у табл. 3.7.

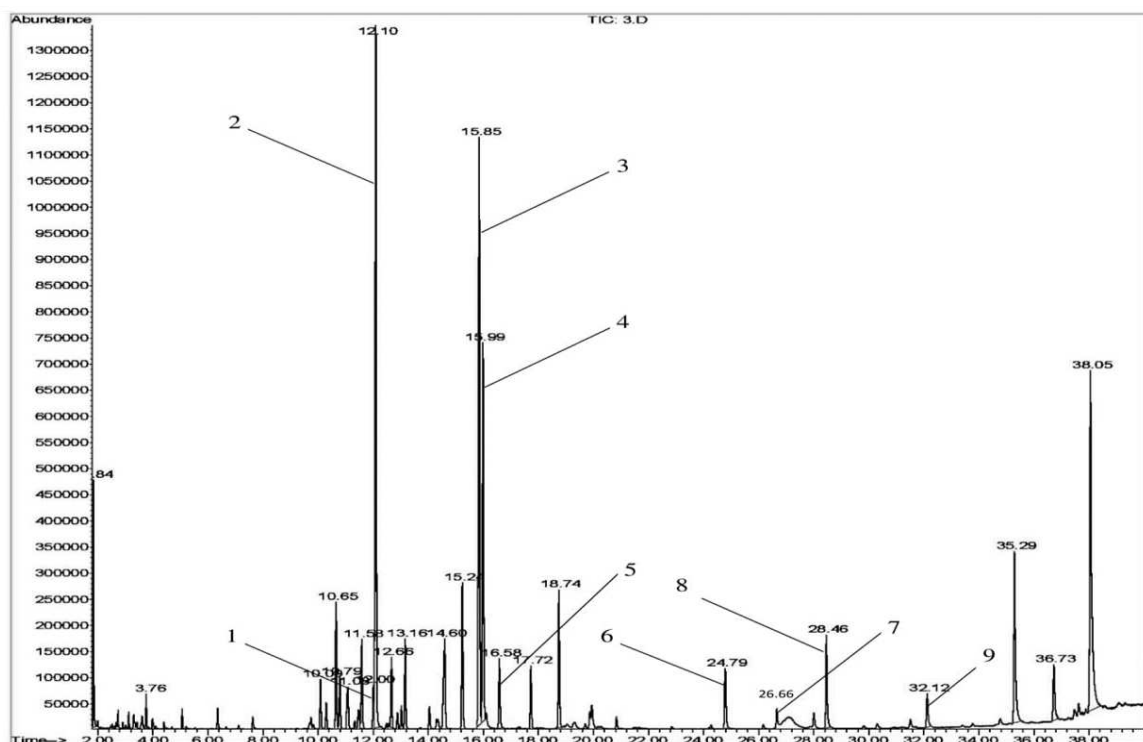


Рис. 3.6 Хроматограма метилових ефірів жирних кислот трави підлісника європейського: 1 – пальмітолеїнова кислота, 2 – пальмітинова кислота, 3 – лінолева кислота, 4 – ліноленова кислота, 5 – стеаринова кислота, 6 – бегенова кислота, 7 – трикозанова кислота, 8 – лігноцеринова кислота, 9 – церотинова кислота

Таблиця 3.7

**Якісний склад та кількісний вміст жирних кислот
трави підлісника європейського**

№ з/п	Час утримання, хв	Назва кислоти	Кількісний вміст	
			мг/кг*	%**
1	2	3	4	5
1.	12,10	Пальмітинова C _{16:0}	3400,77	35,36
2.	16,58	Стеаринова C _{18:0}	338,36	3,52
3.	24,79	Бегенова C _{22:0}	325,60	3,39
4.	26,66	Трикозанова C _{23:0}	сліди	сліди
5.	28,46	Лігноцеринова C _{24:0}	493,93	5,13
6.	32,12	Церотинова C _{26:0}	206,27	2,14

1	2	3	4	5
7.	12,01	Пальмітолеїнова C _{16:1}	175,65	1,83
8.	15,85	Ліолева C _{18:2}	2892,98	30,08
9.	15,99	Ліноленова C _{18:3}	1784,69	18,55
Всього			9618,25	100

Примітка: * – мг/кг в сировині;

** – % відсоток від суми виявлених компонентів.

У траві п. європейського ідентифіковано 9 жирних кислот: пальмітолеїнова, пальмітинова, ліолева, ліноленова, стеаринова, бегенова, трикозанова, лігноцеринова, церотинова кислоти. Вміст ненасичених і насичених кислот знаходиться майже у рівному співвідношенні – 50,46 % і 49,54 % від загального вмісту відповідно. Серед ненасичених жирних кислот переважає ліолева кислота (30,08 %) та ліноленова (18,55 %) кислоти, а насичених – пальмітинова кислота (35,36 %).

3.6 Ідентифікація та визначення кількісного вмісту фенольних сполук методом ВЕРХ

Фенольні сполуки є одним з найбільш розповсюджених і численних класів природних сполук, які виявляють різноманітну біологічну дію. Лікарські препарати на основі фенольних сполук відомі своїми капіляророзміцнюючими, антиоксидантними, протизапальними, гіпоглікемічними властивостями. Така направленість дії вкрай важлива для ЛРС, яка проявляє кровоспинну дію [122].

Розділення суми фенольних сполук трави та кореневищ з коренями п. європейського, їх ідентифікацію та кількісне визначення проводили методом обернено-фазної вискоєфективної рідинної хроматографії з УФ-детектуванням. Дослідження здійснювали за методикою наведеною у розділі 2.3.5.

Розділення та визначення кількісного вмісту флавоноїдів та кумаринів в траві та кореневищах з коренями п. європейського проводили при довжині хвилі 255 та 340 нм. Хроматограми представлені на рис. 3.7 та 3.8.

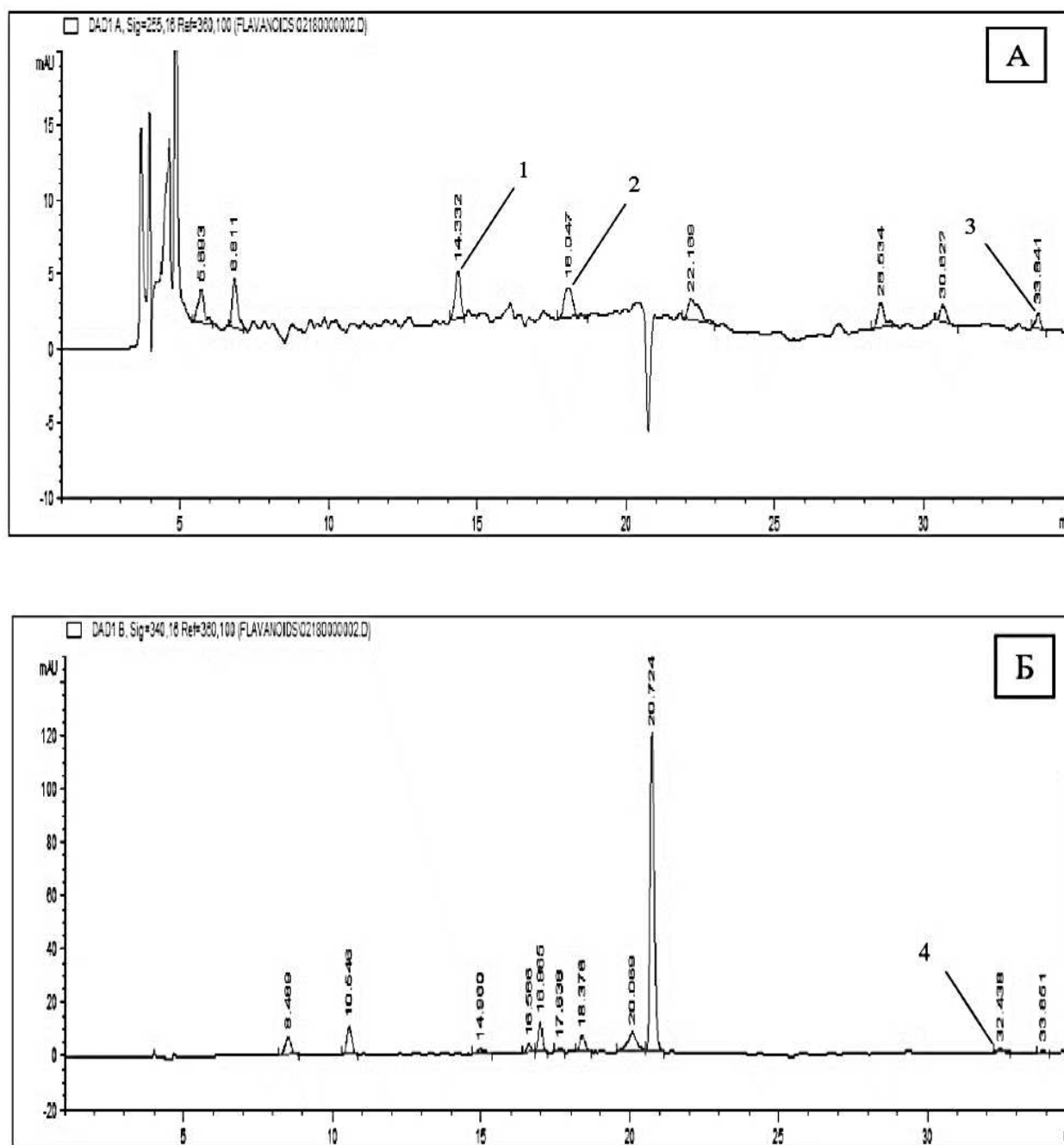


Рис. 3.7 Хроматограми флавоноїдів та кумаринів трави підлісника європейського: А – довжина хвилі 255 нм, Б – довжина хвилі 340 нм; 1 – кумарин, 2 – кверцетин, 3 – кемпферол, 4 – апігенін

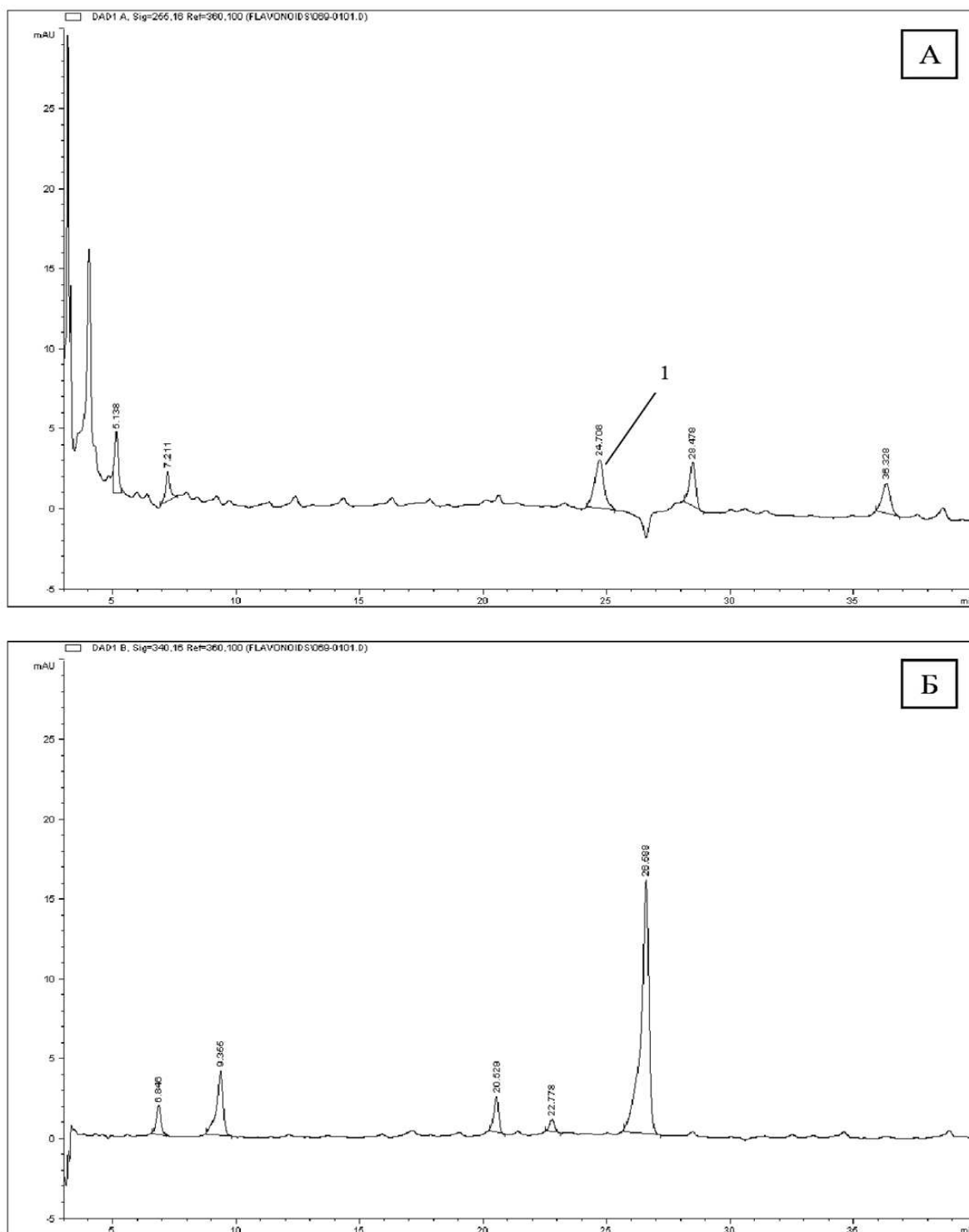


Рис. 3.8 Хроматограми флавоноїдів та кумаринів кореневищ з коренями підлісника європейського: А – довжина хвилі 255 нм, Б – довжина хвилі 340 нм; 1 – кумарин

За результатами аналізу в траві п. європейського встановлено наявність кверцетину (0,012 %), кемпферолу (0,002 %), апігеніну (0,011 %) та кумарину (0,009 %); в кореневищах з коренями – кумарину (0,009 %) та апігеніну (0,014 %).

Розділення та визначення кількісного вмісту гідроксикоричних кислот в траві та кореневищах з коренями п. європейського проводили при довжині хвилі 320 та 330 нм. Хроматограми представлені на рис. 3.9 та 3.10.

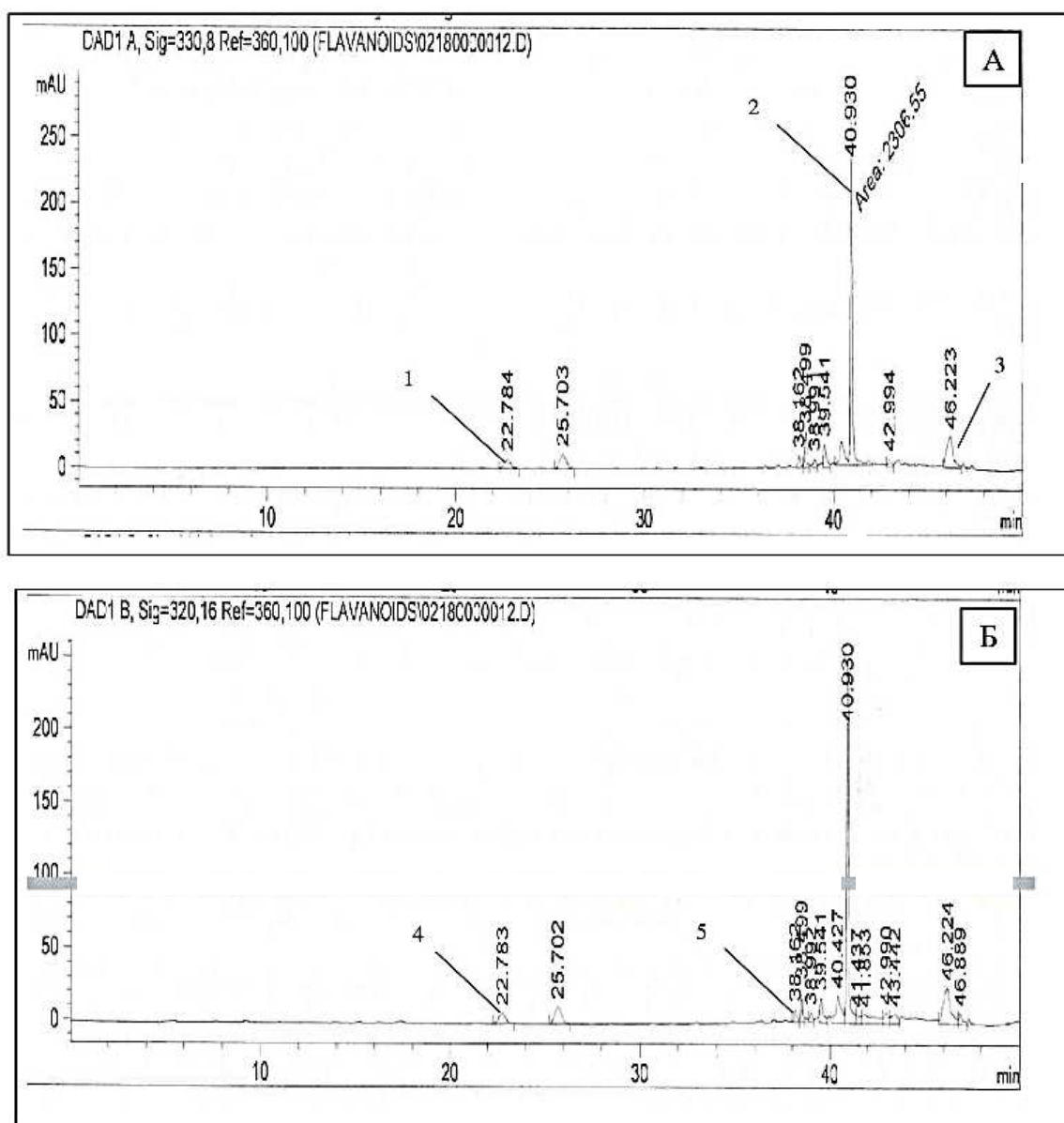


Рис. 3.9 Хроматограми гідроксикоричних кислот трави підлісника європейського: А – довжина хвилі 330 нм, Б – довжина хвилі 320 нм; 1 – хлорогенова кислота, 2 – розмаринова кислота, 3 – апігенін, 4 – кофейна кислота, 5 – ферулова кислота

За результатами аналізу в траві та кореневищах з коренями п. європейського встановлено наявність розмаринової кислоти 0,493 % та 0,333 %, хлорогенової кислоти 0,032 % та 0,038 %, кофейної кислоти 0,025 % та 0,019 % та ферулової кислоти 0,009 % та 0,010 % відповідно.

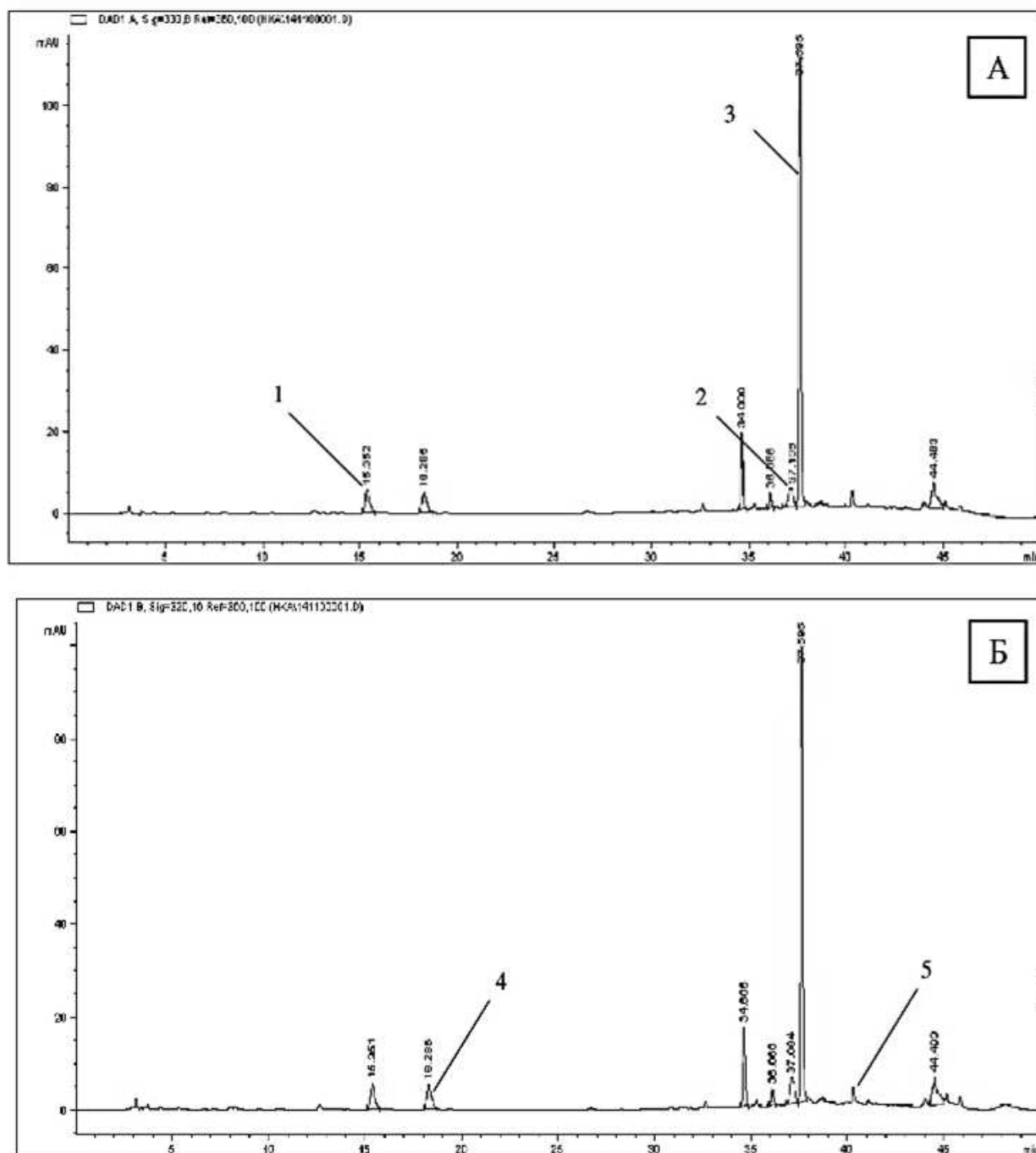


Рис. 3.10 Хроматограми гідроксикоричних кислот кореневищ з коренями підлісника європейського: А – довжина хвилі 330 нм, Б – довжина хвилі 320 нм; 1 – хлорогенова кислота, 2 – апігенін, 3 – розмаринова кислота, 4 – кофейна кислота, 5 – ферулова кислота

Розділення та визначення кількісного вмісту танінів в траві та кореневищах з коренями п. європейського проводили при довжині хвилі 255 та 280 нм. Хроматограми представлені на рис. 3.11 та 3.12.

За результатами хроматографічного аналізу в траві п. європейського

встановлено наявність галокатехіну (0,313 %), катехіну (0,084 %), епікатехіну (0,048 %), катехіну галату (0,097 %), епікатехіну галату (1,106 %), елагової кислоти (0,003 %). У кореневищах з коренями ідентифіковано галову (0,006 %) та елагову (0,009 %) кислоти, галокатехін (0,312 %), епігалокатехін (0,195 %), катехін (0,029 %), епікатехін (0,191 %), епікатехіну галат (0,182 %).

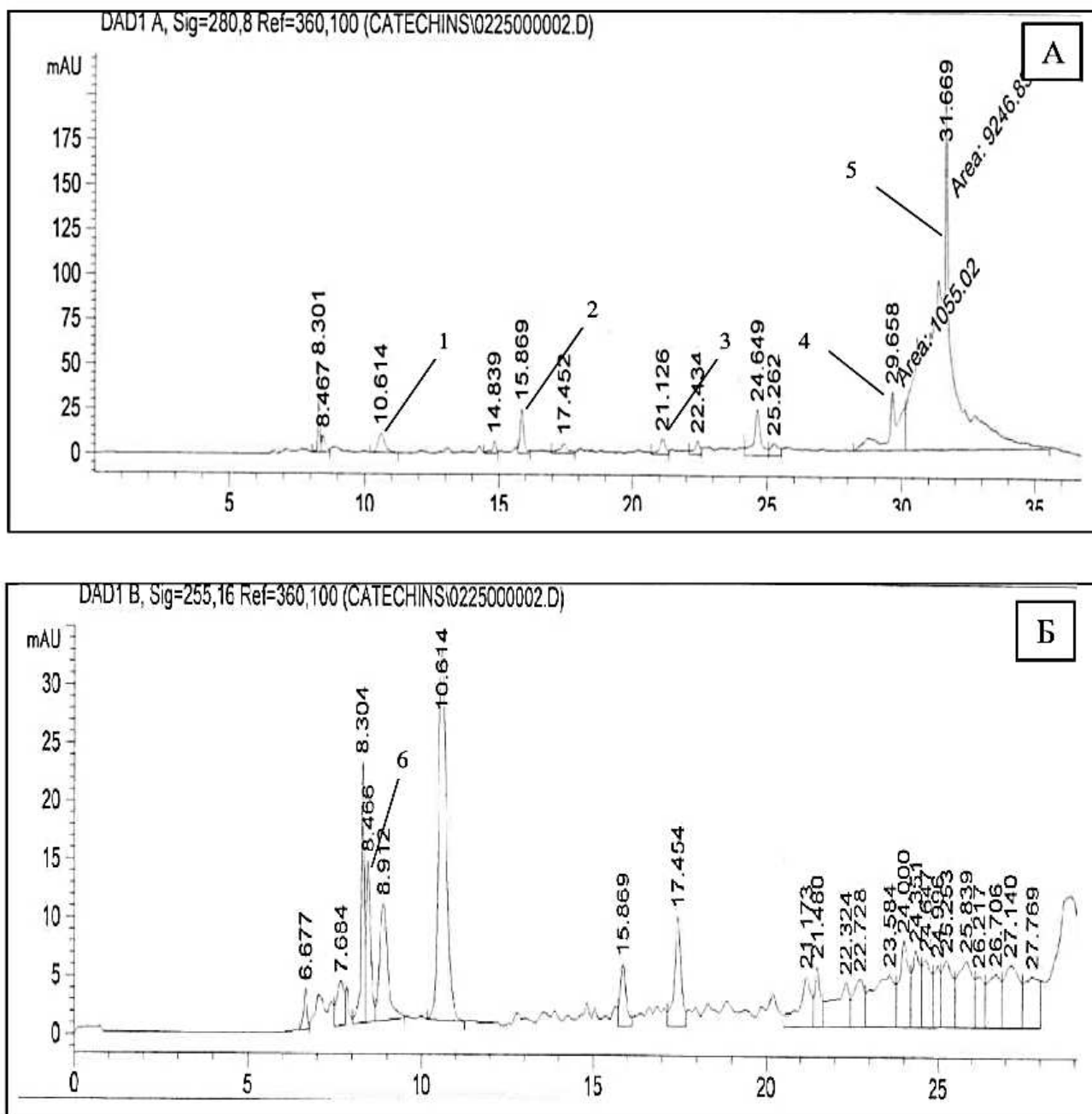
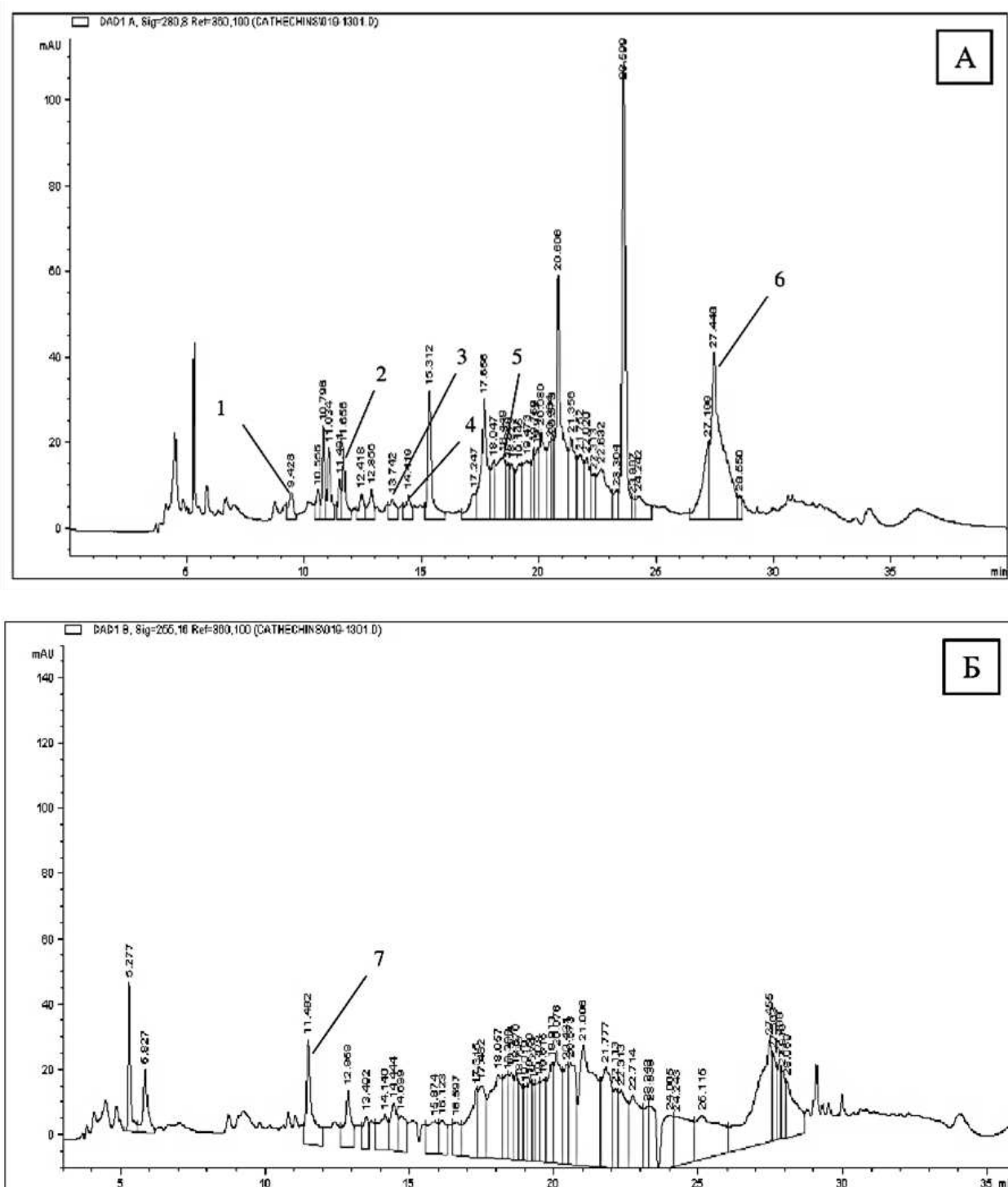


Рис. 3.11 Хроматограми танінів трави підлісника європейського:
А – довжина хвилі 280 нм, Б – довжина хвилі 255 нм; 1 – галокатехін, 2 – катехін,
3 – епікатехін, 4 – катехіну галат, 5 – епікатехіну галат, 6 – елагова кислота



**Кількісний вміст фенольних сполук в сировині
підлісника європейського**

№ з/п	Фенольна сполука	Вміст БАР, мг/кг	
		Трава	Кореневища з коренями
Таніни			
1.	Галокатехін	3129,25	3121,25
2.	Катехін	840,75	292,75
3.	Епікатехін	479,88	1912,63
4.	Катехіну галат	969,13	-
5.	Епікатехіну галат	11058,63	1815,88
6.	Елагова кислота	25,88	93,65
7.	Галова кислота	-	61,63
8.	Епігалокатехін	-	1946,88
Флавоноїди			
9.	Кверцетин	119,00	-
10.	Кемпферол	18,63	-
11.	Апігенін	108,50	135,75
Кумарини			
12.	Кумарин	97,38	97,06
Гідроксикоричні кислоти			
13.	Хлорогенова кислота	324,38	383,25
14.	Розмаринова кислота	4933,50	3330,25
15.	Кофейна кислота	257,50	191,75
16.	Ферулова кислота	89,63	103,00

Результати хроматографічного аналізу вказують, що вміст фенольних сполук у траві п. європейського більший, ніж у кореневищах з коренями. Серед танінів найбільший вміст у траві п. європейського припадає на епікатехіну

галат – 1,106 % (11058,63 мг/кг), а найменший – на елагову кислоту – 0,003 % (25,88 мг/кг); кореневища з коренями найбільше містять у своєму складі галокатехін – 0,312 % (3121,25 мг/кг), а найменше – галову кислоту – 0,006 % (61,63 мг/кг). Найвищий вміст серед флавоноїдів у траві п. європейського складає кверцетин – 0,012 % (119,00 мг/кг), а найменший – кемпферол – 0,002 % (18,63 мг/кг); в кореневищах з коренями серед флавоноїдів виявлений тільки апігенін – 0,014 % (135,75 мг/кг). Найбільший вміст гідроксикоричних кислот у траві та кореневищах з коренями п. європейського припадає на розмаринову кислоту – 0,493 % (4933,50 мг/кг) і 0,333 % (3330,25 мг/кг), а найменший – на ферулову кислоту – 0,009 % (89,63 мг/кг) і 0,010 % (103,00 мг/кг) відповідно. Кумарини в сировині п. європейського представлені кумарином, вміст якого у двох видах сировини складає 0,009 % (97,38 мг/кг та 97,06 мг/кг відповідно).

За результатами фітохімічного дослідження як перспективну сировину для подальшого дослідження обрали траву п. європейського, де вміст БАР вищий, ніж у кореневищах з коренями.

3.7 Дослідження компонентного складу летких сполук в траві підлісника європейського

Ефірні олії – це складна суміш різних хімічних сполук, які зумовлюють її фармакологічний ефект. Компоненти ефірних олій проявляють антиоксидантні, протизапальні, антибактеріальні, протигрибкові, антимутагенні властивості тощо, тому дослідження складу летких фракцій лікарських рослин є доцільним [128].

Визначення якісного складу та кількісного вмісту летких сполук в траві п. європейського проводили методом ГХ/МС на хроматографі Agilent Technologies 6890 з мас-спектрометричним детектором 5973. Ідентифікацію досліджуваних компонентів проводили за мас-спектрами та часом утримування компонентів. За результатами проведених досліджень в траві п. європейського виявлено 39 летких сполук, з яких ідентифіковано 14 (рис. 3.13).

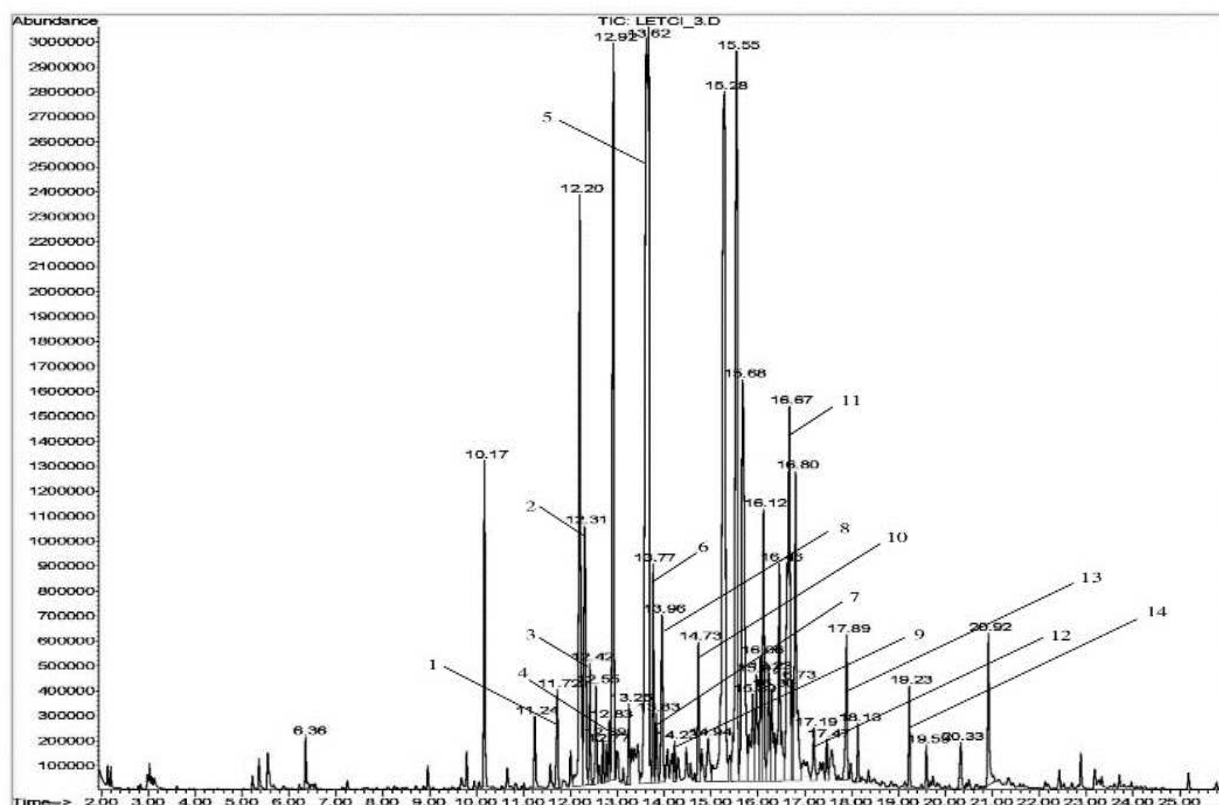


Рис. 3.13 Хроматограма летких сполук трави підлісника європейського: 1 – β -патчулен, 2 – β -кедрен, 3 – транс- α -бергамотен, 5 – β -хелміскапен, 6 – α -кадінен, 7 – α -муурулен, 8 – бісаболен, 9 – (-)-каламенен, 10 – каріофілен оксид, 11 – 1-метил-6-метиленбіцикло[3.2.0] гептан, 12 – гептакозан, 13 – 4,11-селінадієн, 14 – гексагідрофарнезиллацетон

Вміст ідентифікованих летких сполук трави п. європейського наведено в табл. 3.9.

Таблиця 3.9

**Склад та вміст ідентифікованих летких сполук
трави підлісника європейського**

№ з/п	Сполука	Час утримання, хв	Вміст, мг/кг
1	2	3	4
1.	β -Патчулен	11,72	19,80
2.	β -Кедрен	12,31	65,72
3.	Каріофілен	12,41	20,00

1	2	3	4
4.	транс- α -Бергамотен	12,7	5,86
5.	β -Хелміскапен	13,62	356,61
6.	α -Кадінен	13,77	33,02
7.	α -Муурулен	13,83	12,97
8.	Бісаболен	13,96	36,34
9.	(-)-Каламенен	14,23	6,05
10.	Каріофілен оксид	14,73	2,46
11.	1-метил-6-метиленбіцикло[3.2.0] гептан	16,67	126,68
12.	Гептакозан	17,19	12,48
13.	4,11-Селінадієн	17,89	31,30
14.	Гексагідрофарнезилацетон	19,23	17,56
Загальний вміст, мг/кг			746,86

Серед ідентифікованих летких сполук найбільшу частку складають сесквітерпеноїди. Переважають за вмістом біциклічні сполуки (479,97 мг/кг). Домінантними терпеноїдами є: біциклічний сесквітерпеноїд – β -хелміскапен (356,61 мг/кг); трициклічний – β -кедрен (65,72 мг/кг); моноциклічний – бісаболен (36,34 мг/кг).

Таким чином, у траві п. європейського виявлено 39 компонентів летких сполук, з яких 14 ідентифіковано з вірогідністю збігу з даними бібліотеки мас-спектрів 90 % і вище (табл. 3.11): β -патчулен, β -кедрен, транс- α -бергамотен, β -хелміскапен, α -кадінен, α -муурулен, бісаболен, (-)-каламенен, каріофілен оксид, 1-метил-6-метиленбіцикло[3.2.0] гептан, гептакозан, 4,11-селінадієн, гексагідрофарнезилацетон. Домінантними компонентами ефірних олій у траві п. європейського є β -хелміскапен – 356,61 мг/кг, 1-метил-6-метиленбіцикло[3.2.0] гептан – 126,68 мг/кг та β -кедрен – 65,72 мг/кг.

3.8 Ідентифікація та кількісне визначення стероїдних сполук методом газової хроматографії/мас-спектрометрії

Фітостероли належать до групи стероїдних спиртів, які є природними компонентами клітинних мембран рослин. За хімічною структурою вони близькі до холестерину і необхідні для побудови мембран клітин людини, заміщуючи при цьому холестерин, що надходить з їжею і синтезується печінкою. В результаті зменшується об'єм всмоктування холестерину [129].

Визначення стероїдних сполук проводили методом ГХ/МС на хроматографі Agilent Technologies 6890 з мас-спектрометричним детектором 5973 згідно з методикою, наведеною у розділі 2.3.6.

Хроматографічний аналіз стероїдних сполук трави п. європейського представлений на рис. 3.14 та у табл. 3.10.

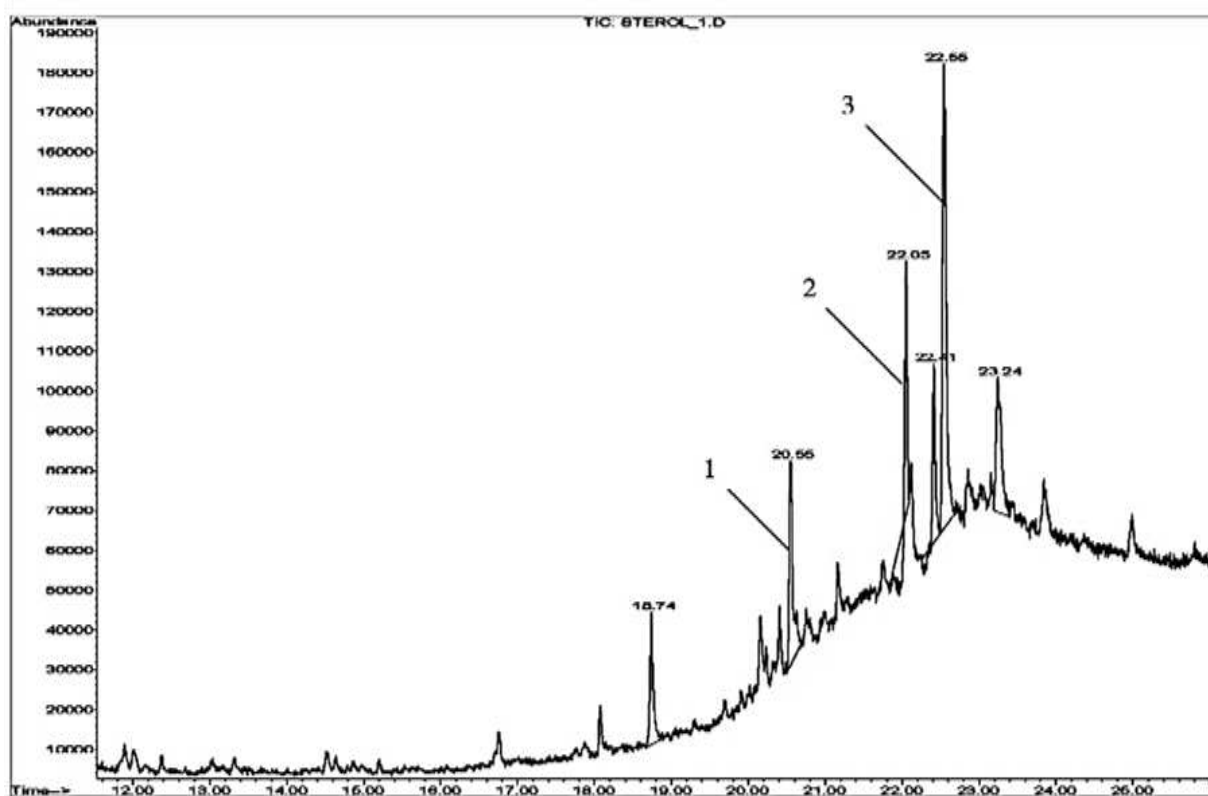


Рис. 3.14 Хроматограма стероїдних сполук трави підлісника європейського: 1 – стигмастан-3,5-дієн, 2 – стигмастерол, 3 – β -ситостерол

Кількісний вміст стероїдних сполук в траві підлісника європейського

№ з/п	Стероїдна сполука	Час утримання, хв	Вміст, БАР	
			мг/кг	%
1.	Стигмастан- 3,5-дієн	20,55	112,72	0,011
2.	Стигмастерол	22,05	39,16	0,004
3.	β -Ситостерол	22,56	282,82	0,028

За результатами хроматографічного аналізу в траві п. європейського було ідентифіковано 3 сполуки стероїдної природи: β -ситостерол (282,82 мг/кг), стигмастан-3,5-дієн (112,72 мг/кг) і стигмастерол (39,16 мг/кг).

3.9 Дослідження мінерального складу

Рослинні організми, як живі системи, характеризуються відповідним ступенем нагромадження макро- та мікроелементів і відіграють роль базисних модуляторів для синтезу органічних молекулярних структур та біологічно активних речовин. Мікроелементи відіграють важливу роль у підтримці гомеостазу організму людини, впливають на процеси кровотворення, тканинного дихання, імунні реакції, ріст, розмноження, поділ клітин, функцію залоз внутрішньої секреції. Недостатність чи надлишок окремих елементів зумовлює формування патологічного процесу в організмі. Важливим джерелом мінеральних речовин є лікарські рослини, в яких макро- та мікроелементи нагромаджуються у вигляді комплексів у найсприятливішому співвідношенні основних компонентів, у найбільш доступній і засвоюваній формі для організму людини [76 – 77, 130].

Відомостей про елементний склад трави та кореневищ з коренями *S. europaеа* L. за даними доступних джерел наукової літератури не виявлено. Враховуючи важливість мінералів для нормального функціонування організму людей і тварин, встановлення якісного складу та кількісного вмісту макро- та мікроелементів в сировині *S. europaеа* L. є актуальним.

За результатами атомно-абсорбційного аналізу в досліджуваних об'єктах було встановлено наявність 6 мікроелементів (Fe, Zn, Mn, Cu, Pb, Cd) та 3 макроелементів (K, Ca, Mg), визначено їх кількісний вміст. Результати досліджень вмісту макро- та мікроелементів у сировині п. європейського наведено на табл. 3.11.

Таблиця 3.11

**Елементний склад трави та кореневищ з коренями
підлісника європейського**

Елемент	Формула	Вміст елементів, мг/100 г	
		Трава підлісника європейського	Кореневища з коренями підлісника європейського
Макроелементи			
Кальцій	Ca	1280	2260
Магній	Mg	120	89
Калій	K	2740	1420
Мікроелементи			
Купрум	Cu	0,79	2,04
Манган	Mn	2,88	5,81
Цинк	Zn	2,41	0,49
Ферум	Fe	7,98	1,45
Плюмбум	Pb	<0,03	<0,03
Ультрамікроелементи			
Кадмій	Cd	<0,01	<0,01

Серед макроелементів в траві п. європейського в найбільшій кількості накопичується K (2740 мг/100 г), а серед мікроелементів – Fe (7,98 мг/100 г); у кореневищах з коренями встановлено найвищий вміст макроелементу Ca (2260 мг/100 г) та мікроелементу Mn (5,81 мг/100 г).

Вміст Cd та Pb знаходяться в межах допустимих концентрацій згідно з вимогами Державної фармакопеї України (ДФУ 2.0 – 2.4.27) для препаратів рослинного походження [55, 115, 130].

3.10 Визначення кількісного вмісту біологічно активних речовин в сировині підлісника європейського

Кількісне визначення вмісту основних груп БАР проводили у надземних та підземних органах п. європейського.

Вільні органічні кислоти та кислота аскорбінова. Органічні кислоти мають широкий спектр біологічної дії на організм людини, сприяють зменшенню процесів нітрузування в організмі та зниженню хімічного канцерогенезу. Деякі кислоти мають антиоксидантні, протиалергічні, антимікробні та протизапальні властивості, а також беруть участь в обміні речовин, підвищують захисні сили й життєвий тонус організму. Вони є проміжними продуктами оксидації вуглеводів, жирів, амінокислот і білків, а також використовуються в синтезі амінокислот, алкалоїдів, стероїдів [117, 118].

Визначення кількісного вмісту суми органічних кислот та аскорбінової кислоти проводили за фармакопейними методиками [88, 89]. Результати визначення кількісного вмісту суми органічних кислот та аскорбінової кислоти в сировині п. європейського наведено в табл. 3.12.

Результати, наведені в табл. 3.12, свідчать, що вміст органічних кислот в досліджуваній сировині знаходиться в межах від 1,15 % до 1,88 %, аскорбінової кислоти – від 0,018 % до 0,067 %. Найбільший вміст органічних кислот та аскорбінової кислоти накопичується в листках п. європейського і становить 1,88 % та 0,067 % відповідно [118].

Вітамін K_1 . Кількісне визначення вмісту вітаміну K_1 у досліджуваній сировині проводили методом спектрофотометрії (розділ 2.3.9) в перерахунку на вікасол. Результати визначення вмісту вітаміну K_1 в сировині п. європейського наведено в табл. 3.12.

За результатами дослідження було встановлено, що вміст вітаміну K_1 знаходиться в межах від 0,37 % до 1,03 % залежно від виду сировини. Найбільший вміст вітаміну K_1 накопичується в листках п. європейського і становить 1,03 %.

Вміст суми органічних кислот, аскорбінової кислоти та вітаміну K_1 у сировині підлісника європейського

Досліджувана сировина	Вміст органічних кислот, %, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, n = 9	Вміст аскорбінової кислоти, %, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, n = 9	Вміст вітаміну K_1 , %, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, n = 9
Стебло	1,15±0,02	0,018±0,001	0,75±0,03
Листки	1,88±0,03	0,067±0,002	1,03±0,04
Трава	1,45±0,11	0,059±0,003	0,96±0,04
Кореневища з коренями	1,63±0,10	-	0,37±0,02

Метрологічна характеристика методів кількісного визначення вмісту органічних кислот, в тому числі аскорбінової кислоти, вітаміну K_1 у траві п. європейського наведені в табл. 3.13.

Таблиця 3.13

Метрологічна характеристика методу кількісного визначення вмісту органічних кислот, в тому числі аскорбінової кислоти та вітаміну K_1 у траві підлісника європейського

f	$X_{\text{сер}}$	S^2	S	P	t	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$	ϵ , %
<i>Органічні кислоти</i>							
9	1,4512	0,0014544444	0,0402	0,95	2,78	1,4512±0,110	4,7192
<i>Аскорбінова кислота</i>							
9	0,0594	0,000007278	0,0009	0,95	2,78	0,0594±0,002	4,2054
<i>Вітамін K_1</i>							
9	0,9554	0,001449909	0,0127	0,95	2,78	0,9554±0,035	3,6932

Тритерпенові сапоніни. Широкий спектр біологічної дії сапонінів базується на їх здатності модифікувати структурно-функціональні властивості

клітинних мембран. Сапоніни проявляють гемолітичну, цитотоксичну, антивірусну, антифунгальну, протигрибкову активність [131].

Визначення кількісного вмісту тритерпенових сапонінів проводили фотоколориметричним методом, після взаємодії з концентрованою сульфатною кислотою. Результати визначення кількісного вмісту тритерпенових сапонінів в сировині п. європейського наведено в табл. 3.14.

Гідроксикоричні кислоти. Кількісне визначення вмісту гідроксикоричних кислот надземних та підземних органів п. європейського проводили спектрофотометричним методом в перерахунку на розмаринову кислоту [132]. Результати кількісного визначення вмісту гідроксикоричних кислот у досліджуваній сировині наведено у табл. 3.14.

Флавоноїди. Визначення суми флавоноїдів у сировині п. європейського проводили методом диференціальної УФ-спектрофотометрії за реакцією утворення забарвленої сполуки з 3 % розчином алюмінію хлориду у 70 % етанолі [96, 97]. Результати кількісного вмісту суми флавоноїдів в перерахунку на рутин у досліджуваній сировині наведено у табл. 3.14.

Таблиця 3.14

**Кількісний вміст біологічно активних речовин в сировині
підлісника європейського**

Досліджувана сировина	Вміст тритерпенових сапонінів, %, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, n = 9	Вміст гідроксикоричних кислот, %, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, n = 9	Вміст суми флавоноїдів, %, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, n = 9
Стебло	0,38±0,01	0,55±0,04	0,91±0,01
Листки	1,05±0,02	1,68±0,01	2,72±0,02
Трава	0,86±0,03	1,26±0,01	2,37±0,01
Кореневища з коренями	0,33±0,01	1,18±0,01	0,087±0,01

Результати, наведені в табл. 3.14, свідчать, що вміст тритерпенових сапонінів в досліджуваній сировині знаходиться в межах від 0,33 % до 1,05 %; гідроксикоричних кислот – від 0,55 % до 1,68 %; флавоноїдів – від 0,087 % до

2,72 %. Найбільший вміст тритерпенових сапонінів, гідроксикоричних кислот та флавоноїдів накопичується в листках п. європейського і становить 1,05 %, 1,68 % та 2,72 % відповідно.

Метрологічну характеристику методів визначення вмісту тритерпенових сапонінів, гідроксикоричних кислот та флавоноїдів наведено у табл. 3.15.

Таблиця 3.15

Метрологічна характеристика результатів дослідження кількісного вмісту тритерпенових сапонінів, гідроксикоричних кислот та флавоноїдів у траві підлісника європейського

f	$X_{\text{ср}}, \%$	S^2	S	P	t	$\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$	$\varepsilon, \%$
<i>Тритерпенові сапоніни</i>							
9	0,8600	0,000400000	0,0115	0,95	2,78	0,86±0,03	3,7326
<i>Гідроксикоричні кислоти</i>							
9	1,2569	0,000123306	0,0037	0,95	2,78	1,2569±0,0103	0,8187
<i>Флавоноїди</i>							
9	2,3711	0,000161111	0,042	0,95	2,78	2,3711±0,0118	0,4961

Окиснювані феноли. Визначення вмісту окиснюваних фенолів в траві, листках, стеблах та кореневищах з коренями п. європейського проводили методом Левенталю-Нейбауєра в модифікації А. Л. Курсанова [93, 94].

Результати визначення кількісного вмісту окиснюваних фенолів в досліджуваній сировині представлено в табл. 3.16.

Сума поліфенолів. Визначення суми поліфенолів проводили спектрофотометричним методом за реакцією із фосфорномолібденово-вольфрамовим реактивом в перерахунку на пірогалол [55]. Результати дослідження представлені в табл. 3.16.

Таніни. Кількісне визначення танінів у стеблах, листках, траві та кореневищах з коренями п. європейського проводили спектрофотометрично в перерахунку на пірогалол (ДФУ 2.0 – 2.8.14) [55].

Результати визначення кількісного вмісту суми поліфенолів, танінів та окиснюваних фенолів в сировині п. європейського наведені в табл. 3.16.

**Кількісний вміст біологічно активних речовин в сировині
підлісника європейського**

Досліджувана сировина	Вміст окиснюваних фенолів, %, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, n = 9	Вміст суми поліфенолів, %, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, n = 9	Вміст суми танінів, %, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, n = 9
Стебло	1,62±0,11	2,17±0,03	1,21±0,01
Листки	4,68±0,15	10,95±0,04	7,91±0,04
Трава	4,11±0,13	10,43±0,03	7,28±0,03
Кореневища з коренями	3,36±0,11	7,45±0,04	6,21±0,02

За результатами дослідження (табл. 3.16) було встановлено, що найвищий вміст БАР накопичується у листках та траві п. європейського і становить: окиснюваних поліфенолів – 4,68 % та 4,11 %; поліфенолів – 10,95 % та 10,43 %; танінів 7,91 % та 7,28 відповідно [133].

Метрологічну характеристику методу визначення вмісту окиснюваних фенолів, суми поліфенолів та танінів наведено у табл. 3.17.

Таблиця 3.17

**Метрологічна характеристика результатів дослідження кількісного вмісту
БАР у траві підлісника європейського**

f	$X_{\text{сер}}, \%$	S^2	S	P	t	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$	$\varepsilon, \%$
<i>Окиснювані феноли</i>							
9	4,1133	0,018325000	0,0451	0,95	2,78	4,1133±0,1254	3,0497
<i>Сума поліфенолів</i>							
9	10,4267	0,001175000	0,0114	0,95	2,78	10,4267±0,0318	0,3046
<i>Таніни</i>							
9	7,2844	0,000927778	0,0102	0,95	2,78	7,2844±0,0282	0,3875

Отримані результати свідчать, що максимальна кількість БАР накопичується в листках п. європейського, а дещо нижчий вміст – у траві. На підставі проведених фітохімічних, морфологічних досліджень та з урахуванням фітомаси листків для подальших досліджень обрано траву п. європейського.

Полісахариди. Визначення кількісного вмісту виділених комплексів полісахаридів здійснювали гравіметричним методом [100 – 102]. Кількісний вміст ВРПС, ПР, ГцА і ГцБ відносно до використаної сировини наведено в табл. 3.18.

Таблиця 3.18

**Кількісний вміст полісахаридних комплексів у сировині
підлісника європейського**

Об'єкт дослідження		Вміст фракцій полісахаридів, %, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, n = 3			
		ВРПС	ПР	ГцА	ГцБ
Підлісник європейський	Надземна частина	2,02±0,10	1,50±0,06	1,26±0,06	3,32±0,15
Підлісник європейський	Підземна частина	1,18±0,06	1,09±0,05	2,87±0,14	2,48±0,12

Встановлено, що максимальна кількість ВРПС, ПР та ГцБ спостерігали у траві п. європейського, а ГцА – в кореневищах з коренями п. європейського.

Одержані результати дослідження кількісного вмісту полісахаридних фракцій мають практичне значення для подальшого вивчення ранозагоювальної та протизапальної дії.

3.11 Дослідження вмісту груп біологічно активних речовин в залежності від місця зростання підлісника європейського

Для встановлення впливу місця зростання на накопичення біологічно активних речовин проведено дослідження кількісного вмісту основних груп БАР в дикорослій сировині п. європейського, яку заготовляли в різних районах Івано-Франківської та Чернівецької областях у 2015 р., а також в культивованій сировині на навчально-дослідних ділянках лікарських рослин ІФНМУ.

Кількісне визначення вмісту основних груп БАР проводили за методиками описаними у розділі 2. Результати кількісного визначення вмісту суми

поліфенолів, танінів, флавоноїдів, гідроксикоричних кислот, органічних кислот, в тому числі аскорбінову кислоту, в траві та кореневищах з коренями п. європейського з різних місць зростання наведено в табл. 3.19.

За результатами проведеного дослідження встановлено, що вміст всіх груп БАР в траві п. європейського не суттєво залежить від місця зростання рослини. Також встановлено що за вмістом БАР культивована сировина практично не відрізняється від сировини, заготовленої в природних умовах зростання.

Таблиця 3.19

Кількісний вміст основних груп БАР у сировині підлісника європейського з різних місць зростання

Місце заготівлі	Вміст груп БАР, % , $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, n = 9										
	Трава						Кореневища з коренями				
	Аскорбінова кислота	Гідроксикоричні кислоти	Органічні кислоти	Сума поліфенолів	Таніни	Флавоноїди	Гідроксикоричні кислоти	Органічні кислоти	Сума поліфенолів	Таніни	Флавоноїди
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Івано-Франківська область, Тисменицький район, околиці с. Вовчинці	0,057 ±0,003	1,27 ±0,06	1,41 ±0,02	10,14 ±0,03	7,16 ±0,02	2,37 ±0,03	1,17 ±0,06	1,56 ±0,02	7,19 ±0,003	6,07 ±0,07	0,083 ±0,002
Івано-Франківська область, Галицький район, околиці с. Вікторів	0,059 ±0,002	1,26 ±0,04	1,43 ±0,07	10,46 ±0,02	7,31 ±0,01	2,36 ±0,02	1,18 ±0,02	1,73 ±0,15	7,47 ±0,07	6,22 ±0,03	0,084 ±0,001
Івано-Франківська область, Калуський район, околиці с. Завій	0,049 ±0,003	1,15 ±0,04	1,36 ±0,04	10,22 ±0,04	7,22 ±0,03	2,39 ±0,02	1,02 ±0,08	1,62 ±0,05	7,32 ±0,06	6,15 ±0,07	0,083 ±0,001

Продовж. табл. 3.19

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Навчально-дослідні ділянки лікарських рослин ІФНМУ	0,054 ±0,004	1,25 ±0,02	1,41 ±0,04	10,29 ±0,04	7,20 ±0,02	2,39 ±0,01	1,08 ±0,06	1,64 ±0,06	7,25 ±0,05	6,01 ±0,04	0,084 ±0,001
Чернівецька область, Сторожинецький район, околиці с. Глибочок	0,031 ±0,003	1,21 ±0,05	1,15 ±0,05	9,53 ±0,07	6,87 ±0,04	2,31 ±0,01	1,18 ±0,02	1,24 ±0,06	7,03 ±0,07	5,84 ±0,07	0,080 ±0,001
Чернівецька область, Кіцманський район, околиці с. Ревне	0,032 ±0,003	1,22 ±0,06	1,18 ±0,03	9,44 ±0,05	6,91 ±0,04	2,33 ±0,01	1,02 ±0,05	1,21 ±0,03	6,98 ±0,04	5,94 ±0,14	0,082 ±0,002

Висновки до розділу 3

1. У результаті проведеного фітохімічного аналізу трави та кореневищ з коренями п. європейського встановлено наявність простих фенолів, танінів, флавоноїдів, гідроксикоричних кислот, сапонінів, вільних цукрів, полісахаридів, амінокислот, органічних кислот, вітаміну K_1 .

2. Методом паперової хроматографії в кореневищах з коренями п. європейського виявлено яблучну, лимонну та щавлеву кислоти, а в траві – ще аскорбінову кислоту. У результаті хроматографічного дослідження амінокислотного складу сировини п. європейського встановлено наявність 17 амінокислот, 7 з яких є незамінними: лейцин, валін, треонін, метіонін, ізолейцин, фенілаланін, лізин.

3. Методом рідинної екстракції, хроматографії на колонках силікагелю, препаративної хроматографії на папері, дробної кристалізації з надземних органів п. європейського виділено в індивідуальному стані 6 гідроксикоричних кислот (кофейна, хлорогенова, неохлорогенова, розмаринова, ферулова, *n*-кумарова) та 1 флавоноїд (рутин); з підземних органів – 5 гідроксикоричних кислот (кофейна, хлорогенова, неохлорогенова, розмаринова, ферулова).

4. Встановлено кількісний вміст суми поліфенолів, танінів, суми гідроксикоричних кислот, суми флавоноїдів, окиснюваних фенолів, тритерпенових сапонінів, органічних кислот, в тому числі аскорбінової кислоти, вітаміну K_1 .

5. Вперше з сировини п. європейського виділено фракції ВРПС, ПР, ГцА та ГцБ. Встановлено, що повне розщеплення полімерних сполук до молекул мономерів відбувається протягом 3 год. У гідролізатах фракцій виявлено глюкозу, арабінозу, рамнозу, ксилолу, фруктозу, глюкуронову та галактуранову кислоти.

6. Вперше методом ВЕРХ у траві п. європейського ідентифіковано 14 сполук фенольного походження, а в кореневищах з коренями – 13. Серед

виявлених сполук наявні таніни, флавоноїди, гідроксикоричні кислоти та кумарини.

7. Вперше методом газової хроматографії з мас-спектрометрією в траві п. європейського ідентифіковано та визначено кількісний вміст 3 сполук стероїдної природи та 9 жирних кислот. Вміст ненасичених і насичених жирних кислот знаходиться майже у рівному співвідношенні – 50,46 % і 49,54 % від загального вмісту жирних кислот.

8. Методом ГХ/МС у траві п. європейського вперше досліджено компонентний склад ефірних олій. Ідентифіковано 14 летких сполук, серед яких терпеноїди та їх похідні, аліфатичні та ароматичні вуглеводні.

9. Методом атомно-абсорбційної спектрометрії в траві та кореневищах з коренями п. європейського виявлено макро- (калій, кальцій та магній) та мікроелементи (ферум, цинк, марганець, купрум). Вміст плюмбуму та кадмію знаходиться в межах допустимих концентрацій згідно з вимогами ДФУ 2.0 для препаратів рослинного походження.

10. У результаті порівняльного фітохімічного дослідження трави та кореневищ з коренями п. європейського встановлено, що вміст всіх груп БАР в сировині п. європейського не суттєво залежить від місця зростання рослини. Також встановлено що за вмістом БАР культивована сировина практично не відрізняється від сировини, заготовленої в природних умовах зростання.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Грицик Л. М., Легінь Н. І., Грицик А. Р. Вивчення якісного складу та кількісного вмісту органічних кислот в сировині *Sanicula europaea* L. *Український вісник психоневрології*. 2014. Т. 22, Вип. 2 (79) додаток. С. 105 – 107.

2. Дослідження елементного складу підлісника європейського та астранції великої / Н. І. Легінь, Т. І. Коляджин, Л. М. Грицик, А. Р. Грицик. *Медична та клінічна хімія*. 2018. Т. 20, № 2. С. 112 – 116.

3. Study of Amino Acid Composition of *Betonica* L., *Sanicula* L. and

Astrantia L. Genera Species. / L. M. Grytsyk, A. R. Grytsyk, I. A. Sas, N. I. Legin, T. I. Kolyadjin. *The Pharma Innovation Journal*. 2016. No 5 (7). P. 47 – 49.

4. Грицик Л. М., Легінь Н. І. Дослідження полісахаридів трави підлісника європейського. *Хімія природних сполук*: матеріали III Всеукр. наук.-практ конф., 30 – 31 жовт. 2012 р. Тернопіль, 2012. С. 13 – 14.

5. Легінь Н. І. Дослідження органічних кислот в траві та кореневищах з коренями підлісника європейського. *Інновації в медицині*: матеріали 82-ої наук.-практ. конф. студентів і молодих вчених з міжнар. участю, 18 – 19 квіт. 2013 р. Івано-Франківськ, 2013. С. 224.

6. Легінь Н. І. Ідентифікація біологічно активних речовин підлісника європейського. *Інновації в медицині*: матеріали 83-ої наук.-практ. конф. студентів і молодих вчених з міжнар. участю, 27 – 28 берез. 2014 р. Івано-Франківськ, 2014. С. 196.

7. Грицик Л. М., Легінь Н. І, Грицик А. Р. Ідентифікація деяких біологічно активних речовин у надземних і підземних органах підлісника європейського *Sanicula europaea* L. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології та біотехнології*: матеріали IV наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 16 – 17 жовт. 2014 р. Х. : Вид-во НФаУ, 2014. С. 88.

8. Легінь Н. І. Визначення вмісту окиснюваних фенолів в сировині підлісника європейського. *Інновації в медицині*: матеріали 84-ої наук.-практ. конф. студентів і молодих вчених з міжнар. участю, 12–13 берез. 2015 р. Івано-Франківськ, 2015. С. 170 – 171.

РОЗДІЛ 4

ВИДІЛЕННЯ КОМПЛЕКСІВ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН
ПІДЛІСНИКА ЄВРОПЕЙСЬКОГО ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ЇХ
ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ

Результати проведених фітохімічних досліджень (розділ 3) вказують, що досліджувані трава та кореневища з коренями п. європейського вміщують широкий спектр БАР і дають можливість розглядати сировину п. європейського як перспективне джерело цінних біологічно активних речовин.

З метою раціонального використання рослинної сировини та створення нових лікарських засобів нами встановлено оптимальні параметри одержання екстрактів з трави та кореневищ з коренями п. європейського та досліджено їх фармакологічну активність.

4.1 Встановлення технологічних параметрів сировини підлісника європейського

При розробці технології отримання фітопрепаратів необхідно враховувати властивості лікарської рослинної сировини, які дають можливість максимально вилучати біологічно активні речовини для забезпечення необхідного фармакологічного ефекту. Для більш ефективного процесу екстрагування, прогнозування та нормування якості екстрактів необхідно знати технологічні властивості лікарської рослинної сировини [134].

З метою встановлення оптимальних умов одержання рослинних екстрактів з сировини п. європейського нами були визначенні основні технологічні параметри трави та кореневищ з коренями п. європейського за загальноприйнятими методиками: питома густина, об'ємна густина, насипна густина, порізність, пористість сировини, вільний об'єм шару, коефіцієнт поглинання екстрагенту [55].

Сировину заготовляли під час масового цвітіння (трава) та відмирання надземної частини (кореневища з коренями) в околицях с. Вовчинці Івано-Франківської області у 2012 році.

Результати визначення основних технологічних параметрів сировини п. європейського представлено в табл. 4.1.

Таблиця 4.1

Технологічні параметри сировини підлісника європейського

№ з/п	Технологічні параметри	Підлісника європейського трава	Підлісника європейського кореневища з коренями
1.	Питома густина, г/см ³	1,3097±0,0177	1,2633±0,0168
2.	Об'ємна густина, г/см ³	0,5237±0,0114	0,7067±0,0066
3.	Насипна густина, г/см ³	0,3345±0,0052	0,5299±0,0049
4.	Пористість	0,6001±0,0155	0,4406±0,0093
5.	Порізність	0,3613±0,0107	0,2502±0,0078
6.	Вільний об'єм шару	0,7446±0,0110	0,5805±0,0112
7.	Коефіцієнт поглинання екстрагенту:		
	- вода очищена	4,0	3,3
	- 40 % етанол	3,8	2,9
	- 70 % етанол	3,2	2,2
	- 90 % етанол	2,7	1,6
	- 96 % етанол	2,3	1,4

Проведені технологічні дослідження (табл. 4.1) вказують, що рослинна сировина має низькі значення насипної густини, тому це потрібно врахувати при виборі обладнання для екстрагування. Пористість і порізність рослинної сировини мають середні значення, тому потенційну пропускну здатність шару сировини можна вважати задовільною.

Отримані результати технологічних властивостей сировини п. європейського дають можливість провести визначення оптимальних параметрів процесу екстрагування: вибрати обладнання для змішування та

екстрагування; визначити потенційну пропускну здатність шару сировини; визначити об'єм, який займає суха і набухла сировина; розрахувати мінімальний об'єм екстрагенту, необхідний для повного покриття шару сировини.

4.2 Встановлення параметрів екстракції біологічно активних речовин з сировини підлісника європейського

Ефективність екстракції БАР з рослинної сировини залежить від хімічного складу сировини, ступеня її подрібненості, вибору екстрагенту, тривалості та кратності процесу екстракції, співвідношення сировини та екстрагенту, температурного режиму тощо [135, 136]. Важливим є підбір оптимальних умов для екстрагування із сировини максимальної кількості БАР певної спрямованості дії.

При встановленні оптимальних параметрів одержання екстрактів використовували реакції ідентифікації, хроматографію і визначали вміст окиснюваних фенолів та екстрактивних речовин (розділ 2.3).

Вибір ступеня подрібнення сировини. Висушену сировину п. європейського подрібнювали на млинку типу "Ексцельсіор" і просіювали крізь сита з діаметром отворів 7; 5,5; 4,5; 3; 2,5; 1; 0,5; 0,2 мм. З кожної фракції відбирали точну наважку сировини, поміщали в круглодонну колбу місткістю 100 мл, додавали воду очищену у співвідношенні сировини до екстрагента 1:50 і нагрівали на водяному нагрівнику протягом 30 хв при періодичному перемішуванні. Отриману витяжку проціджували, при необхідності доводили водою до початкового об'єму та визначали вміст окиснюваних фенолів та екстрактивних речовин.

Результати визначення впливу ступеня подрібнення сировини п. європейського на повноту екстракції БАР наведено у табл. 4.2.

Одержані дані (табл. 4.2) свідчать, що оптимальним ступенем подрібнення для трави та кореневищ з коренями п. європейського є розмір частинок 1,0 – 2,5 мм, при якому відбувається максимальне вивільнення окиснюваних фенолів та екстрактивних речовин. Подрібнення менше як 0,5 мм та більше ніж 2,5 мм

призводить до зниження виходу діючих речовин. Таким чином експериментально підтверджено, що оптимальним ступенем подрібнення сировини п. європейського є розмір частинок від 1,0 до 2,5 мм.

Таблиця 4.2

Залежність повноти екстракції БАР з сировини підлісника європейського від ступеня подрібнення

Ступінь подрібнення сировини, мм	Вид рослинної сировини, %, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, n = 6			
	Трава		Кореневища з коренями	
	Окиснювані феноли	Екстрактивні речовини	Окиснювані феноли	Екстрактивні речовини
0,2 – 0,5	2,25±0,12	12,63±0,11	2,06±0,11	11,31±0,15
0,5 – 1,0	3,13±0,14	16,91±0,15	3,31±0,12	15,59±0,16
1,0 – 2,5	4,13±0,13	17,79±0,18	3,51±0,14	16,38±0,18
2,5 – 3,0	3,89±0,12	16,18±0,17	3,13±0,15	15,26±0,16
3,0 – 4,5	2,87±0,11	15,03±0,18	2,37±0,14	15,03±0,17
4,5 – 5,5	2,52±0,11	13,95±0,15	2,12±0,13	13,34±0,15
5,5 – 7,0	2,14±0,12	13,38±0,14	1,92±0,13	13,13±0,18

Вибір екстрагента. За результатами аналізу літературних джерел встановлено, що п. європейський виявляє кровоспинні, протизапальні, ранозагоювальні, антимікробні властивості. Враховуючи результати проведених фітохімічних досліджень трави та кореневищ з коренями п. європейського та на основі аналізу даних літератури щодо особливостей застосування в народній медицині, було вивчено вплив вибору екстрагенту на вилучення максимальної кількості БАР, які можуть виявляти кровоспинну, протизапальну, ранозагоювальну та антимікробну дії.

Вибір екстрагента було здійснено експериментальним шляхом, враховуючи хімічний склад сировини, який представлено речовинами фенольного характеру та полісахаридами. Як екстрагенти було використано

воду очищену і водно-спиртові суміші з вмістом етанолу 40 %, 70 %, 90 % та 96 %, в яких добре розчиняються зазначені вище БАР.

Результати повноти екстракції БАР у витяжках при виборі екстрагенту наведені в табл. 4.3.

Таблиця 4.3

**Залежність повноти екстракції БАР з сировини підлісника
європейського від природи екстрагента**

Вид екстрагента	Вид рослинної сировини, %, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, n = 6			
	Трава		Кореневища з коренями	
	Окиснювані феноли	Екстрактивні речовини	Окиснювані феноли	Екстрактивні речовини
Вода очищена	4,13±0,13	17,79±0,18	3,51±0,14	16,59±0,18
40 % етанол	4,17±0,14	12,48±0,18	3,19±0,17	13,57±0,19
70 % етанол	4,29±0,13	15,74±0,16	3,54±0,19	15,48±0,18
90 % етанол	3,89±0,15	13,88±0,14	3,42±0,18	12,84±0,18
96 % етанол	2,87±0,15	11,53±0,14	2,94±0,15	9,95±0,17

Отримані дані експериментального дослідження свідчать, що за здатністю вилучати окиснювані феноли переважає 70 % етанол, який забезпечує вихід даної групи БАР з трави п. європейського – 4,29 %, а з кореневищ з коренями – 3,54 %. При використанні 70 % етанолу вихід екстрактивних речовин становить 15,74 % для трави та 15,48 % для кореневищ з коренями. Використання водно-спиртових розчинів з вищим вмістом етанолу призводило до зменшення виходу БАР. При використанні води очищеної як екстрагенту, вміст вилучених окиснюваних фенолів становив 4,13 % для трави та 3,51 % для кореневищ з коренями, а екстрактивних речовин – 17,79 % та 16,59 % відповідно.

Таким чином, для подальших досліджень як екстрагент обрано 70 % етанол, який вилучає з сировини максимальну кількість фенольних сполук, та воду очищену як найбільш універсальний, безпечний та економічно доступний розчинник.

Співвідношення сировина-екстрагент. Для вивчення динаміки виходу біологічно активних речовин з досліджуваної сировини п. європейського готували витяжки у співвідношенні сировина до екстрагента 1:5; 1:10; 1:15, 1:25, 1:50, екстрагуючи подрібнену сировину водою очищеною або 70 % етанолом. Результати проведених досліджень представлені в табл. 4.4.

Таблиця 4.4

Залежність повноти екстракції БАР від вибору співвідношення між сировиною та екстрагентом

Співвідношення сировина : екстрагент	Вид рослинної сировини, %, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, n = 6			
	Трава		Кореневища з коренями	
	Окиснювані феноли	Екстрактивні речовини	Окиснювані феноли	Екстрактивні речовини
<i>Вода очищена</i>				
1:5	2,19±0,18	12,68±0,19	2,14±0,12	11,22±0,18
1:10	4,02±0,14	16,62±0,20	3,24±0,11	15,44±0,17
1:15	4,08±0,15	17,28±0,18	3,46±0,12	15,78±0,14
1:25	4,11±0,18	17,66±0,19	3,49±0,18	16,26±0,15
1:50	4,13±0,13	17,79±0,18	3,51±0,14	16,59±0,18
<i>70 % етанол</i>				
1:5	2,91±0,13	10,75±0,18	2,68±0,15	11,03±0,17
1:10	3,98±0,11	14,63±0,19	3,26±0,13	14,65±0,19
1:15	4,15±0,11	14,98±0,20	3,43±0,18	14,93±0,18
1:25	4,23±0,14	15,32±0,19	3,49±0,17	15,14±0,15
1:50	4,29±0,13	15,74±0,16	3,54±0,19	15,48±0,18

За результатами проведеного дослідження встановлено, що оптимальним співвідношенням між сировиною й екстрагентом для сировини п. європейського є співвідношення 1:10 незалежно від екстрагента. Зменшення кількості екстрагенту погіршує процес екстракції та призводить до зниження виходу окиснюваних фенолів та екстрактивних речовин. Збільшення кількості

екстрагенту є економічно недоцільним через зростання витрат етанолу на екстрагування та енергозатрат на випарювання отриманого екстракту, при цьому вихід екстрактивних та діючих речовин зростає несуттєво.

Час екстракції. Надалі проводили вибір тривалості екстракції для отримання максимального вмісту БАР. Екстракцію біологічно активних речовин із досліджуваної сировини проводили відповідним екстрагентом, екстрагуючи сировину у співвідношенні сировина-екстрагент 1 : 10 впродовж 15 хв, 30 хв, 45 хв та 60 хв на водяному нагрівнику при температурі 50 – 60 °С з метою інтенсифікації процесу. Результати залежності вмісту БАР в одержаних витяжках від часу екстракції наведено у табл. 4.5.

Таблиця 4.5

Залежність повноти екстракції БАР з сировини підлісника європейського від вибору оптимального часу екстракції

Час екстракції, хв	Вид рослинної сировини, %, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, n = 6			
	Трава		Кореневища з коренями	
	Окиснювані феноли	Екстрактивні речовини	Окиснювані феноли	Екстрактивні речовини
<i>Вода очищена</i>				
15	3,34±0,15	12,26±0,17	2,91±0,14	12,87±0,14
30	4,02±0,14	16,62±0,20	3,24±0,11	15,44±0,17
45	4,18±0,11	16,98±0,17	3,32±0,15	15,76±0,19
60	4,20±0,15	17,06±0,19	3,36±0,13	16,14±0,20
90	4,25±0,10	17,13±0,15	3,41±0,14	16,19±0,18
<i>70 % етанол</i>				
15	2,86±0,14	13,31±0,20	2,91±0,14	12,48±0,20
30	3,98±0,11	14,63±0,19	3,26±0,13	14,65±0,19
45	4,04±0,10	14,84±0,15	3,29±0,11	14,91±0,17
60	4,06±0,15	15,01±0,17	3,32±0,14	15,08±0,19
90	4,12±0,17	15,09±0,14	3,34±0,16	15,16±0,17

Отримані результати дослідження (табл. 4.5) вказують, що повнота вивільнення БАР з сировини п. європейського досягається при екстракції впродовж 30 хв, подальше збільшення часу суттєво не впливало на вивільнення БАР. Вивільнення окиснюваних фенолів за цей час становить для трави 4,02 % і 3,98 % (екстрагент – вода або 70 % етанол), для кореневищ з коренями п. європейського – 3,24 % і 3,26 % (екстрагент – вода або 70 % етанол), а екстрактивних речовин – 16,62 % і 14,65 % та 15,44 % і 14,65 % відповідно.

Дані щодо впливу кратності екстракції на вилучення БАР з трави та кореневищ з коренями п. європейського представлені в таблиці 4.6.

Таблиця 4.6

Залежність повноти екстракції БАР з сировини підлісника європейського від вибору оптимальної кратності екстракції

Кратність	Вид рослинної сировини, %, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, n = 6			
	Трава		Кореневища з коренями	
	Окиснювані феноли	Екстрактивні речовини	Окиснювані феноли	Екстрактивні речовини
<i>Вода очищена</i>				
I	4,02±0,14	16,62±0,20	3,24±0,11	15,44±0,17
II	1,25±0,13	6,92±0,19	1,67±0,12	6,39±0,18
III	1,07±0,11	2,94±0,18	1,21±0,10	4,73±0,13
IV	0,63±0,15	1,50±0,18	0,79±0,11	1,56±0,16
<i>70 % етанол</i>				
I	3,98±0,11	14,63±0,19	3,26±0,13	14,65±0,19
II	1,45±0,14	5,79±0,15	1,54±0,14	7,95±0,14
III	1,04±0,13	1,83±0,19	1,18±0,13	3,01±0,17
IV	0,79±0,11	0,73±0,20	0,86±0,11	0,54±0,19

Як видно з даних, наведених у таблиці 4.6, при трикратній екстракції відбувалось найбільш повне вилучення БАР з трави та кореневищ з коренями п. європейського. При подальшому екстрагуванні вміст БАР особливо не змінюється. Сумарний вихід окиснюваних фенолів для трави п. європейського при трикратній екстракції становить – 6,34 % і 6,47 % (екстрагент – вода

очищена або 70 % етанол), для кореневищ з коренями – 6,12 % і 5,98 % (екстрагент – вода очищена або 70 % етанол), а екстрактивних речовин – 26,48 % і 22,25 % та 26,56 % і 25,61 % відповідно.

За результатами проведених досліджень було обрано оптимальні умови екстрагування для трави та кореневищ з коренями п. європейського (табл. 4.7).

Таблиця 4.7

**Оптимальні параметри екстракції БАР з сировини
підлісника європейського**

Ступінь подрібнення, мм	Екстрагент	Співвідношення між сировиною й екстрагентом	Час одноразової екстракції, хв	Кратність екстракції
Трава				
1,0 – 2,5	Вода очищена	1:10	30	III
	70 % етанол			
Кореневища з коренями				
1,0 – 2,5	Вода очищена	1:10	30	III
	70 % етанол			

Таким чином, на підставі результатів проведених досліджень (табл. 4.7) встановлено, що оптимальними параметрами виділення БАР була екстракція сировини п. європейського, подрібненої до розміру частинок 1,0 – 2,5 мм, водою очищеною або 70 % етанолом на водяному нагрівнику при температурі 50 – 60 °С впродовж 30 хв. Оптимальне співвідношення сировини до екстрагента становить 1:10. Повнота виділення БАР досягається при трикратному екстрагуванні.

4.3 Одержання сумарних екстрактів підлісника європейського та їх характеристика

Вихідною сировиною для одержання екстрактів була трава та кореневища з коренями п. європейського заготовлені в фазу масового цвітіння (трава) та

відмирання надземної частини (кореневища з коренями) в 2014 р. в околицях с. Вікторів Івано-Франківської області.

Комплекси БАР з трави та кореневищ з коренями п. європейського отримували методом ремацерації, настоюючи сировину при температурі 50 – 60 °С при періодичному перемішуванні.

Для одержання екстракту (екстрагент – вода очищена) 0,2 кг висушеної трави або 0,2 кг кореневищ з коренями п. європейського подрібнювали до часток розміром 1,0 – 2,5 мм, заливали 2,80 л або 2,66 л води очищеної (співвідношення сировини до екстрагенту складало 1:10, з врахуванням значення коефіцієнту поглинання води очищеної, який для трави становив 4,0, а для кореневищ з коренями – 3,3) та залишали настоювати 1 год при кімнатній температурі. Після набухання сировину екстрагували впродовж 30 хв за температури 50 – 60 °С. Отриману витяжку після охолодження зливали, а шрот сировини ще двічі заливали новою порцією розчинника (2,0 л) та екстрагували в аналогічних умовах. Отримані витяжки об'єднували, відстоювали та фільтрували.

Для одержання екстракту (екстрагент – 70 % етанол) 0,2 кг висушеної трави або 0,2 кг кореневищ з коренями п. європейського подрібнювали до часток розміром 1,0 – 2,5 мм, заливали 2,64 л або 2,44 л 70 % етанолу (співвідношення сировини до екстрагенту складало 1:10, з врахуванням значення коефіцієнту поглинання 70 % етанолу, який для трави становив 3,2, а для кореневищ з коренями – 2,2) та залишали настоювати 1 год при кімнатній температурі. Після набухання сировину екстрагували впродовж 30 хв за температури 50 – 60 °С. Отриману витяжку після охолодження зливали, а шрот сировини ще двічі заливали новою порцією розчинника (2,0 л) та екстрагували в аналогічних умовах. Отримані витяжки об'єднували, відстоювали та фільтрували.

Після декантації та фільтрування одержані екстракти (екстрагент – вода очищена або 70 % етанол) розливали в стерильні флакони по 200 мл і ліофільно висушували. Спочатку їх заморожували в спиртових ваннах при температурі спирту не вище – 40 °С протягом 30 хв. Після цього флакони з замороженими витяжками ставили в холодильник і при температурі не вище – 30 °С закалювали

та зберігали перед завантаженням в сублімаційний апарат протягом 12 год. Висушування витяжок проводили в сублімаційному апараті типу КС-30 (завод «Фрігера», Чехія). В початковому періоді роботи по висушуванню тиск в субліматорі знижували від $1 \cdot 10^{-1}$ до $1 \cdot 10^{-5}$ мм рт. ст. і температуру заморожених витяжок від -35°C до -50°C . Через 2 – 2,5 години включали підігрів і через 12 – 16 годин проводили постійне підвищення температури від мінусової до плюсової. Температура продукту в кінцевому періоді висушування не перевищувала $+40^{\circ}\text{C}$. Для одержання екстрактів загальна тривалість висушування була 28 – 32 години.

Технологічна схема одержання екстракту трави п. європейського наведена на рис. 4.1.

В результаті досліджень було одержано екстракти з сировини п. європейського, які містять речовини фенольної структури.

Характеристику і вихід екстрактів з сировини п. європейського наведено в табл. 4.8.

Таблиця 4.8

Характеристика і вихід екстрактів з сировини підлісника європейського

Сировина	Екстрагент	Умовне позначення екстракту	Колір і консистенція	Вихід, %
Трава	Вода очищена	ПЄ _{тр.} -В	Пухкий порошок темно-коричневого кольору	25,28
	70 % етанол	ПЄ _{тр.} -70	Пухкий порошок жовтого кольору	21,57
Кореневища з коренями	Вода очищена	ПЄ _{к.к.} -В	Пухкий порошок коричневого кольору	28,45
	70 % етанол	ПЄ _{к.к.} -70	Пухкий порошок світло-жовтого кольору	26,64

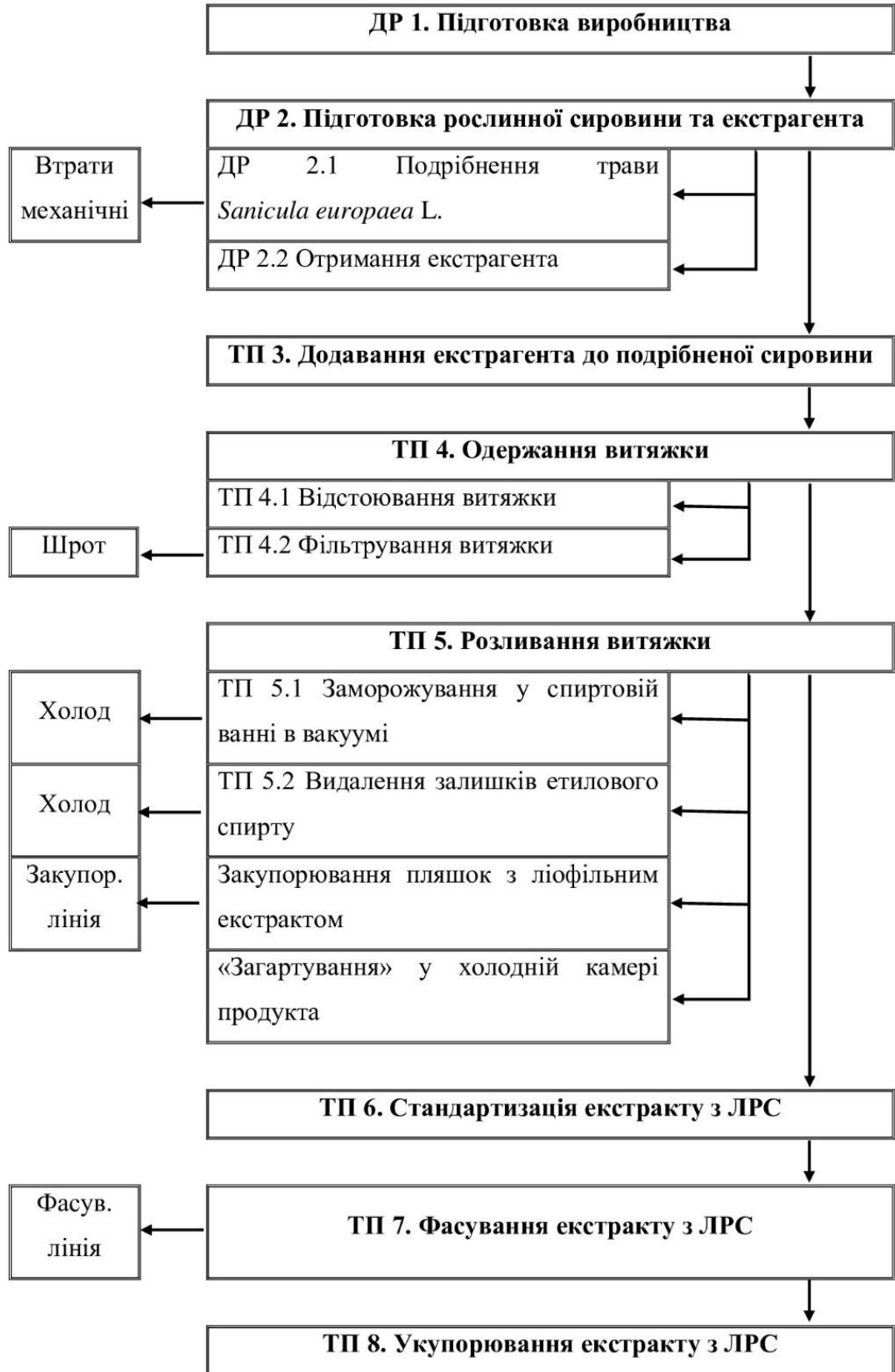


Рис. 4.1 Технологічна схема одержання екстракту з трави п. європейського

Проведені дослідження (табл. 4.8) показали, що вихід екстракту для трави п. європейського становить 21,57 – 25,28 %, для кореневищ з коренями – 26,64 – 28,45 % залежно від виду екстрагенту [115, 134].

Оцінку якості екстрактів ПЄ_{тр.}-В, ПЄ_{тр.}-70, ПЄ_{к.к.}-В та ПЄ_{к.к.}-70 проводили за основними групами БАР, що відповідають за фармакологічну активність та екстрагуються у водно-спиртові та водні розчини. Виявлення груп діючих речовин та визначення їх кількісного вмісту проводили за описаними вище методиками (розділ 2) [134, 137].

Одержані екстракти трави та кореневищ з коренями п. європейського давали позитивні реакції на таніни, сапоніни, флавоноїди, полісахариди. За допомогою ПХ та ТШХ в отриманих екстрактах за інтенсивністю забарвлення плям, їх флуоресценцією в УФ-світлі до і після обробки парами аміаку та хромогенними реактивами виявлено флавоноїди (рутин, кверцетин, апігенін), гідроксикоричні кислоти (розмаринова, хлорогенова та кофейна кислоти).

В одержаних екстрактах з трави та кореневищ з коренями п. європейського досліджували кількісний вміст основних груп БАР. Результати визначення кількісного вмісту БАР в екстрактах наведено в табл. 4.9.

Таблиця 4.9

Кількісний вміст БАР в екстрактах підлісника європейського

Умовне позначення екстракту	Втрата в масі при висушуванні	Вміст БАР, %, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, n = 6					
		Сума поліфенолів	Гідроксикоричні кислоти	Тритерпенові сапоніни	Флавоноїди	Полісахариди	Вітамін К ₁
1	2	3	4	5	6	7	8
ПЄ _{тр.} -В	4,59 ±0,14	13,54 ±0,24	2,18 ±0,05	1,65 ±0,04	3,61 ±0,14	4,97 ±0,23	-

1	2	3	4	5	6	7	8
ПЄ _{тр.} -70	3,80 ±0,11	15,02 ±0,19	2,87 ±0,07	1,36 ±0,03	5,46 ±0,23	-	5,59 ±0,23
ПЄ _{к.к.} -В	4,02 ±0,12	11,08 ±0,15	2,21 ±0,07	0,83 ±0,01	0,13 ±0,01	2,91 ±0,14	-
ПЄ _{к.к.} -70	3,89 ±0,10	12,24 ±0,24	2,61 ±0,08	0,72 ±0,02	0,21 ±0,02	-	2,22 ±0,11

Проведені дослідження показали (табл. 4.9), що в екстрактах з сировини п. європейського в значних кількостях містяться сполуки поліфенольної природи, гідроксикоричні кислоти, флавоноїди, тритерпенові сапоніни, полісахариди, вітамін K_1 . Визначено, що вміст основних груп БАР в екстрактах трави п. європейського вищий ніж в екстрактах, одержаних з кореневищ з коренями. Вміст суми поліфенолів, флавоноїдів та гідроксикоричних кислот вищий в екстрактах, отриманих з використанням екстрагенту 70 % етанолу, а тритерпенових сапонінів – в екстрактах, отриманих з використанням екстрагенту води очищеної. Тому доцільним є подальше дослідження екстрактів з метою вивчення кровоспинної, ранозагоювальної, протизапальної та антимікробної активностей.

Спосіб одержання екстракту з трави п. європейського з кровоспинною дією захищено патентом України на корисну модель № 132069 [138].

З метою стандартизації екстрактів ПЄ_{тр.}-В, ПЄ_{тр.}-70, ПЄ_{к.к.}-В, ПЄ_{к.к.}-70 одержаних в лабораторних умовах визначали ряд числових показників у 5 серіях екстракту згідно з монографією «Екстракти» (ДФУ 2.0 Т 1). Оцінку якості одержаних екстрактів проводили за наступними органолептичними та фізико-хімічними показниками: опис, ідентифікація (2.2.7), втрата в масі при висушуванні (2.8.17), загальна зола (2.4.16), важкі метали (2.4.8, метод А), мікробіологічна чистота (5.1.4, 2.6.12, 2.6.13) та кількісне визначення діючих речовин [55].

Показники якості досліджуваних екстрактів трави та кореневищ з коренями п. європейського наведено в табл. 4.10 – 4.13.

Таблиця 4.10

**Показники якості екстракту трави підлісника європейського
(екстрагент – вода очищена)**

№ з/п	Досліджувані параметри	Серія 0001	Серія 0002	Серія 0003	Серія 0004	Серія 0005
1.	Опис	Пухкий гігроскопічний порошок темно-коричневого кольору, без запаху				
2.	Ідентифікація діючих речовин	Реакції позитивні				
3.	Втрата в масі при висушуванні	4,53	4,77	4,66	4,52	4,55
4.	Залишкові кількості органічних розчинників	> 0,5 %	> 0,5 %	> 0,5 %	> 0,5 %	> 0,5 %
5.	Кількісний вміст БАР:					
	- сума поліфенолів	13,51	13,58	13,54	13,55	13,53
	- гідроксикоричні кислоти	2,16	2,20	2,17	2,15	2,18
	- сапоніни	1,63	1,67	1,64	1,69	1,61

Таблиця 4.11

**Показники якості екстракту трави підлісника європейського
(екстрагент – 70 % етанол)**

№ з/п	Досліджувані параметри	Серія 0001	Серія 0002	Серія 0003	Серія 0004	Серія 0005
1	2	3	4	5	6	7
1.	Опис	Пухкий гігроскопічний порошок жовтого кольору, без запаху				
2.	Ідентифікація діючих речовин	Реакції позитивні				

1	2	3	4	5	6	7
3.	Втрата в масі при висушуванні	3,77	3,70	3,84	3,78	3,76
4.	Залишкові кількості органічних розчинників	> 0,5 %	> 0,5 %	> 0,5 %	> 0,5 %	> 0,5 %
5.	Кількісний вміст БАР:					
	- сума поліфенолів	14,90	15,06	15,09	15,02	14,95
	- гідроксикоричні кислоти	2,91	2,89	2,78	2,79	2,92
	- сапоніни	1,38	1,37	1,32	1,33	1,36

Таблиця 4.12

**Показники якості екстракту кореневищ з коренями
підлісника європейського (екстрагент – вода очищена)**

№ з/п	Досліджувані параметри	Серія 0001	Серія 0002	Серія 0003	Серія 0004	Серія 0005
1.	Опис	Пухкий гігроскопічний порошок коричневого кольору, без запаху				
2.	Ідентифікація діючих речовин	Реакції позитивні				
3.	Втрата в масі при висушуванні	4,03	3,93	4,02	4,06	4,02
4.	Залишкові кількості органічних розчинників	> 0,5 %	> 0,5 %	> 0,5 %	> 0,5 %	> 0,5 %
5.	Кількісний вміст БАР:					
	- сума поліфенолів	11,07	11,01	11,12	11,11	11,08
	- гідроксикоричні кислоти	2,23	2,17	2,16	2,20	2,22
	- сапоніни	0,86	0,80	0,84	0,83	0,81

**Показники якості екстракту кореневищ з коренями
підлісника європейського (екстрагент – 70 % етанол)**

№ з/п	Досліджувані параметри	Серія 0001	Серія 0002	Серія 0003	Серія 0004	Серія 0005
1.	Опис	Пухкий гігроскопічний порошок світло-жовтого кольору, без запаху				
2.	Ідентифікація діючих речовин	Реакції позитивні				
3.	Втрата в масі при висушуванні	3,78	3,94	3,97	3,89	3,90
4.	Залишкові кількості органічних розчинників	> 0,5 %	> 0,5 %	> 0,5 %	> 0,5 %	> 0,5 %
5.	Кількісний вміст БАР:					
	- сума поліфенолів	12,26	12,21	12,27	12,23	12,25
	- гідроксикоричні кислоти	2,65	2,58	2,61	2,63	2,61
	- сапоніни	0,71	0,74	0,71	0,73	0,72

Результати дослідження мікробіологічної чистоти одержаних екстрактів з трави та кореневищ з коренями п. європейського наведено в табл. 4.14.

Таблиця 4.14

**Результати вивчення мікробіологічної чистоти екстрактів з
сировини підлісника європейського**

Умовне позначення	Середовище МПА	Середовище Ендо	Середовище ЖСА	Середовище ВСА	Середовище Сабуро
ПЄ _{тр.} -В	Нема росту	Нема росту	Нема росту	Нема росту	Нема росту
ПЄ _{тр.} -70	Нема росту	Нема росту	Нема росту	Нема росту	Нема росту
ПЄ _{к.к.} -В	Нема росту	Нема росту	Нема росту	Нема росту	Нема росту
ПЄ _{к.к.} -70	Нема росту	Нема росту	Нема росту	Нема росту	Нема росту

Примітка: – в 1,0 г рослинних екстрактах знаходиться менше ніж 10 бактерій.

Результати проведених досліджень (табл. 4.14) свідчать, що представлені для дослідження екстракти відповідають вимогам ДФУ щодо мікробіологічної чистоти для нестерильних лікарських засобів.

Екстракти п. європейського являють собою гігроскопічні порошки від світло-жовтого до темно-коричневого кольору, розчинні у воді та 70 % етанолі, нерозчинні в органічних розчинниках. Втрата в масі при висушуванні становить від 3,80 % до 4,59 %, що відповідає вимогам до сухих екстрактів (не більше 5 %). Вміст суми поліфенолів в екстрактах ПЄ_{тр.}-В, ПЄ_{тр.}-70, ПЄ_{к.к.}-В, ПЄ_{к.к.}-В, ПЄ_{к.к.}-70 становив 13,54 %, 15,02 %, 11,08 %, 12,24 %; гідроксикоричних кислот – 2,18 %, 2,87 %, 2,21 %, 2,61 %; тритерпенових сапонінів – 1,65 %, 1,36 %, 0,83 %, 0,72 %; флавоноїдів – 3,61 %, 5,46 %, 0,13 %, 0,21 %. Вміст загальної золи не більше 1 %.

На основі проведених досліджень розроблено проєкт МКЯ «Підлісника європейського трави екстракт сухий».

Опис. Пухкий гігроскопічний порошок темно-коричневого кольору, гіркового смаку, без запаху.

Розчинність. Легко розчинний у воді, помірно розчинний в 40 % етанолі, нерозчинний у хлороформі, етилацетаті.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Визначення фенольних сполук проводили методом ТШХ (ДФУ 2.0, Т. 1 – 2.2.27).

Випробовуваний розчин. До 0,2 г екстракту додавали 5 мл метанолу, нагрівали на водяному нагрівнику зі зворотним холодильником при температурі 60 °С протягом 10 хв, охолоджували та фільтрували.

Розчин порівняння. 5,0 мг розмаринової кислоти, 1,0 мг хлорогенової кислоти й 2,5 мг апігеніну розчиняли у 10 мл метанолу.

Пластика. ТШХ-пластинка із шаром силікагелю.

Рухома фаза: мурашина кислота – вода – етилацетат (6:6:90).

Нанесення: 10 мкл (або 2 мкл), смугами 15 мм (або 8 мм).

Відстань, що має пройти рухома фаза: 8 см (або 6 см).

Висушування: на повітрі.

Виявлення: нагрівали при температурі 100 °С протягом 5 хв, гарячу пластинку обприскували розчином 5 г/л дифенілборної кислоти аміноетилового естеру в етилацетаті та переглядали в УФ-світлі при довжині хвилі 365 нм.

Результати: на хроматограмі випробовуваного розчину виявлялися: у нижній частині – жовтувато-коричнева флуоресцентна зона, що відповідає апігеніну, у середній частині – блакитна флуоресцентна зона, що відповідає хлорогеновій кислоті, у верхній частині – блакитна флуоресцентна зона, що відповідає розмариновій кислоті на хроматограмі розчину порівняння. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть проявлятися також інші флуоресцентні зони.

ВИПРОБУВАННЯ

Втрата в масі при висушуванні. Не більше 5 %. 0,50 г подрібненого у тонкий порошок екстракту поміщали у плоскодонну чашку діаметром близько 50 мм і заввишки близько 30 мм і сушили у сушильній шафі при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 3 год. Екстракти охолоджували в ексікаторі та зважували [127].

Загальна зола. Не більше 1,0 %.

Важкі метали. Не більше 0,001 %.

Мікробіологічна чистота. Випробовування на мікробіологічну чистоту включає кількісне визначення життєздатних бактерій та грибів, а також виявлення певних видів мікроорганізмів, наявність яких не допускається в нестерильних лікарських засобах.

Вивчення мікробіологічної чистоти проводили відповідно до вимог ДФУ, 5.1.4 N, 2.6.13 N. Категорія 3 В.

Підготовка зразка. 10 г субстанції поміщали в мірну колбу, доводили об'єм до 50 мл фосфатним буферним розчином з натрію хлоридом та пептоном рН 7,0, гомогенізували, доводили об'єм до 100 мл фосфатним буферним розчином з натрію хлоридом та пептоном рН 7,0 і струшували до отримання однорідної суспензії.

Визначення загальної кількості бактерій. По 1 мл зразка вносили у пробірки, що містять 4 мл розплавленого живильного середовища МПА,

охолодженого до 45 °С, швидко перемішували вміст пробірок і переносили на чашки Петрі з 15 – 20 мл середовища МПА. Інкубацію проводили при 37 °С, облік результатів через 24 год.

Визначення загальної кількості грибів. По 1 мл зразка вносили у пробірки, що містять 4 мл розплавленого живильного середовища Сабуро, охолодженого до 45 °С, швидко перемішували вміст пробірок і переносили на чашки Петрі з 15 – 20 мл середовища Сабуро. Інкубацію проводили при 37 °С, облік результатів через 24 – 72 год.

Виявлення *Escherichia coli* ATCC 25922. 10 мл кожного зразка вносили в 100 мл рідкого живильного середовища Кода, інкубували при 37 °С 24 год. З наступним висівом на тверде живильне середовище Ендо та інкубацією при 37 °С 24 год.

Виявлення бактерій *Salmonella*. 10 г субстанції вносили в 100 мл рідкого живильного подвійного Селенітового середовища інкубували при температурі від 35 до 37 °С від 18 до 24 год, 1 мл нагромаджувальної культури вносили на тверде живильне середовище ВСА та інкубували 18 – 24 год при температурі від 35 до 37 °С.

Кількісна оцінка ентеробактерій і деяких інших грамнегативних бактерій. 10 г субстанції вносили в стерильну колбу та доводили об'єм до 200 мл живильним середовищем Кода, гомогенізували та інкубували при температурі від 35 до 37 °С від 18 до 24 год. Після закінчення інкубації місткість з живильним середовищем Кода струшували та переносили гомогенат кожного зразка і їх розведення, що містять відповідно 0,1 г, 0,01 г, 0,001 г субстанції у відповідні об'єми живильного середовища Ендо за наступною схемою: по 2 мл гомогенату вносили в чотири стерильні місткості, що містять по 20 мл живильного середовища Ендо. Останню з місткостей використовували для приготування наступного розведення. По 2 мл гомогенату А вносили в чотири стерильні місткості, що містять по 20 мл живильного середовища Ендо. Остання з місткостей, що містить гомогенат використовували для приготування наступного розведення – гомогенату. По 2 мл гомогенату вносили в чотири стерильні місткості, що містять по 20 мл живильного середовища Ендо. Інкубацію проводили при температурі 37 °С через 24 год.

Виявлення *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 по 1 мл зразка вносили у чашки Петрі з 15 – 20 мл середовища МПА. Інкубацію проводили при 37 °С, облік результатів через 24 год.

Виявлення *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 по 1 мл зразка вносили у чашки Петрі з 15 – 20 мл середовища ЖСА. Інкубацію проводили при 37 °С, облік результатів через 24 – 48 год.

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Кількісне визначення суми поліфенолів проводили спектрофотометрично в перерахунку на пірогалол за фармакопейною методикою (ДФУ 2.0, Т. 1).

Випробовуваний розчин. 0,5 г досліджуваного екстракту поміщали у круглодонну колбу місткістю 250 мл, додавали 150 мл води очищеної та нагрівали на водяному нагрівнику зі зворотним холодильником протягом 30 хв. Охолоджували під проточною водою та кількісно переносили у мірну колбу місткістю 250 мл. Круглодонну колбу обполіскували водою очищеною, промивні води переносили в мірну колбу і доводили об'єм розчину водою очищеною до 250 мл. Відстоювали та фільтрували через фільтрувальний папір діаметром 125 мм. Перші 50 мл фільтрату відкидали (Розчин А)

Розчин порівняння (а). 5 мл розчину А доводили водою очищеною до об'єму 25 мл. До 2 мл одержаного розчину додавали 1 мл фосфорномолібденово-вольфрамового реактиву і 10 мл води очищеної та доводили розчином натрію карбонату (290 г/л) до об'єму 25 мл. Через 30 хв вимірювали оптичну густину розчину при довжині хвилі 760 нм (A_1), використовуючи як компенсаційний розчин воду очищену.

Розчин порівняння (b). Безпосередньо перед випробуванням 50,0 мг пірогалолу розчиняли у воді очищеній і доводили об'єм розчину тим самим розчинником до 100 мл. 5 мл одержаного розчину доводили водою очищеною до об'єму 100 мл.

Суміш 2 мл одержаного розчину, 1 мл фосфорномолібденово-вольфрамового реактиву і 10 мл води очищеної доводили розчином натрію карбонату (290 г/л) до об'єму 25 мл. Через 30 хв вимірювали оптичну густину розчину при довжині хвилі 760 нм (A_0), використовуючи як компенсаційний розчин воду очищену.

Вміст суми поліфенолів (X, %), у перерахунку на пірогалол, обчислювали за формулою:

$$X = \frac{62,5 \times A_1 \times m_2}{A_0 \times m_1},$$

де: m_1 – маса наважки досліджуваного екстракту, мг; m_2 – маса наважки пірогалолу, мг; A_1 – оптична густина досліджуваного розчину; A_0 – оптична густина розчину порівняння.

Показники якості екстракту трави п. європейського (екстрагент – вода очищена) згідно з розробленим проєктом МКЯ представлено в таблиці 4.15.

Таблиця 4.15

**Показники якості екстракту трави підлісника європейського
(екстрагент – вода очищена)**

Показник якості	Допустимі межі	Результат				
		Серія 001	Серія 002	Серія 003	Серія 003	Серія 003
1	2	3	4	5	6	7
<i>Опис</i>	Порошок темно-коричневого кольору, гіркого смаку, без запаху	Відповідає				
<i>Розчинність</i>	Розчинний у воді, помірно розчинний у 40 % етанолі, нерозчинний в хлороформі, етилацетаті	Відповідає				
<i>Ідентифікація діючих речовин</i>	Метод ТШХ	Відповідає				
<i>Втрата в масі при висушуванні, %</i>	Не більше 5 %	4,66	4,59	4,45	4,68	4,58
<i>Загальна зола, %</i>	Не більше 1 %	0,88	0,87	0,87	0,86	0,87

1	2	3	4	5	6	7
<i>Важкі метали</i>	Не більше 0,002 %	Відповідає				
<i>Мікробіологічна чистота</i>	В 1 г препарату не більше 100 мікроорганізмів (бактерій і грибів сумарно). Не допускається наявність ентеробактерій, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 в 1 г	Відповідає				
<i>Сума поліфенолів, %</i>	Не менше 13 %	13,51	13,79	13,95	13,56	13,67

4.4 Дослідження фармакологічної активності екстрактів підлісника європейського

Токсикологічні дослідження та вивчення специфічної фармакологічної активності екстрактів п. європейського проводили при консультативній допомозі завідувача кафедри анатомії людини професора Попадинець О. Г., доцента кафедри анатомії людини Іваночка В. М. Вивчення біохімічних та гематологічних показників крові дослідних тварин проводили на базі «Центру біоелементології» Івано-Франківського національного медичного університету (свідоцтво про технічну компетентність № 037/19 від 13 червня 2019 р. до 12 червня 2024 р.).

Досліди проводили на білих нелінійних мишах і щурах, мурчаках, вирощених у віварії ІФНМУ, які були стандартизовані за фізіологічними й

біохімічними показниками та знаходились в умовах віварію згідно з вимогами санітарно-гігієнічних норм на стандартному раціоні.

Тварини знаходилися в умовах віварію з дотриманням вимог санітарно-гігієнічних норм, у пластикових клітках на стандартному харчовому раціоні відповідно до чинних норм. Утримання тварин та маніпуляції з ними проводили відповідно до міжнародних та вітчизняних вимог про гуманне ставлення до тварин, що узгоджуються з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986 р.), Законом України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження», загальними етичними принципами експериментів на тваринах, ухвалених Першим Національним конгресом України з біоетики (2001 р.) [139 – 141].

Отримані результати дослідження опрацьовано методом варіаційної статистики з обчисленням середнього арифметичного та його стандартної похибки. Вірогідність порівняльних величин оцінювали за критерієм Стьюдента.

4.4.1 Вивчення гострої токсичності екстрактів

Вивчення класу токсичності є важливим етапом фармакологічних досліджень потенційних лікарських засобів на основі біологічно активних речовин лікарських рослин з метою встановлення безпечності їх застосування.

Для визначення гострої токсичності використовували методику доклінічного вивчення нешкідливості лікарських засобів [103]. Дослідження проведено в скороченому об'ємі, лише на одному виді тварин, оскільки надалі планується повне доклінічне вивчення.

За результатами проведених досліджень було встановлено, що внутрішньошлункове введення екстрактів п. європейського у дозі 5000 мг/кг не супроводжувалося загибеллю тварин. Загальний стан тварин та інші показники були задовільними, змін кольору сечі та калу не було, частота уринації та

дефекацій не змінювалася. Маса експериментальних тварин та тварин контрольної групи протягом експерименту планомірно зростала (табл. 4.16).

Таблиця 4.16

Зміна маси тіла експериментальних тварин після одноразового введення екстрактів підлісника європейського

Група тварин	Маса тіла білих мишей, г, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, n = 6			
	до початку експерименту	3 день	7 день	14 день
I	20,13 $\pm$ 0,10	20,58 $\pm$ 0,10	20,97 $\pm$ 0,06	21,80 $\pm$ 0,05
II	20,12 $\pm$ 0,10	20,53 $\pm$ 0,10	20,92 $\pm$ 0,08	21,75 $\pm$ 0,05
III	20,12 $\pm$ 0,10	20,50 $\pm$ 0,06	20,87 $\pm$ 0,05	21,70 $\pm$ 0,03
IV	20,12 $\pm$ 0,10	20,53 $\pm$ 0,06	20,80 $\pm$ 0,14	21,73 $\pm$ 0,05
V	19,95 $\pm$ 0,08	20,52 $\pm$ 0,08	20,92 $\pm$ 0,08	21,62 $\pm$ 0,08

Для підтвердження нетоксичності досліджуваних екстрактів проведено морфологічне дослідження внутрішніх органів мишей.

Встановлено, що в контрольних та досліджуваних тварин розміщення, розмір, будова, консистенція та колір внутрішніх органів були в межах норми. Введення екстрактів не впливало на відносну масу внутрішніх органів тварин (табл. 4.17).

Таблиця 4.17

Відносна маса внутрішніх органів мишей при одноразовому введенні екстрактів підлісника європейського

Група тварин	Маса внутрішніх органів, г, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, n = 6		
	Серце	Легені	Печінка
I	0,17 $\pm$ 0,006	0,23 $\pm$ 0,008	1,19 $\pm$ 0,006
II	0,18 $\pm$ 0,005	0,29 $\pm$ 0,005	1,18 $\pm$ 0,006
III	0,17 $\pm$ 0,010	0,28 $\pm$ 0,006	1,19 $\pm$ 0,008
IV	0,19 $\pm$ 0,008	0,28 $\pm$ 0,006	1,18 $\pm$ 0,005
V	0,17 $\pm$ 0,006	0,28 $\pm$ 0,006	1,17 $\pm$ 0,064

Показники досліджень деяких гематологічних та біохімічних показників дослідних тварин на 14 добу експерименту представлено в табл. 4.18.

Таблиця 4.18

Гематологічні та біохімічні показники крові мишей при одноразовому введенні екстрактів підлісника європейського

Група тварин	Досліджувані параметри, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, n = 6				
	Еритроцити, $\times 10^{12}/\text{л}$	Лейкоцити, $\times 10^{12}/\text{л}$	Гемоглобін, г/л-год	АлАТ, мкмоль/мл-год	АсАТ, мкмоль/мл-год
I	7,03 $\pm$ 0,145	3,15 $\pm$ 0,097	113,67 $\pm$ 1,288	0,32 $\pm$ 0,005	0,38 $\pm$ 0,010
II	7,00 $\pm$ 0,097	3,08 $\pm$ 0,097	113,83 $\pm$ 1,288	0,32 $\pm$ 0,005	0,37 $\pm$ 0,008
III	6,92 $\pm$ 0,193	3,03 $\pm$ 0,129	114,33 $\pm$ 1,288	0,33 $\pm$ 0,006	0,39 $\pm$ 0,008
IV	6,88 $\pm$ 0,193	3,10 $\pm$ 0,097	114,00 $\pm$ 1,288	0,32 $\pm$ 0,006	0,40 $\pm$ 0,006
V	6,98 $\pm$ 0,097	2,98 $\pm$ 0,064	113,67 $\pm$ 1,127	0,32 $\pm$ 0,006	0,41 $\pm$ 0,006

Результати гематологічних та біохімічних показників крові мишей при одноразовому введенні екстрактів п. європейського вказують, що екстракти з досліджуваної сировини не мають токсичного впливу на організм тварин. Досліджувані показники крові перебувають у межах контрольних тварин.

Для екстрактів з сировини п. європейського за LD₅₀ умовно прийняті максимально введені дози, оскільки вони не викликали загибелі тварин. Результати дослідження гострої токсичності рослинних екстрактів наведено в табл. 4.19.

Отже, внутрішньошлункове введення екстрактів ПЄ_{тр.}-В, ПЄ_{тр.}-70, ПЄ_{к.к.}-В, ПЄ_{к.к.}-70 в дозі 5000 мг/кг не призводить до загибелі тварин та змін в їх поведінці. Морфологічна будова внутрішніх органів досліджуваних тварин після введення залишалася без змін, гематологічні та деякі біохімічні показники крові знаходилися на рівні контрольних.

**Результати дослідження гострої токсичності екстрактів
підлісника європейського**

Сировина	Вид екстрагенту	Доза, мг/кг	Співвідношення кількості загиблих тварин і загальної кількості тварин у групі
Трава підлісника європейського	Вода очищена	5000	0/6
	70 % етанол	5000	0/6
Кореневища з коренями підлісника європейського	Вода очищена	5000	0/6
	70 % етанол	5000	0/6

Це вказує на відсутність токсичної дії екстрактів в даній дозі та дає можливість віднести їх до IV класу токсичності речовин з $LD_{50} = 500 - 5000$ мг/кг (малотоксичні) [103, 142].

4.4.2 Дослідження антимікробної активності екстрактів

Антибактеріальна терапія займає одне з провідних місць у клінічній медицині. При лікуванні інфекційних захворювань антибактеріальні препарати відіграють вирішальну роль. Застосування антимікробних засобів рослинного походження поряд із синтетичними препаратами, такими як антибіотики, фторхінолони, антисептики, обумовлене низькою токсичністю, можливістю тривалого застосування, більшою доступністю та здатністю до біодеградації. До переваг рослинних засобів відносять також відсутність розвитку дисбактеріозів та алергічних реакцій [143].

Дослідження антибактеріальної активності екстрактів із сировини п. європейського здійснено в бактеріологічній лабораторії лабораторного

відділу військової частини А4520 (м. Львів) методом дифузії активної речовини в агар із застосуванням паперових дисків.

Результати проведених досліджень представлені у табл. 4.20.

Таблиця 4.20

Антимікробна активність екстрактів підлісника європейського

№ з/п	Об'єкт дослідження	Зона затримки росту мікроорганізмів, мм, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, n = 3				
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 33420	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228
1.	ПЄ _{тр.} -В	12±0,38	11±0,34	10±0,36	11±0,37	12±0,38
2.	ПЄ _{тр.} -70	-	15±0,41	-	15±0,40	8±0,29
3.	ПЄ _{к.к.} -В	15±0,39	9±0,28	7±0,25	7±0,31	11±0,34
4.	ПЄ _{к.к.} -70	10±0,34	10±0,33	9±0,27	9±0,29	9±0,30

Результати проведених досліджень свідчать, що екстракти трави та кореневищ з коренями п. європейського затримують ріст паличкоподібної та кокоподібної мікрофлори. Екстракти ПЄ_{тр.}-В, ПЄ_{к.к.}-В, ПЄ_{к.к.}-70 виявляють бактеріостатичну активність проти всіх досліджуваних мікроорганізмів. Екстракт ПЄ_{тр.}-70 не проявляє активності щодо бактерій *Pseudomonas aeruginosa* та *Proteus vulgaris* [144].

4.4.3 Дослідження кровоспинної та ранозагоювальної дії екстрактів

Вивчення кровоспинної дії екстрактів з трави та кореневищ з коренями п. європейського було проведено на статевозрілих мурчаках, які були вирощені у віварію ІФНМУ та стандартизовані за фізіологічними та біохімічними показниками [145, 146].

Гемостатичні властивості досліджуваних екстрактів визначали за тривалістю кровотечі (за методом Дюке) після нанесення лінійної різаної рани тваринам та фіксували з використанням секундоміру. Результати дослідження представлені в табл. 4.21 [146].

Таблиця 4.21

Вплив екстрактів підлісника європейського на тривалість кровотечі

Група тварин, n=6	Тривалість кровотечі, (M ±m), с	Зменшення часу кровотечі, відносно контрольної групи, %	Зменшення часу кровотечі, відносно препарату порівняння, %
ПЄ _{тр.} -В	113,33±1,45 ^{*/**}	49,56	34,37
ПЄ _{тр.} -70	116,17±2,89 ^{*/**}	48,29	32,72
ПЄ _{к.к.} -В	179,50±2,42 [*]	20,11	-
ПЄ _{к.к.} -70	193,50±2,42 [*]	13,87	-
Препарат порівняння «Екстракт перцю водяного рідкий» (ПрАТ «Фітофарм»)	172,67±2,90	23,15	-
Контрольна група	224,67±4,45	-	-

Примітка: n – кількість тварин;

* – відхилення відносно контрольної групи, $P \leq 0,05$;

** – відхилення відносно препарату порівняння, $P \leq 0,05$.

Результати досліджень свідчать (табл. 4.21), що при місцевому застосуванні препарат порівняння «Екстракт перцю водяного рідкий» (ПрАТ «Фітофарм») зменшував час кровотечі на 23,15 % у порівнянні з контрольною групою тварин. При нанесенні екстрактів ПЄ_{тр.}-В, ПЄ_{тр.}-70 час кровотечі зменшувався на 49,56 % та 48,29 % відносно контрольної групи та на 34,37 % та

32,72 % відносно препарату порівняння відповідно, а екстрактів ПЄ_{к.к.}-В, ПЄ_{к.к.}-70 – 20,11 % і 13,87 % відносно контрольної групи відповідно.

Отже, можна зробити висновок про те, що при нанесенні екстрактів ПЄ_{тр.}-В, ПЄ_{тр.}-70 на рану зупинка кровотечі відбувалась у 1,52 та 1,48 рази швидше щодо препарату порівняння, а відносно контрольної групи – в 1,98 та 1,93 рази залежно від виду екстрагенту. Препарат порівняння «Водяного перцю екстракт» зменшував час кровотечі у 1,3 рази в порівнянні з контрольною групою. При нанесенні екстрактів ПЄ_{к.к.}-В, ПЄ_{к.к.}-70 гемостатична активність була меншою відносно препарату порівняння, а відносно контрольної групи тварин час кровотечі зменшувався в 1,25 та 1,16 рази. Результати дослідження вказують на наявність місцевої гемостатичної дії в екстрактах з трави п. європейського [138].

Вивчення ранозагоювальної дії екстрактів ПЄ_{тр.}-В, ПЄ_{тр.}-70 ПЄ_{к.к.}-В, ПЄ_{к.к.}-70 було проведено на статевозрілих мурчаках масою 300 – 400 г.

Впродовж 16 днів проводили планіметрію ран, оцінювали загальний стан тварин та швидкість загоєння рани. Динаміка перебігу ранового процесу представлена в табл. 4.22 та рис. 4.2.

Таблиця 4.22

Динаміка перебігу ранового процесу при застосуванні екстрактів з трави та кореневищ з коренями підлісника європейського

Група тварин	Кількість тварин	Площа загоєння рани, %							
		Доба							
		2	4	6	8	10	12	14	16
I	6	4,69	15,48	48,87	80,58	100	100	100	100
II	6	4,37	14,36	43,71	76,55	100	100	100	100
III	6	3,80	10,71	32,00	54,33	74,33	100	100	100
IV	6	3,83	10,04	31,02	53,39	68,16	95,47	100	100
V	6	5,33	17,34	39,63	80,69	98,76	100	100	100
VI	6	3,40	8,25	30,90	51,80	68,91	79,33	94,98	100

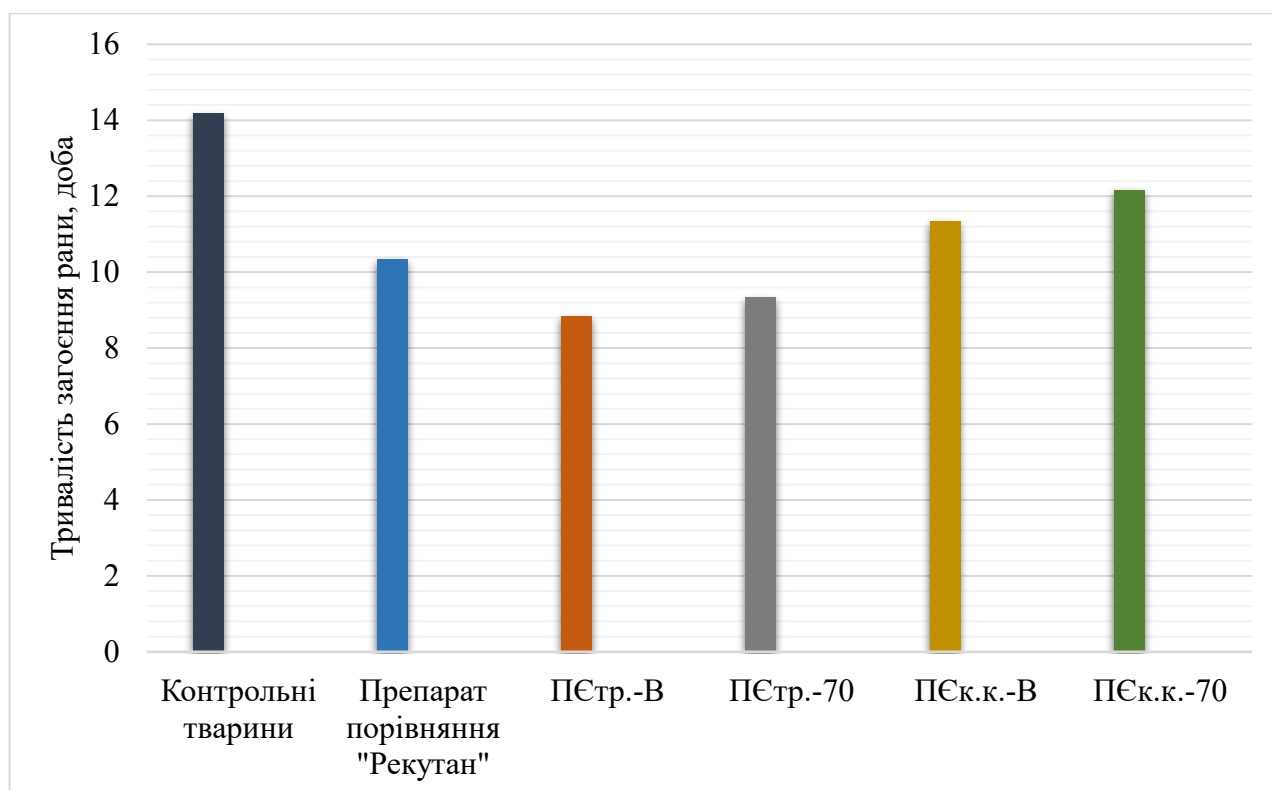


Рис. 4.2. Ранозагоювальна активність екстрактів п. європейського

Результати досліджень свідчать, що при застосуванні екстрактів ПЄ_{тр.}-В, ПЄ_{тр.}-70 спостерігається прискорення перебігу ранового процесу на 5,34 та 4,84 доби швидше в порівнянні з контрольною групою та 1,5 і 1,0 доби відносно препарату порівняння «Рекутан» (ТзОВ «Здоров'я»). При застосуванні екстрактів ПЄ_{к.к.}-В, ПЄ_{к.к.}-70 перебіг ранового процесу відбувалося на 2,83 та 2,01 доби швидше в порівнянні з контрольною групою, а відносно препарату порівняння загоєння відбувалося пізніше.

Отже, екстракти з трави п. європейського володіють ранозагоювальною активністю, позитивно впливають на рановий процес і є ефективними при лікуванні ран.

4.4.4 Дослідження протизапальної та антиексудативної активності екстрактів підлісника європейського

Вивчення протизапальної та антиексудативної активності екстрактів ПЄ_{тр.}-В, ПЄ_{тр.}-70, ПЄ_{к.к.}-В, ПЄ_{к.к.}-70 було проведено на білих нелінійних щурах,

які були вирощені у віварії ІФНМУ та стандартизовані за фізіологічними та біохімічними показниками.

Приріст об'єму лапи щура та антиексудативна активність екстрактів п. європейського наведені у табл. 4.23 та 4.24.

Таблиця 4.23

**Вплив екстрактів підлісника європейського на розвиток набряку
кінцівки щурів**

Група тварин	Досліджуваний препарат	Доза мг/кг	Приріст об'єму лапки щура, у.о., $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, n=6		
			1 год	3 год	5 год
I	ПЄ _{тр.} -В	100	9,26 ± 0,16*	27,46 ± 0,16*	29,73 ± 0,23*
II	ПЄ _{тр.} -70	100	9,03 ± 0,23*	27,52 ± 0,35*	31,56 ± 0,35*
III	ПЄ _{к.к.} -В	100	9,51 ± 0,18*	29,96 ± 0,18*	32,99 ± 0,25*
IV	ПЄ _{к.к.} -70	100	9,93 ± 0,29*	30,61 ± 0,29*	34,02 ± 0,24*
V	Кверцетин	5	9,42 ± 0,21*	27,56 ± 1,13*	33,07 ± 1,11*
VI	-	-	10,37 ± 0,63	37,60 ± 0,91	46,84 ± 1,01

Примітки: 1. * – відхилення показника вірогідне відносно до даних контрольної патології ($p \leq 0,05$); 2. n – кількість тварин у групі.

Таблиця 4.24

Антиексудативна активність екстрактів підлісника європейського

Група тварин	Досліджуваний препарат	Показник пригнічення запальної реакції, %		
		1 год	3 год	5 год
I	ПЄ _{тр.} -В	10,70	26,97	36,40
II	ПЄ _{тр.} -70	12,92	26,80	32,62
III	ПЄ _{к.к.} -В	8,29	20,31	29,56
IV	ПЄ _{к.к.} -70	4,24	18,59	27,40
V	Кверцетин	9,16	26,70	29,40

Результати дослідження (табл. 4.23 і 4.24) свідчать, що набряк лапи щура в експериментальних групах зростав протягом 3-х год з моменту введення флогогенного агенту, а в контрольній групі тварин, які не отримували лікування, набряк збільшувався протягом п'яти годин.

Максимальне пригнічення запалення лікованих тварин відмічали через 5 год, але антиексудативна активність відрізнялася в залежності від виду введеного препарату. Протинабрякову дію екстрактів та кверцетину (ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ») спостерігали вже через 1 год після початку лікування у порівнянні з тваринами контрольної групи.

Протягом п'яти годин експерименту найкращу активність виявили екстракти ПЄ_{тр.}-В та ПЄ_{тр.}-70. Так, у групі тварин, лікованих екстрактом ПЄ_{тр.}-В, спостерігали зменшення об'єму лапи щура відносно контрольної групи на 10,70 % протягом 1 год, на 26,97 % протягом 3 год та на 36,40% через 5 год після введення флогогенного агенту. У групі тварин, лікованих екстрактом ПЄ_{тр.}-70, спостерігали зменшення об'єму лапи щура відносно групи контрольної патології на 12,92 % протягом 1 год, на 26,80 % через 3 год і на 32,62 % через 5 год після введення флогогенного агенту.

Отримані результати вказують, що на 3 год експерименту антиексудативна дія екстрактів ПЄ_{тр.}-В та ПЄ_{тр.}-70 та препарату порівняння знаходиться на одному рівні. Проте, через 5 год антиексудативна активність препарату порівняння дещо знизилась у порівнянні з досліджуваними екстрактами.

Екстракти ПЄ_{к.к.}-В та ПЄ_{к.к.}-70 також виявляли антиексудативну дію в порівнянні з контрольною групою, але вона була дещо нижчою (екстракт ПЄ_{к.к.}-70) або прирівнювалась (екстракт ПЄ_{к.к.}-В) до дії кверцетину.

Отже, можна зробити висновок про те, що досліджувані екстракти трави п. європейського проявляють достатньо виражену протизапальну дію при карагеніновому набряку та не поступаються за своєю активністю препарату порівняння рослинного походження кверцетину.

Висновки до розділу 4

1. Визначено технологічні параметри сировини п. європейського та встановлено оптимальні умови одержання екстрактів. Вихід одержаних

екстрактів становив 21,57 % – 28,45 % залежно від природи екстрагенту та виду сировини.

2. Встановлено, що введення екстрактів з сировини п. європейського в дозі 5000 мг/кг маси тіла тварини не призводять до загибелі тварин, будова внутрішніх органів залишалася без змін, гематологічні та деякі біохімічні показники крові знаходилися на рівні контрольних. Це вказує на відсутність токсичної дії екстрактів в даній дозі та дає можливість віднести їх до IV класу токсичності речовин з $LD_{50} = 500 - 5000$ мг/кг (малотоксичні).

3. Досліджено, що екстракти з сировини п. європейського затримують ріст паличкоподібної та коккоподібної мікрофлори та виявляють бактеріостатичну активність щодо *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 33420, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

4. Досліджено, що при нанесенні екстрактів ПЄ_{тр.}-В та ПЄ_{тр.}-70 на рану зупинка кровотечі відбувалась у 1,52 та 1,48 рази швидше щодо препарату порівняння, а відносно контрольної групи – в 1,98 та 1,93 рази. Препарат порівняння «Екстракт перцю водяного рідкий» (ПрАТ «Фітофарм») зменшував час кровотечі у 1,3 рази в порівнянні з контрольною групою. Результати дослідження вказують на наявність місцевої гемостатичної дії у субстанціях з трави п. європейського. Спосіб одержання екстракту з трави п. європейського з кровоспинною дією захищеним патентом України на корисну модель 132069.

5. Встановлено, що при застосуванні екстрактів трави п. європейського ПЄ_{тр.}-В та ПЄ_{тр.}-70 спостерігається повне загоєння рани на 8 – 9 і 9 – 10 добу відповідно, препарату порівняння «Рекутан» (ТзОВ «Здоров'я») – на 10 – 11 добу, а в контрольній групі тварин – на 15 – 16 добу. Краща ранозагоювальна дія та динаміка перебігу ранового процесу спостерігалася при застосуванні екстракту ПЄ_{тр.}-В.

6. Встановлено, що досліджувані екстракти п. європейського проявляють протизапальну дію при карагеніновому набряку. Більш виражену

антиексудативну активність проявляє ПЄ_{тр.}-В, пригнічуючи запальну реакцію на 5 годину експерименту на 36,40 % (кверцетин – на 29,40 %).

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Дослідження антимікробної активності екстрактів підлісника європейського / Л. М. Грицик, Н. І. Легінь, А. Р. Грицик, В. О. Гондарук. *Український вісник психоневрології*. 2012. Т. 20, вип. 2 (71) додаток. С. 66 – 67.
2. Легінь Н. І., Грицик Л. М. Вивчення гострої токсичності екстрактів з трави підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.). *Фармаком.* – 2018. № 3. С. 46 – 49.
3. Пат. на корисну модель 132069 Україна, МПК (2018.01), А61К 9/00, А61К 36/23 (2006.01), А61Р 7/04 (2006.01). Спосіб одержання екстракту з трави підлісника європейського з кровоспинною дією / Л. М. Грицик, Н. І. Легінь, А. Р. Грицик. № u 2018 09017; заявл. 30.08.18 ; опубл. 11.02.19, Бюл. № 3.
4. Грицик Л. М., Легінь Н. І., Грицик А. Р. Одержання екстрактів підлісника європейського. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів*: мат. 5-ї наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 27 – 28 верес. 2013 р. Тернопіль : Укрмедкнига, 2013. С. 34 – 35.
5. Грицик Л. М., Легінь Н. І., Грицик А. Р. Дослідження гемостатичної активності екстрактів підлісника європейського. *Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії*: мат. I Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., 7 – 8 листоп. 2014 р. Х. : НФаУ, 2014. С. 56 – 57.

РОЗДІЛ 5

РЕСУРСО-БІОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА РОЗРОБКА НОРМАТИВНОЇ ДОКУМЕНТАЦІЇ НА СИРОВИНУ ПІДЛІСНИКА ЄВРОПЕЙСЬКОГО

5.1 Морфолого-анатомічне дослідження підлісника європейського та встановлення основних діагностичних ознак надземних та підземних органів

Впровадження у вітчизняну медичну практику нових видів лікарської рослинної сировини та продуктів їх переробки, розширення асортименту фітозасобів вимагає удосконалення системи стандартизації та контролю їх якості. Тому важливим етапом розробки методів контролю якості є морфолого-анатомічні дослідження сировини п. європейського, які дозволяють ідентифікувати ЛРС і встановити основні діагностичні ознаки.

Об'єктами дослідження були трава та кореневища з коренями п. європейського, заготовлені на території Івано-Франківської області впродовж 2011 – 2013 рр. в період масового цвітіння та відмирання надземної частини відповідно.

Макроскопічні ознаки. Трава. Цільні або частково здрібнені шматки стебел, листків, квітів (рис. 5.1). Стебло округле, голе, просте, до 3 мм у діаметрі. Листки довго- або короткочерешкові, пальчастороздільні, з 3 – 5 обернено яйцеподібними дво-, тринадрізаними пилчастими частками з зубцями, що закінчуються щетинкою. З верхнього боку листки темно-зеленого кольору, з нижнього – сіро-зеленого. Квітки дрібні, зібрані у 3 – 5-променевий зонтик, оточений обгорткою з ланцетних, зубчастих або перистороздільних листочків; пелюстки білі або блідо-рожеві, виїмчасті, з довгою увігнутою всередину верхівкою. Запах слабкий, специфічний.

Кореневище з коренями. Шматки кореневища циліндрично-веретеноподібної форми близько 4 см завдовжки, 1 – 2 см у діаметрі, тверде та малогалузисте, з великою кількістю бічних коренів (рис. 5.1). Поверхня від

темно-жовтого до жовтувато-коричневого кольору, зморшкувата, із залишками коренів. Злам нерівномірний, блідо-жовтуватою кольору. Бічні корені циліндричні, іноді спірально закручені, завдовжки до 7 см, діаметром 0,1 – 0,2 см, темно-коричневого кольору. Запах слабкий.



Рис. 5.1 Зовнішній вигляд висушеної сировини п. європейського: А – трава, Б – кореневища з коренями

Анатомічна будова

Стебло. Зовні стебло п. європейського вкрите однорядною епідермою. В паренхімі стебла лежить велика кількість судинно-волокнистих пучків у вигляді кільця. У флоемі судинно-волокнистих пучків чітко видно групи ситоподібних трубок, які щільно зосереджені в луб'яній паренхімі. Камбій складається з трьох-чотирьох шарів тонкостінних клітин. У ксилемі розташовані судини невеликими групами. Центральну частину стебла займає серцевина з великими тонкостінними клітинами.

Листкова пластинка. Листкова пластинка дорсивентральної будови. Під верхньою епідермою наявна одношарова гіподерма. Мезофіл листка неоднорідний, містить 2 – 3-рядну палісадну паренхіму, утворену щільно розташованими прозенхімними клітинами овальної форми. Клітини верхньої епідерми (рис. 5.2) дещо витягнуті у тангентальному напрямі, із хвилясто-виїмчастими тонкостінними оболонками. Вздовж жилок епідермальні клітини дрібні, прозенхімні, в окремих місцях їх оболонки потовщені вервичкоподібно. Продихи у верхній епідермі відсутні.

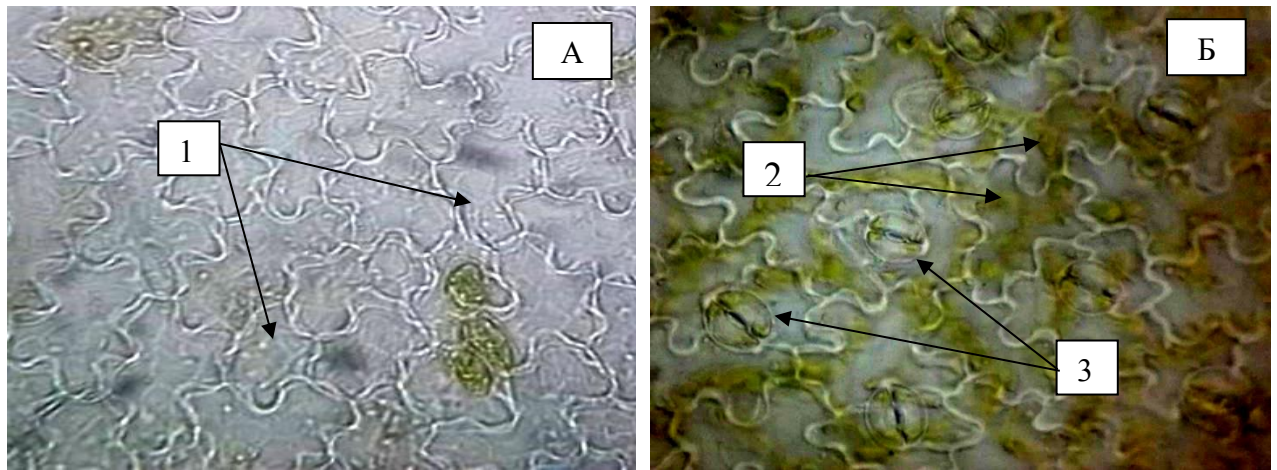


Рис. 5.2 Фрагмент анатомічної будови листка п. європейського: А – верхня епідерма, Б – нижня епідерма: 1 – клітини епідерми із хвилясто-виїмчастими тонкостінними оболонками; 2 – клітини епідерми зі звивистими оболонками; 3 – продиховий апарат анізоцитного типу

Клітини нижньої епідерми зі звивистими оболонками. Серед них зустрічаються численні продихи, які розташовані на одному рівні з іншими епідермальними клітинами або дещо занурені (рис. 5.2). Замикаючі клітини з потовщеними внутрішніми оболонками та вузькою щілиною, оточені трьома побічними клітинами, одна з яких менша або більша від двох інших (анізоцитний тип продихового апарату).

Черешок листка. Черешки листків на поперечному зрізі мають трикутну форму з невеликими виступами, вираженість яких збільшується з віком органу, а також у напрямку від базальної до верхівкової частини черешка. В середній частині черешка присутні п'ять судинно-волокнистих пучка, повернені ксилемою до центру. Клітини епідерми без потовщень, мозаїчно чергуються з клітинами, що мають вервичкоподібно потовщені оболонки. Місцями клітини епідерми вкриті складчастою кутикулою (рис. 5.3).

Кореневище. Кореневище має безпучковий тип будови. Клітини корку перидерми на поперечному зрізі у 2 рази більші від клітин корку бічного кореня. Серцевина складається із великих клітин округлої форми.

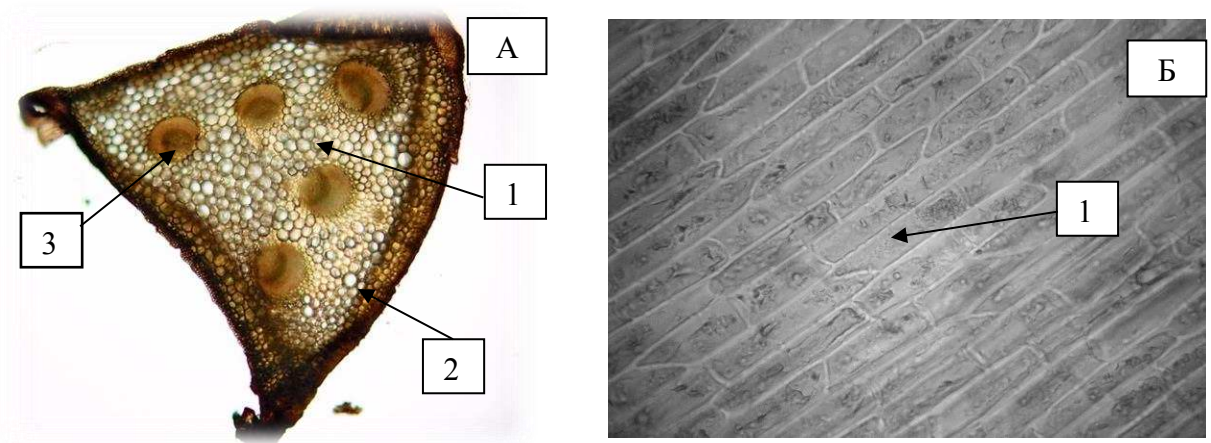


Рис. 5.3 Фрагмент анатомічної будови черешка листка п. європейського: А – поперечний зріз; Б – повздовжній зріз: 1 – клітини епідерми; 2 – міжклітинники; 3 – судинно-волокнисті пучки

Бічний корінь. Бічний корінь безпучкового типу будови (рис. 5.4). Субепідермальна коленхіма з нерівномірно-потовщеними оболонками клітин утворює 3 – 4-рядне суцільне кільце. Основна тканина утворена двома рядами дрібних клітин і 5 – 8 рядами товстостінних паренхімних клітин. У складі перидерми – 3 – 7 шарів тонкостінних, сплюснених, забарвлених в темно-коричневий колір клітин корку. У коровій частині та в ксилемі наявні промені механічних тканин, що розширюються в центробіжному напрямку.

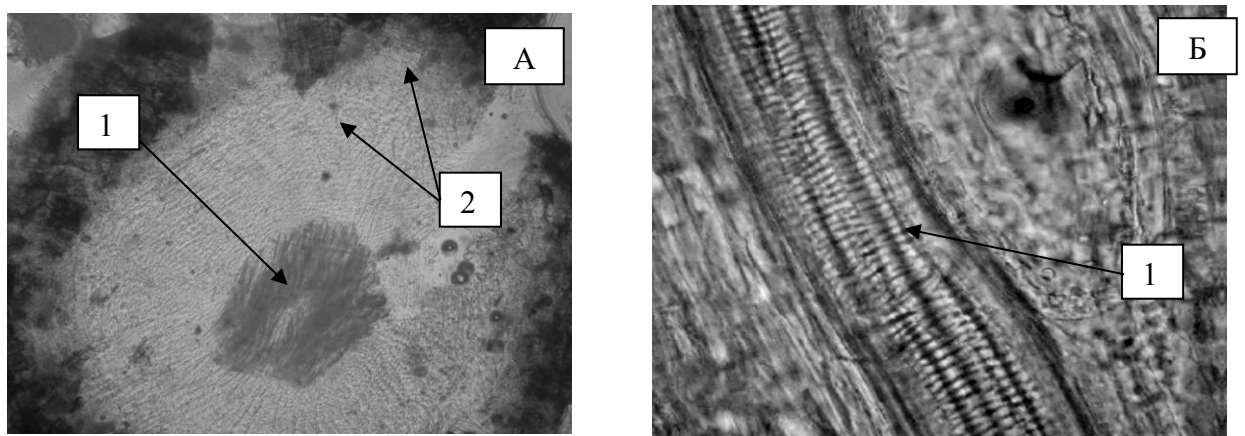


Рис. 5.4 Фрагмент анатомічної будови бічного кореня п. європейського: А – поперечний зріз, Б – повздовжній зріз: 1 – судини; 2 – друзи кальцію оксалату

Вони різні за довжиною та досить рівномірно чергуються з променями паренхіми. Судини сітчасті, рідше кільчасті. Серцевина в центральній частині циліндрична. Наявні друзи кальцію оксалату.

За результатами проведеного морфолого-анатомічного дослідження сировини п. європейського було встановлено, що основними морфологічними діагностичні ознаки є: стебло голе, просте, до 3 мм у діаметрі; листки довго- або короткочерешкові, пальчатороздільні, з 3 – 5 обернено яйцеподібними дво-, тринадрізними пилчастими частками з зубцями, що закінчуються щетинкою; пелюстки білі або блідо-рожеві. Кореневище циліндрично-веретеноподібної форми, тверде та малогалузисте, з великою кількістю бічних коренів, близько 4 см завдовжки та від 1 до 2 см завтовшки. Поверхня від темно-жовтого до жовтуватого-коричневого кольору, зморшкувата, із залишками коренів. Бічні корені циліндричні, іноді спіральні закручені, завдовжки до 7 см, діаметром 0,1 – 0,2 см, темно-коричневого кольору.

Встановлено, що мікроскопічними діагностичними ознаками надземних органів є: клітини верхньої епідерми листка паренхімні, дещо витягнуті у тангентальному напрямі, із хвилясто-виїмчастими тонкостінними оболонками; клітини нижньої епідерми зі звивистими оболонками; продихи зустрічаються на нижній стороні листка; продиховий комплекс анізоцитного типу. Кореневища та бічні корені мають безпучковий тип будови, центр кореневища займає серцевина, яка складається із великих клітин округлої форми, наявні друзи кальцію оксалату [115, 147 – 149].

5.2 Природні та антропогенні чинники поширення підлісника європейського

Особини *S. europaea* L. трапляються переважно поодинокі біля дерев *Populus nigra* L. та *Populus alba* L. (окружність стовбурів яких досягала 1,2 – 1,4 м), зімкнутість деревного ярусу – 0,5 – 0,7, підріст дерев представлений *Populus canadensis* Moench. і *Salix alba* L., чагарниковий ярус, зімкнутість якого

0,2 – 0,5, утворений *Crataegus monogyna* Jacq., *Cornus sanguinea* L., *Sambucus nigra* L., *Rubus caesius* L., трав'яний – *Circaea lutetiana* L., *Cephalanthera longifolia* (L.) Fritsch, *Lysimachia nummularia* L., *Urtica dioica* L. (рис. 5.5).



Рис. 5.5 *Sanicula europaea* L. в природних умовах зростання

За останні 40 років дослідженням в сфері регіональних екосистем в Україні приділяли дуже мало уваги. Єдиним на сьогодні детально опрацьованим до рівня геоботанічних районів і підрайонів лишається геоботанічне районування України 1977 року [138]. На загальній схемі районування (рис. 5.6) вказано місця зростання *S. europaea* L. на території Українських Карпат і Закарпатської низовини. *S. europaea* L. поширена в III окрузі Карпатському (Рахівсько-Турківський-Берегометський), а саме III 5а Передгір'янському підрайоні.

За результатами геоботанічного районування України (1977 р.) *S. europaea* L. зустрічається у помірно теплого поясі букових лісів та домінує на південно-західному макросхилі Українських Карпат. На північно-східному макросхилі п. європейський представлений обмежено – у нижчих ділянках Крайових і Дністерських Бескидів, а також на острівних низькогір'ях Передкарпаття. Пояс букових лісів у межах території представлений здебільшого угрупованнями *Fagion sylvaticae* з домішкою граба звичайного (*Carpinus betulus* L.), черешні дикої (*Prunus avium* L.), ясена звичайного (*Fraxinus excelsior* L.), клена-явора (*Acer pseudoplatanus* L.), ялиці білої (*Abies alba* Mill.), ялини європейської або смереки (*Picea abies* (L.) H. Karst.) та деяких інших видів. У травостані домінують п. європейський (*S. europaea* L.), підмаренник запашний (*Galium odoratum* (L.) Scop.), цирцея звичайна (*Circaea*

lutetiana L.), зубниця бульбаста (*Dentaria bulbifera* (L.) Crantz.), переліска багаторічна (*Mercurialis perennis* L.), копитняк європейський (*Asarum europaeum* L.), яглиця звичайна (*Aegopodium podagraria* L.), осока волосиста (*Carex pilosa* Scop.), ожика гайова (*Luzula luzuliodes* (Lam.) Dandy et Wilmont) та інші. Перевага *S. europaea* L. у складі лісових угруповань зберігається лише у невеликих масивах – на околицях с. Вигоди, с. Майдан, с. Вікторів, с. Вовчинці (на захід від Коломиї) (рис. 5.6).

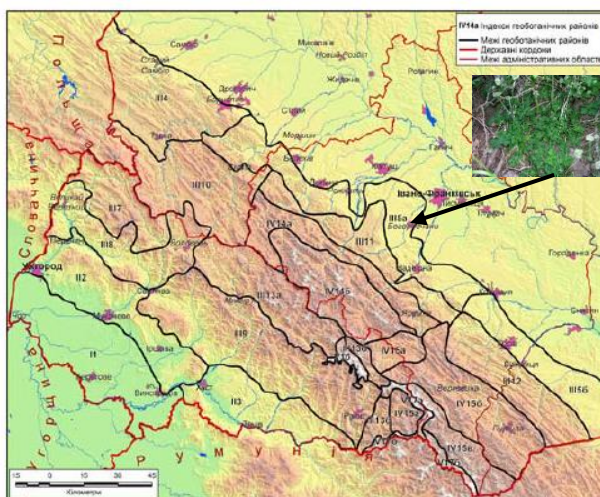


Рис. 5.6 Схема геоботанічного районування Українських Карпат та поширення *Sanicula europaea* L. (1977 р.): III Карпатський округ: III 5а Передгорганський підрайон

Для забезпечення сировиною запропонованого фармакологічного засобу нами встановлено місця зростання та визначено запаси надземних органів п. європейського на території Івано-Франківської та Чернівецької областей. Цілеспрямований пошук заростей п. європейського проводили, використовуючи дані геоботанічних досліджень, лісових господарств, географічні карти, прилад GARMIN GPS 12. Загальну площу виявлених масивів лікарських рослин визначали інструментальними методами, а в окремих випадках – візуально.

В процесі роботи використовували методичні матеріали щодо вивчення запасів лікарських рослин [111, 149 – 152].

Встановлені місця зростання п. європейського на території Івано-Франківської та Чернівецької областей представлені на рис. 5.7 та рис. 5.8.

П. європейський зростає на ґрунтах як багатих на азот, так і на відносно бідних. Зростає в угрупованнях разом з *Oxalis acetosella* L., *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott, *Dryopteris carthusiana* (Vill.) H. P. Fuchs, *Dryopteris austriaca* (Jacq.) Woyнар ex Schinz et Thell, *Phegopteris connectilis* (Michx.) Watt, *Mercurialis perennis* L., *Paris quadrifolia* L., *Gymnocarpium robertianum* (Hoffm.) Newm., *Asarum europaeum* L., *Asperula odorata* L., *Aegopodium podagraria* L., *Pulmonaria obscura* Dumort., *Polygonatum odoratum* (Mill.) Druce, *Viola odorata* L., *Caltha palustris* L., *Tussilago farfara* L., *Urtica dioica* L. тощо.

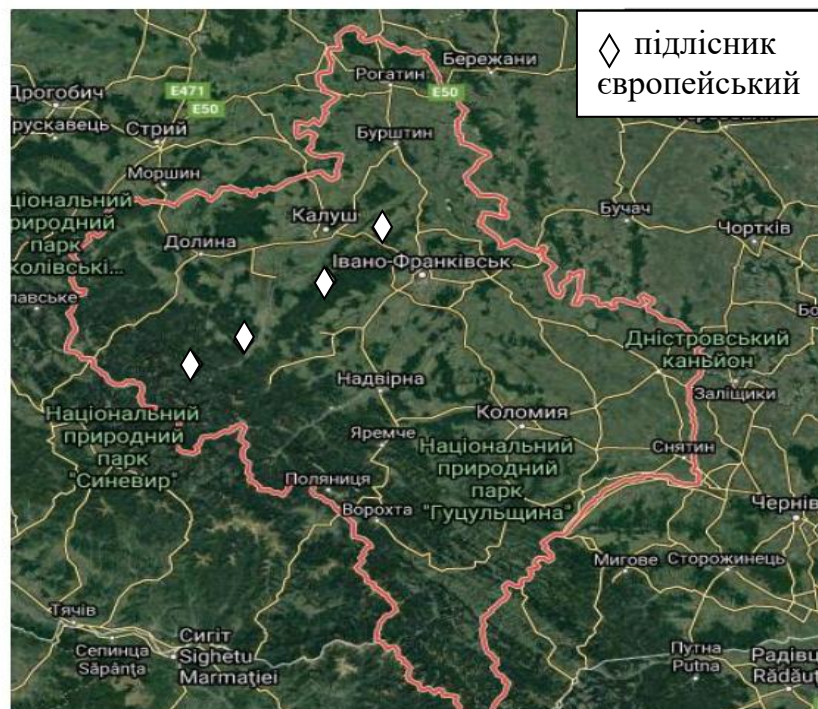


Рис. 5.7 Карта-схема місць зростання п. європейського на території Івано-Франківської області (2019 р.)

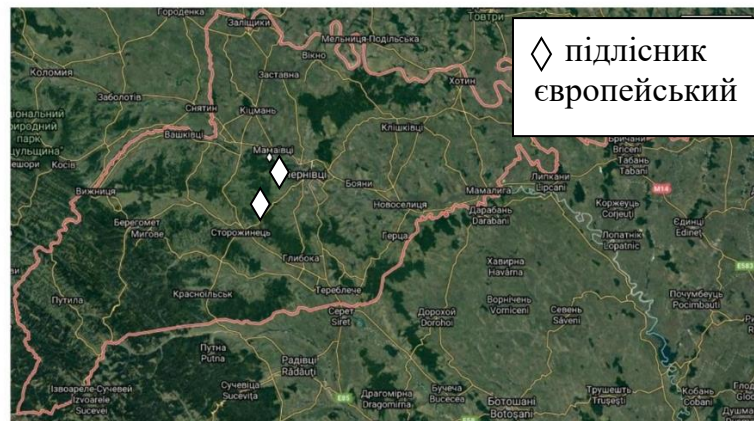


Рис. 5.8 Карта-схема місць зростання п. європейського на території Чернівецької області (2019 р.)

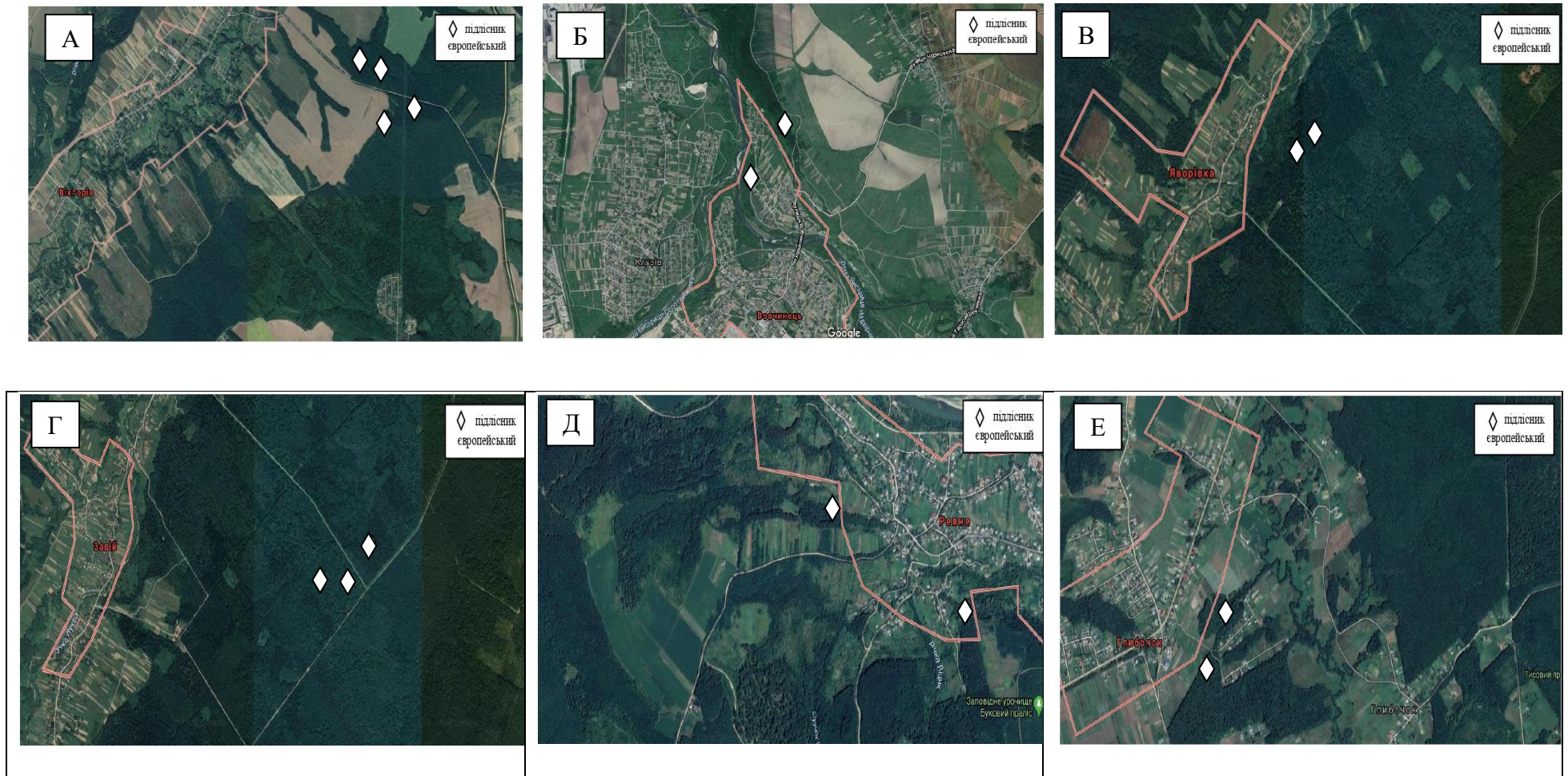


Рис. 5.9 Карта-схема місць зростання п. європейського: А – околиці с. Вікторів Івано-Франківської області, Б – околиці с. Вовчинці Івано-Франківської області, В – околиці с. Яворівка Івано-Франківської області, Г – околиці с. Завій Івано-Франківської області, Д – околиці с. Ревне Чернівецької області, Е – околиці с. Глибочок Чернівецької області

Таким чином, нами встановлено 6 місць зростання п. європейського на території Івано-Франківської та Чернівецької областей. Загальна площа заростей становить 3,5 га.

При визначенні урожайності встановлювали два параметри: загальну площу зарості (візуально прирівнювали до геометричної фігури) та загальну кількість зібраної якісної сировини (згідно з вимогами АНД). Визначення запасу надземної частини п. європейського проводили під час масової вегетації рослини. Усю зібрану сировину зважували та ділили на кількість ділянок, перераховуючи на суху сировину.

Для проведення перерахунку на повітряно-суху сировину використовували визначений експериментально коефіцієнт усушки трави (0,23).

Урожайність, біологічний запас сировини надземних органів п. європейського на досліджуваних ділянках наведені в табл. 5.1.

Таблиця 5.1

**Урожайність трави підлісника європейського
на досліджуваних ділянках**

Місце знаходження зарості	Площа ділянки, м ²	Урожайність, г/м ²	Біологічний запас, кг
Околиці с. Вікторів Івано-Франківської області	8000	2,47±0,78	19,76
Околиці с. Вовчинці Івано-Франківської області	7000	3,86± 0,31	27,02
Околиці с. Яворівка Івано-Франківської області	5000	1,68±0,36	8,40
Околиці с. Завій Івано-Франківської області	6000	1,38±0,26	8,28
Околиці с. Ревне Чернівецької області	5000	3,04±0,27	15,22
Околиці с. Глибочок Чернівецької області	4000	1,97±0,45	7,88

Результати дослідження вказують, що більшість виявлених нами популяцій *S. europaea* L. займають невелику площу, малочисельні, щільність рослин досить низька. За віковим станом представлені лише генеративні рослини, тобто не спостерігається природного відновлення популяцій. Кількість особин у популяціях значно залежить від вегетаційного періоду. Часто популяції п. європейського представлені поодинокими особинами, інколи – по кілька або невеликими групами. Урожайність п. європейського (в перерахунку на суху сировину) становить 1,38– 3,86 г/м², біологічний запас – від 7,88 до 27,02 кг.

Враховуючи вимоги належної практики культивування та вирощування лікарських рослин, та неможливістю заготівлі рослинної сировини в природних умовах, актуальним є проведення досліджень по вивченню умов культивування п. європейського.

5.3 Фенологічні спостереження за розвитком підлісника європейського

Фенологічні спостереження за рослинами п. європейського проводили за методикою І.Н. Бейдеман в природному фітоценозі (с. Вовчинці) та на дослідних ділянках лікарських рослин Івано-Франківського національного медичного університету в 3 – 10 - кратній повторності [153]. Спостереження проводили протягом 2012 – 2018 рр.

Враховуючи особливості онтогенезу п. європейського було визначено основні фази розвитку.

Початок весняного відростання надземної частини рослини починається в II декаді квітня (рис. 5.9).

Через 18 днів починалася фаза кущення. Повне відростання рослини спостерігалось в I декаді травня, яке характеризується активним ростом вегетативної частини до формування бутонів на верхівці квітконосного пагона. Початок цвітіння спостерігали в I декаді червня з моменту розпускання перших квітів на рослині (рис. 5.10).



Рис. 5.10 Підлісник європейський: фаза початок відростання

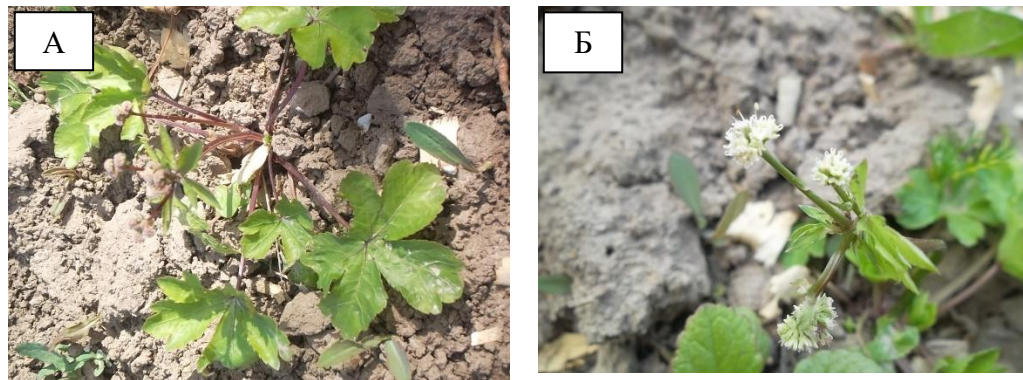


Рис. 5.11 Підлісник європейський на дослідних ділянках. Фаза цвітіння:
А – початок цвітіння, Б – масове цвітіння

Масове цвітіння визначали візуально, коли більша частина квітів розпустилася до 60 %. Кінець цвітіння спостерігали в II декаді липня, коли суцвіття складалося з добре сформованих двосім'янок. За термінами цвітіння п. європейський можна віднести до групи рослин літнього цвітіння. Фаза плодоношення наступала після фази воскового досягання насіння і тривала 29 днів. П. європейський перезимовує без зелених листків, інколи зберігається до снігу, але відмирає упродовж зими. За тривалістю вегетації п. європейський належить до рослин що довго вегетують з періодом повного індивідуального розвитку 120 – 150 днів (табл. 5.2).

Порівнюючи проходження всіх основних фаз вегетації п. європейського у природному фітоценозі та на дослідних ділянках у 2012 – 2018 рр., можна зробити висновок, що на дослідних ділянках вони настають раніше. Так, поява бутонів на дослідних ділянках настає на 15 днів раніше у порівнянні з

рослинами у природному фітоценозі, цвітіння настає на 12 днів раніше. Утворення плодів також проходить на 11 днів раніше, а повна стиглість насіння настає на 16 днів раніше. Середня тривалість дозрівання плодів на дослідних ділянках – 42 дні, у природному фітоценозі – 44 дні.

Таблиця 5.2

**Проходження фенофаз підлісником європейським у природних
фітоценозах та на дослідних ділянках**

Фенологічні фази	Роки спостереження							
	Природний фітоценоз				Дослідні ділянки			
	2012	2014	2016	2018	2012	2014	2016	2018
Весняне поновлення	03.05.	01.05.	13.05.	04.05.	19.04.	17.04.	21.04.	22.04.
Кущення	22.05.	20.05.	17.05.	23.05.	08.05.	01.05.	30.04.	10.05.
Бутонізація	13.06.	10.06	11.06.	15.06.	30.05.	29.05.	28.05.	31.05.
Цвітіння:								
<i>Початок</i>	26.06.	21.06.	19.06.	25.06.	12.06.	09.06.	04.06.	19.06.
<i>Масове</i>	09.07.	04.07.	30.06.	11.07.	25.06.	18.06.	14.06.	11.06.
<i>Кінець</i>	22.08.	16.08.	14.08.	24.08.	03.08.	01.08.	28.07.	24.08.
Плодоношення:								
<i>Початок</i>	27.08.	24.08	21.08.	25.08.	13.08.	10.08.	08.08.	13.08.
<i>Кінець</i>	08.10.	09.10.	04.10.	06.10	24.09.	21.09.	19.09.	22.09.

Проведені дослідження свідчать про незначні відмінності у фенології п. європейського в залежності від місця зростання рослини. В природних умовах у рослини спостерігалось настання усіх фенологічних фаз пізніше, ніж на дослідних ділянках.

У результаті проведених фенологічних спостережень встановлені оптимальні терміни заготівлі п. європейського червень – липень в період масового цвітіння рослини [154].

5.4 Культивування підлісника європейського в умовах Прикарпаття

Україна є основним центром промислових заготівель лікарської рослинної сировини, завдяки різноманіттю видового складу і великим запасам сировини дикорослих лікарських рослин. Внаслідок заготівель окремих видів цінних лікарських рослин, висушування боліт, зменшення площ природних лісів, луків і схилів, запаси сировини зменшуються. Однією з передумов використання лікарських рослин є введення їх в культуру [149 – 151]. Як серед традиційних, так і нових лікарських рослин важливе значення мають представники родини *Ariaceae* L.

Дослідження з культивування *S. europaea* L. проводили згідно з вимогами Настанови СТ-Н МОЗУ 42-4.5:2012 «Лікарські засоби. Належна практика культивування та збирання вихідної сировини рослинного походження» [152] за консультативної допомоги працівників Державного дендрологічного парку ім. З. Ю. Павлика Прикарпатського національного університету ім. В. Стефаника та доцента кафедри біології та екології Прикарпатського національного університету ім. В. Стефаника Шумської Н. В.

Облік, спостереження, аналіз і закладку досліду проводили за методикою Б.А. Доспехова [155]. Вивчення етапів розвитку і росту *S. europaea* L. проводили за методикою І.Н. Бейдемана [153].

Досліди проводили на колекційних ділянках відділу лікарських рослин у напрямку інтродукції та акліматизації лікарських рослин Державного дендрологічного парку ім. З. Ю. Павлика Прикарпатського національного університету ім. В. Стефаника. Для дослідження використовували посадковий матеріал та насіння п. європейського, який заготовляли в Івано-Франківській обл. у 2012 р.

При насінневому розмноженні насіння п. європейського висівали восени у відкритий ґрунт та ящики, заповнені вологою сумішшю із торфу і піску. Сходи спостерігали у квітні. Лабораторна схожість насіння п. європейського становила лише $35 \pm 2,3$ %, а польова – 20 ± 2 %. Проростання насіння надземне. Насіннєва шкірка розривається та показується корінець набухлого ендосперму. Епикотиль

відсутній, корінець ниткоподібний. Сім'ядольні листки виносяться на поверхню ґрунту гіпокотилем. Гіпокотиль витягнутий, 0,32 см. Сім'ядольні листки овальні, на довгих черешках, не м'ясисті, довжиною 0,47 см. Верхня сторона сім'ядольних листків інтенсивно-зелена, нижня сріблясто-зелена. Сім'ядолі вегетували 60 днів. У 70-ти денних проростків з'являється один справжній листок. У п'ятимісячному віці рослини мають 3 – 4 листки, які утворюють невелику розетку. Листки зелені як і черешок. З часом черешок збільшується у розмірах. Коренева система добре розвинена. Довжина кореня у 5-ти місячного сіянця 5,02 см, коричневого кольору.

Облік маси надземної частини розсади свідчить, що рослини, вирощені у лабораторних умовах, в 1,5 раза перевищували розсаду, вирощену на грядках.

При вегетативному розмноженні використовували живці з бруньками відновлення та живці з частиною кореневища, які висаджували в ящики, заповнені вологою сумішшю із торфу і піску (1:1), накриваючи поліетиленовою плівкою. За результатами дослідження встановлено, що найбільший відсоток вкорінення одержували з живців з бруньками відновлення (92 %), а при вкоріненні частиною кореневища отримали менший відсоток (45 %). Таким чином, розмноження п. європейського бруньками відновлення сприяє високому коефіцієнту розмноження рослини. Крім цього, рослини більш життєздатні й здорові, ніж при розмноженні стебловими зеленими живцями з кореневищем. При догляді необхідно враховувати поверхнєве розташування кореневої системи при рихленні ґрунту: відступати від рослини на 10 – 14 см, проводити рихлення не глибше 4 – 5 см.

Таким чином встановлено, що ефективнішим способом розмноження п. європейського є вегетативне розмноження живцями з бруньками відновлення. Оскільки при насінневому розмноженні схожість насіння становила лише 35 %, а при вегетативному розмноженні живцями з частиною кореневища вкорінення становило 92 %.

Дослідження з культивування п. європейського проводили на дослідних ділянках лікарських рослин Івано-Франківського національного медичного

університету протягом 2011 – 2014 рр., використовуючи вегетативний спосіб розмноження.

Живці з бруньками відновлення п. європейського висаджували безпосередньо у ґрунт на постійне місце зростання на дослідних ділянках.

Висаджування рослин у відкритий ґрунт здійснювали у два етапи: перший етап – весняний (травень), другий – підзимній (вересень).

Спочатку нарізали кореневі живці довжиною 8 – 10 см у вересні-жовтні, які брали з 3 річних маточних кущів і висаджували у парники або теплиці для одержання саджанців. Оптимальними строками висаджування у відкритий ґрунт є травень або у вересень – жовтень. Висаджують саджанці за схемою 70 × 25 см. Під час садіння кореневу шийку заглиблюють нижче поверхні ґрунту на 5 – 6 см, кожен саджанець поливають і загортають шаром ґрунту 3 – 5 см.

За весняного строку висаджування приживалось 60 % рослин. Рослини, висаджені восени, починали відростати лише наступної весни. У фазі цвітіння вони були в середньому на 5 – 10 см нижчі, ніж рослини весняного строку висаджування. Різниця у розвитку рослин на 2-й та 3-й роки вегетації не спостерігалось.

Відростання *S. europaеа* L. проходить за рахунок бруньок відновлення, розміщених на кореневищі. У 1-й рік формується розетка, із якої на 2-й рік розвиваються квітконосні суцвіття [154, 155].

Початок весняного відростання надземної частини *S. europaеа* L. починається в II декаді квітня. Через 18 днів починалася фаза кущення. Повне відростання рослини спостерігалось в I декаді травня, яка характеризувалася активним ростом вегетативної частини до формування бутонів на верхівці квітконосного пагона. Початок цвітіння спостерігали в I декаді червня з моменту розпускання перших квітів на рослині. Масове цвітіння визначали візуально, коли більша частина квітів розпустилася до 60 %. Кінець цвітіння спостерігали в II декаді липня, коли суцвіття складалось з добре сформованих двосім'янок. За термінами цвітіння *S. europaеа* L. можна віднести до групи рослин літнього цвітіння. Фаза плодоношення наступала після фази воскового досягання насіння і тривала 29 днів [154, 155].

Мінливість морфологічних ознак *S. europaеа* L. при висаджуванні у відкритий ґрунт представлено в табл. 5.3.

Таблиця 5.3

**Мінливість морфологічних ознак *Sanicula europaеа* L.
при висаджуванні у відкритий ґрунт**

Ознаки рослини	Середня величина, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, n=3	
	Періоди висаджування	
	весняний (травень)	підзимній (вересень)
<i>Прикореневі листки</i>		
Висота рослини, см	$41,3 \pm 0,65$	$36,3 \pm 0,45$
а) довжина пластинки, см	$3,7 \pm 0,02$	$3,33 \pm 0,04$
б) ширина пластинки, см	$6,7 \pm 0,043$	$5,7 \pm 0,03$
в) довжина черешка, см	$11,7 \pm 0,04$	$11 \pm 0,03$
г) загальне число листків на рослині	20 – 25	18 – 22
<i>Стеблові листки</i>		
а) довжина пластинки, см	$3,3 \pm 0,01$	$2,3 \pm 0,02$
б) ширина пластинки, см	$5,7 \pm 0,04$	$4,7 \pm 0,03$
в) загальна кількість листків на генеративному пагоні	2 – 4	2 – 3
Кількість квітконосів на рослині	3	2

Порівнюючи способи розмноження *S. europaеа* L., можна зробити висновок, що висаджені весною рослини починають відростати цього ж року, вони повністю сформовані, на другий рік дають плоди. Рослини ж висаджені восени, починають відростати лише з наступної весни, низькі, повністю не сформовані, починають плодоносити, в основному, на третій рік.

Встановлено, що для п. європейського сезонні ритми розвитку відповідають річним змінам клімату. Культивовані рослини проходять повний життєвий цикл, дають насіння, стійкі до хвороб і шкідників [156, 157].

Таким чином, технологія вирощування п. європейського вегетативним способом при весняному висаджуванні є більш енергоощадливою, дозволяє суттєво зменшити витрати на боротьбу з бур'янами в посівах, а також отримати високоякісну сировину уже на другий рік вирощування. Проведені дослідження вказують на можливість культивування п. європейського з метою розширення сировинної бази [154].

5.5 Числові показники доброякісності рослинної сировини. Розробка проєктів нормативної документації на рослинну сировину

Фітопрепарати підлягають обов'язковій стандартизації, мета якої гарантувати їх максимальну безпеку та високу якість на всіх етапах застосування. Стандартизація лікарської рослинної сировини передбачає обґрунтований вибір показників і критеріїв якості [158, 159].

Нами визначено числові показники доброякісності трави п. європейського, яку заготовляли під час масового цвітіння Івано-Франківській та Чернівецькій областях.

З метою встановлення доброякісності рослинної сировини визначали втрату в масі при висушуванні, вміст загальної золи, сторонні домішки. Також проводили ідентифікацію та визначення вмісту суми поліфенолів. Визначення досліджуваних параметрів проводили за методиками ДФУ 2.0 [55].

Дані товарознавчого аналізу трави п. європейського наведено в табл. 5.4.

За результатами дослідження (табл. 5.4) культивована сировина за вмістом суми поліфенолів не поступається дикорослій сировині, заготовленої з різних місць зростання в Івано-Франківській та Чернівецькій областях.

Проведений товарознавчий аналіз трави п. європейського, заготовленої з різних місць зростання показав, що вміст суми поліфенолів в досліджуваних зразках знаходиться в межах 8,92 – 10,14 %, втрата в масі при висушуванні – 6,64 – 7,14 %, загальна зола – 9,49 – 9,94 %, сторонні домішки – 1,54 – 1,71 %.

Числові показники доброякісності трави підлісника європейського

Місце заготівлі	Значення показника, %, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, n = 3			
	Сума поліфенолів	Втрата в масі при висушуванні	Загальна зола	Сторонні домішки
Івано-Франківська область, Тисменицький район, околиці с. Вовчинці	10,14 ±0,03	6,78 ±0,28	9,86 ±0,13	1,54 ±0,07
Івано-Франківська область, Галицький район, околиці с. Вікторів	10,10 ±0,02	7,14 ±0,34	9,94 ±0,11	1,68 ±0,08
Івано-Франківська область, Калуський район, околиці с. Завій	10,02 ±0,04	7,09 ±0,29	9,49 ±0,12	1,63 ±0,06
Івано-Франківська область, Калуський район, околиці с. Яворівка	9,73 ±0,02	6,89 ±0,22	9,67 ±0,12	1,71 ±0,08
Культивована сировина, Навчально-дослідні ділянки лікарських рослин ІФНМУ	8,95 ±0,04	6,78 ±0,20	9,66 ±0,14	1,60 ±0,07
Чернівецька область, Сторожинецький район, околиці с. Глибочок	9,53 ±0,07	6,64 ±0,22	9,78 ±0,15	1,67 ±0,08
Чернівецька область, Кіцманський район, околиці с. Ревне	8,92 ±0,05	6,73 ±0,24	9,63 ±0,11	1,58 ±0,05

На основі проведених досліджень нами запропоновано показники доброякісності трави п. європейського, які включено до проєкту МКЯ «Підлісника європейського трава».

ПІДЛІСНИКА ЄВРОПЕЙСЬКОГО ТРАВА

Sanicula europaea herba

Різана або частково здрібнена, висушена трава *S. europaea* L.

Вміст: не менше 8 % суми поліфенолів, у перерахунку на пірогалол ($C_6H_6O_3$; *М.м.* 126,1) і суху речовину.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

А. Цілі або частково здрібнені шматки стебел, листків, квітів. Стебло голе, просте до 3 мм у діаметрі. Листки довго- або короткочерешкові, пальчатороздільні, з 3 – 5 обернено яйцеподібними дво-, тринадрізними пилчастими частками з зубцями, що закінчуються зубчиком. З верхнього боку листки темно-зеленого кольору, з нижнього – сіро-зеленого. Квітки дрібні, зібрані у 3 – 5-променеви́й зонтик, оточений обгорткою з ланцетних, зубчастих або перистороздільних листочків; пелюстки білі або блідо-рожеві, виїмчасті, з довгою увігнутою всередину верхівкою. Запах слабкий, специфічний.

В. Сировину подрібнюють на порошок (2.9.12). Порошок зеленого або сірувато-зеленого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи *хлоральгідрату розчин Р*. У порошку виявляються: фрагменти верхньої епідерми із хвилясто-виїмчастими тонкостінними оболонками; фрагменти нижньої епідерми із клітинами зі звивистими оболонками та численними продиховими апаратами анізоцитного типу (2.8.3); фрагменти стебла з групами волокон, судин і фрагментів паренхіми; фрагменти клітин черешка з вервичкопотовщеними оболонками й складчастою кутикулою.

С. Тонкошарова хроматографія (2.2.27).

Випробовуваний розчин. До 0,5 г здрібненої в порошок сировини додавали 5 мл метанолу, нагрівали на водяному нагрівнику зі зворотним холодильником при температурі 60 °С протягом 10 хв, охолоджували й фільтрували.

Розчин порівняння. 5,0 мг розмаринової кислоти *Р*, 1,0 мг хлорогенової кислоти *Р* і 2,5 мг апігеніну *Р* розчиняли у 10 мл метанолу *Р*.

Пластинка: ТШХ-пластинка із шаром силікагелю *Р*.

Рухома фаза: мурашина кислота *Р* – вода *Р* – етилацетат *Р* (6:6:90).

Об'єм проб: 10 мкл (або 2 мкл), смугами 15 мм (або 8 мм).

Відстань, що має пройти рухома фаза: 15 см від лінії старту.

Висушування: на повітрі.

Виявлення: нагрівали при температурі 100 °С протягом 5 хв, гарячу пластинку обприскували розчином 5 г/л дифенілборної кислоти аміноетилового етеру *Р* в етилацетаті *Р* і переглядали в УФ-світлі при довжині хвилі 365 нм.

Результати: на хроматограмі випробовуваного розчину виявлялися: у нижній частині – жовтувато-коричнева флуоресцентна зона, що відповідає глікозидам апігеніну, у середній частині – блакитна флуоресцентна зона, що відповідає хлорогеновій кислоті, у верхній частині – блакитна флуоресцентна зона, що відповідає розмариновій кислоті на хроматограмі розчину порівняння. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть проявлятися також інші флуоресцентні зони.

ВИПРОБУВАННЯ

Втрата в масі при висушуванні. Не більше 10,0 %.

Загальна зола. Не більше 10,0 %.

Сторонні домішки. Не більше 2,0 %.

Мікробіологічна чистота.

10 г подрібненої сировини гомогенізують із 90 мл стерильного буферного розчину із натрію хлоридом і пептоном рН 7,0 з додаванням 5,0 мл стерильного твіну-80, підігрітого до температури 40 °С. Ретельно перемішують протягом 10 хвилин та доводять до об'єму 100 мл у підходящому мірному посуді (розведення № 1).

1 мл розведення № 1 розбавляють 9 мл буферного розчину із натрію хлоридом і пептоном рН 7,0 (розведення № 2) і 1 мл розведення № 2 висівають у 9 мл рідкого живильного середовища № 3 (середовище збагачення для бактерій *Enterobacteriaceae*).

1 мл розведення № 2 розбавляють 9 мл буферного розчину із натрію хлоридом і пептоном рН 7,0 (розведення № 3) і 1 мл розведення № 3 висівають у 9 мл рідкого живильного середовища № 3 (середовище збагачення для бактерій роду *Enterobacteriaceae*, поміщають у термостат при 37 °С на 18 – 24 години. Через 24 години проводять попередній перегляд. При візуальній відсутності росту витримування проб у термостаті продовжують ще на 24 години.

Через 24 години проводять висівання на густе живильне середовище № 4 (агар Ендо).

Інкубацію проводять при 37 °С протягом 18 – 24 годин.

Паралельно проводять висівання для визначення загального мікробного числа, пліснявих грибів та дріжджів.

1 мл розведення № 1 висівають на кожну з п'яти чашок Петрі з густим живильним середовищем № 1 (м'ясо-пептонний агар), для визначення загального мікробного числа та 1 мл розведення № 1 висівають на кожну з двох чашок Петрі з густим живильним середовищем № 2 (агар Сабуро), для визначення пліснявих грибів та дріжджів.

Інкубацію проводять при 30 °С протягом 5 діб (попередній перегляд проводять через 72 години).

Остаточне підрахування колонієутворюючих одиниць проводять через 5 діб. При підрахуванні враховується ступінь розведення.

У сировині допускається загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів не більше 104; бактерій не більше 102; не більше 101 *Esheria coli* у 1 грамі.

Примітка. Висівання на густі живильні середовища проводять методом глибинного висівання. Висівання на рідкі живильні середовища проводять прямим методом.

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ.

Випробовуваний розчин. 0,5 г здрібненої в порошок сировини поміщали в у круглодонну колбу місткістю 250 мл, додавали 150 мл води очищеної та нагрівали на водяному нагрівнику зі зворотним холодильником протягом 30 хв. Охолоджували під проточною водою та кількісно переносили у мірну колбу місткістю 250 мл. Круглодонну колбу обполіскували водою очищеною, промивні води переносили в мірну колбу і доводили об'єм розчину водою очищеною до 250 мл. Відстоювали та фільтрували через фільтрувальний папір діаметром 125 мм. Перші 50 мл фільтрату відкидали розчин А).

Розчин порівняння (а). 5 мл розчину А доводили водою очищеною Р до об'єму 25 мл. До 2 мл одержаного розчину додавали 1 мл фосфорномолібденово-вольфрамового реактиву Р і 10 мл води очищеної Р та доводили розчином натрію карбонату Р (290 г/л) до об'єму 25 мл. Через 30 хв вимірювали оптичну

густину розчину при довжині хвилі 760 нм (A_1), використовуючи як компенсаційний розчин *воду очищену Р*.

Розчин порівняння (b). Безпосередньо перед випробуванням 50,0 мг *пірогалолу Р* розчиняли у *воді очищеній Р* і доводили об'єм розчину тим самим розчинником до 100 мл. 5 мл одержаного розчину доводили *водою очищеною Р* до об'єму 100 мл.

Суміш 2 мл одержаного розчину, 1 мл *фосфорномолібденово-вольфрамового реактиву Р* і 10 мл *води очищеної Р* доводили розчином 290 г/л *натрію карбонату Р* до об'єму 25 мл. Через 30 хв вимірювали оптичну густину (2.2.25) розчину при довжині хвилі 760 нм (A_0), використовуючи як компенсаційний розчин *воду очищену Р*.

Вміст суми поліфенолів (X , %), у перерахунку на *пірогалол*, у відсотках, обчислювали за формулою:

$$X = \frac{62,5 \times A_1 \times m_2}{A_0 \times m_1},$$

де: m_1 – маса наважки досліджуваної сировини, мг;

m_2 – маса наважки *пірогалолу*, мг;

A_1 – оптична густина досліджуваного розчину;

A_0 – оптична густина розчину порівняння.

Одним з нормативних документів на лікарську рослинну сировину є Інструкція з заготівлі та сушіння рослинної сировини. Нами опрацьовано правила заготівлі, сушіння, зберігання трави п. європейського, які включено в проєкт «Інструкції із заготівлі та сушіння трави підлісника європейського», що дозволяє заготовляти рослинну сировину з дикорослих та культивованих видів.

Сировиною п. європейського є трава (*Herba S. europaea* L.), яку заготовляють під час цвітіння, зрізаючи серпами або секаторами заввишки до 20 см. Заготівлю проводять при сухій погоді, після того, як зійде роса. Заготівлю сировини можна проводити протягом 15 – 20 днів. Зібрану сировину сортують, видаляючи пожовклі листки, складають в мішки та негайно відправляють на висушування, тому що сировина в мішках зігрівається і при висушуванні темніє.

Сушать сировину в затінку на повітрі або в приміщенні, яке добре провітрюється, розкладаючи тонким шаром на піддоні, тканині чи папері. Штучне сушіння проводять при температурі не вище 40 – 60 °С. Сушіння припиняють, коли стебла та черешки стають ламкими. Під час сушіння траву рекомендується часто перевертати, щоб не допустити розмноження пліснявого грибка, оскільки в цьому випадку вона стане непридатною для застосування. Вихід повітряно-сухої сировини 23 %.

Важливим етапом заготівлі лікарської рослинної сировини є морфологічні дослідження, які дозволяють ідентифікувати лікарську рослинну сировину. Особливо важливим є вивчення біологічно близьких видів, виявлення основних відмінностей між ними та встановлення анатомічних діагностичних ознак сировини кожного виду.

До таких біологічно близьких видів належать п. європейський та астранція велика родини Селерові. Нами проведено порівняльне морфолого-анатомічне дослідження трави *S. europaea* L. і трави *Astrantia major* L. Порівняльна морфологічна характеристика наведена в табл. 5.5.

За результатами проведеного морфологічного дослідження (табл. 5.5) встановлено основні спільні та відмітні діагностичні ознаки. Відмітними морфологічними ознаками є висота стебла, будова листової пластинки, форма суцвіття та забарвлення пелюсток квітів.

Таблиця 5.5

**Порівняльна морфологічна характеристика підлісника
європейського та астранції великої**

Діагностичні ознаки	Підлісник європейський	Астранція велика
1	2	3
Стебло	Просте, 20 – 50 см заввишки	Розгалужене, до 70 см заввишки
Листки	Довгочерешкові, пальчасто-роздільні, з 3 – 5 обернено-яйцеподібними частками	Глибокопальчасторозділені з видовженообернено-яйцеподібними частками

1	2	3
Квітки, суцвіття	Квітки дрібні, 5-пелюсткові у головчастих суцвіттях, зібраних у 3 – 5-променеий зонтик, оточений обгорткою з ланцетних, зубчастих або перистороздільних листочків. Пелюстки рожево-білі, виймчасті, з довгою увігнутою всередину верхівкою	Суцвіття – зонтики 3,4 – 4,5 см у діаметрі; оточені білувато-рожевою обгорткою з великих видовжено ланцетних, іноді коротко зубчастих листків, які перевищують квітки; у зонтику внутрішні квітки двостатеві, зовнішні – чоловічі

Морфологічні ознаки трави п. європейського й астранції великої використані при розробці проєктів МКЯ на сировину кожного виду та інструкції із заготівлі та сушіння ЛРС [160].

Таким чином, нами запропоновано показники доброякісності для трави *S. europaеа* L., які включені до проєкту МКЯ «Підлісника європейського трава» та «Інструкція із заготівлі та сушінні трави підлісника європейського».

5.6. Визначення термінів придатності сировини

З метою встановлення терміну придатності трави п. європейського проведено дослідження змін показників доброякісності сировини та вмісту суми поліфенолів в процесі зберігання сировини.

Зразки сировини зберігали в сухому приміщенні (температура 15 – 25 °С, вологість 60 – 80 %) впродовж 2014 – 2018 рр. (залежно від року заготівлі сировини) і проводили товарознавчий аналіз кожні 6 місяців (табл. 5.6).

Результати досліджень, наведені в табл. 5.6, свідчать, що протягом терміну зберігання (від 2 до 3,5 років) числові показники та кількісний вміст суми поліфенолів у траві п. європейського суттєво не змінюється. Це дозволяє встановити термін придатності для трави *S. europaеа* L. до двох років.

Таблиця 5.6

Результати аналізу показників якості трави підлісника європейського в процесі зберігання

Місце і рік заготівлі	Опис	Ідентичність	Втрата в масі при висушуванні, %	Кількісний вміст суми поліфенолів, %	Термін придатності, міс	Висновки про зберігання
1	2	3	4	5	6	7
Вимоги проєкту АНД	Цілі або частково здрібнені шматки стебел, листків, квітів. Стебло голе, просте. Листки довго- або короткочерешкові, пальчасто-роздільні, дво, три-надрізнаними пилчастими частками з зубцями, що закінчуються зубчиком. З верхнього боку листки темно-зеленого кольору, з нижнього – сіро-зеленого. Квітки дрібні, зібрані у променевиї зонтик, оточений обгорткою з ланцетних, зубчастих або перистороздільних листочків; пелюстки білі або блідо-рожеві, виїмчасті, з довгою увігнутою всередину верхівкою.	Мікроскопія	<10,0	>8,0	36	
Івано-Франківська обл., Тисменицький р-н, околиці с. Вовчинці, 2015 р.	Відповідний	Позитивна	6,78	10,14	–	Придатна
	Відповідний	Позитивна	6,75	10,12	6	Придатна
	Відповідний	Позитивна	6,71	10,11	12	Придатна
	Відповідний	Позитивна	6,77	10,09	18	Придатна
	Відповідний	Позитивна	6,79	10,07	24	Придатна
	Відповідний	Позитивна	6,74	9,95	30	Придатна
	Відповідний	Позитивна	6,69	9,92	36	Придатна

Продовж. табл. 5.6

1	2	3	4	5	6	7
Івано-Франківська обл., Галицький р-н, околиці с. Вікторів, 2014 р.	Відповідний	Позитивна	7,14	10,10	-	Придатна
	Відповідний	Позитивна	7,11	10,04	6	Придатна
	Відповідний	Позитивна	7,09	10,04	12	Придатна
	Відповідний	Позитивна	7,12	10,02	18	Придатна
	Відповідний	Позитивна	7,13	9,97	24	Придатна
	Відповідний	Позитивна	7,09	9,96	30	Придатна
	Відповідний	Позитивна	7,07	9,83	36	Придатна
	Відповідний	Позитивна	7,10	9,76	42	Придатна
Івано-Франківська обл., Калуський р-н, околиці с. Завій, 2015 р.	Відповідний	Позитивна	7,09	10,02	-	Придатна
	Відповідний	Позитивна	7,08	9,91	6	Придатна
	Відповідний	Позитивна	7,11	9,88	12	Придатна
	Відповідний	Позитивна	7,10	9,88	18	Придатна
	Відповідний	Позитивна	7,07	9,81	24	Придатна
	Відповідний	Позитивна	7,04	9,76	30	Придатна
	Відповідний	Позитивна	7,04	9,69	36	Придатна
Івано-Франківська обл., Калуський р-н, околиці с. Яворівка, 2016 р.	Відповідний	Позитивна	6,89	9,73	-	Придатна
	Відповідний	Позитивна	6,91	9,71	6	Придатна
	Відповідний	Позитивна	6,88	9,68	12	Придатна
	Відповідний	Позитивна	6,84	9,62	18	Придатна
	Відповідний	Позитивна	6,83	9,56	24	Придатна
Чернівецька обл., Сторожинецький р-н, околиці с. Глибочок, 2016 р.	Відповідний	Позитивна	6,64	9,53	-	Придатна
	Відповідний	Позитивна	6,64	9,49	6	Придатна
	Відповідний	Позитивна	6,58	9,44	12	Придатна
	Відповідний	Позитивна	6,54	9,39	18	Придатна
	Відповідний	Позитивна	6,55	9,18	24	Придатна

Продовж. табл. 5.6

1	2	3	4	5	6	7
Чернівецька обл., Кіцманський р-н, околиці с. Ревне, 2016 р.	Відповідний	Позитивна	6,73	9,44	-	Придатна
	Відповідний	Позитивна	6,72	9,40	6	Придатна
	Відповідний	Позитивна	6,74	9,35	12	Придатна
	Відповідний	Позитивна	6,71	9,29	18	Придатна
	Відповідний	Позитивна	6,65	9,17	24	Придатна
Навчально-дослідні ділянки лікарських рослин ІФНМУ 2014 р.	Відповідний	Позитивна	6,81	8,92	-	Придатна
	Відповідний	Позитивна	6,79	8,88	6	Придатна
	Відповідний	Позитивна	6,74	8,83	12	Придатна
	Відповідний	Позитивна	6,76	8,75	18	Придатна
	Відповідний	Позитивна	6,72	8,64	24	Придатна
	Відповідний	Позитивна	6,65	8,57	30	Придатна
	Відповідний	Позитивна	6,65	8,39	36	Придатна
	Відповідний	Позитивна	6,61	8,02	42	Придатна

Висновки до розділу 5

1. Проведено морфолого-анатомічне дослідження п. європейського та встановлено, що діагностичними морфологічними ознаками є висота стебла, форма листової пластинки, будова та колір суцвіття, довжина, форма та колір кореневищ з коренями; діагностичними анатомічними ознаками є: форма клітин верхнього та нижнього епідермісу листка, продихи анізоцитного типу присутні тільки на нижньому епідермісі листка, безпучковий тип будови кореневищ з коренями. Одержані дані використані для розробки проєкту МКЯ на дану рослинну сировину.

2. Встановлено місця зростання п. європейського в Івано-Франківській та Чернівецькій областях. Досліджено, що більшість відомих популяцій *S. europaea* L. займають невелику площу, нечисленні, щільність рослин досить низька.

3. Проведено фенологічні спостереження за розвитком п. європейського. Вивчено умови культивування досліджуваної рослини в ґрунтово-кліматичних умовах Прикарпаття.

4. Встановлені числові показники для оцінки доброякісності сировини. У траві вміст суми поліфенолів не менше 8,0 %, втрата в масі при висушуванні – не більше 10 %, золи загальної – не більше 10 %, сторонніх домішок – не більше 2,0 %. На основі дослідження показників доброякісності 5 серій сировини, їх змін в процесі зберігання встановлено, що термін придатності сировини є 2 роки.

5. За результатами фітохімічного та морфолого-анатомічного аналізу розроблено проєкти МКЯ «Підлісника європейського трава» та «Інструкції із заготівлі та сушіння трави підлісника європейського».

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Ідентифікація видів роду *Sanicula* L. і *Astrantia* L. родини *Apiaceae* L. / Л. М. Грицик, Н. І. Легінь, Т. І. Коляджин, А. Р. Грицик. *Український вісник психоневрології*. 2013. Т. 21, вип. 2 (75) додаток. С. 7 – 78.
2. Морфолого-анатомічне дослідження підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) / Л. М. Грицик, Н. І. Легінь, А. Р. Грицик, М. В. Мельник. *Фармацевтичний журнал*. 2014. № 4. С. 53 – 58.
3. Cultivation of *Apiaceae* L. family plants in Precarpathion region / L. M. Grytsyk, N. I. Legin, T. I. Kolyadzhyn, A. R. Grytsyk. *Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality*. Nitra : Slovak University of Agriculture. 2015. Part 1. P. 216 – 218.
4. Фенологічні особливості росту та розмноження підлісника європейського / Л. М. Грицик, А. Р. Грицик, Н. І. Легінь, Т. І. Козак. *Вода і здоров'я людини (До 150-річчя з дня народження В. І. Вернадського)*: матеріали міжнар. міждисциплінарної наук.-практ. конф., 19 – 20 квіт. 2013 р. Ужгород, 2013. С. 246 – 249.
5. Біологічні особливості та агротехніка вирощування деревію звичайного, рути садової, буквиці лікарської, підлісника європейського та астранції великої / М. В. Мельник, А. Р. Грицик, О. В. Нейко, І. А. Сас, Н. І. Легінь, Т. І. Коляджин. *Сучасні аспекти збереження здоров'я людини*: матеріали VIII міжнар. міждисциплінарної наук.-практ. конф. 17 – 18 квіт. 2015 р. Ужгород, 2015. С. 228 – 231.

ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення та практичне вирішення наукового завдання, що полягає у комплексному фармакогностичному дослідженні п. європейського; встановленні якісного складу і кількісного вмісту БАР, одержанні екстрактів, вивченні їх фармакологічної активності, визначенні можливості забезпечення сировиною, розробці проєктів методів контролю якості на сировину та екстракт.

1. Встановлено, що в траві та кореневищах з коренями п. європейського наявні фенольні сполуки: прості феноли, гідроксикоричні кислоти, кумарини, флавоноїди, таніни; ефірна олія та тритерпенові сапоніни; полісахариди, амінокислоти та карбонові кислоти. За допомогою ПХ, ТШХ, ГХ-МС, ВЕРХ в траві п. європейського ідентифіковано 80 речовин, а в кореневищах з коренями – 50.

2. Вперше у п. європейському виявлено: у складі ефірної олії – β -патчулен, β -кедрен, каріофілен, транс- α -бергамотен, β -хелміскапен, α -кадінен, α -муурулен, бісаболен, (-)-каламенен, 1-метил-6-метиленбіцикло[3.2.0] гептан, гептакозан, 4,11-селінадієн, гексагідрофарнезилацетон; сполуки стероїдної природи – β -ситостерол, стигмастан-3,5-дієн, стигмастерол; гідроксикоричні кислоти – ферулову, неохлорогенову, *n*-кумарову; флавоноїди – кемпферол, апігенін; метаболіти танінів – галокатехін, катехін, епікатехін, катехіну галат, епікатехіну галат, елагову та галову кислоти, епігалокатехін; кумарин; жирні кислоти – пальмітолеїнову, пальмітинову, лінолеву, ліноленову, стеаринову, бегенову, трикозанову, лігноцеринову, церотинову; амінокислоти – треонін, валін, метіонін, ізолейцин, лейцин, фенілаланін, лізин, гістидин, аспарагінову та глютамінову кислоти, серин, пролін, цистин, гліцин, аланін, тирозин, аргінін.

3. У результаті проведених досліджень з використанням хімічних та фізико-хімічних методів аналізу, різних видів хроматографії у порівнянні з вірогідним зразками, з сировини п. європейського виділено в індивідуальному

стані та ідентифіковано 7 сполук – кофейну, хлорогенову, неохлорогенову, розмаринову, ферулову, *n*-кумарову кислоти та рутин.

4. У траві, листках, стеблах та кореневищах з коренями п. європейського визначено кількісний вміст (%) гідроксикоричних кислот (0,55 – 1,68), флавоноїдів (0,087 – 2,72), окиснюваних фенолів (1,62 – 4,68), суми поліфенолів (2,17 – 10,95), танінів (1,21 – 7,91), тритерпенових сапонінів (0,33 – 1,05), органічних кислот (1,15 – 1,88), в тому числі аскорбінової кислоти (0,018 – 0,067), вітаміну K_I (0,37 – 1,03), ВРПС (1,18 – 2,02), ПР (1,09 – 1,50), ГцА (1,26 – 2,87), ГцБ (2,48 – 3,32).

5. Встановлено оптимальні параметри отримання екстрактів з трави та кореневищ з коренями п. європейського: ступінь подрібнення – від 1,0 до 2,5 мм; екстрагент – вода очищена або 70 % етанол; співвідношення сировина-екстрагент – 1:10; час екстракції – 30 хв; кратність – 3. Розроблено технологічну схему та одержано 4 сухих екстракти. Визначено їх вихід із сировини (21,57 % – 28,45 %), вміст (%) основних груп БАР: полісахаридів (2,91 – 4,97), гідроксикоричних кислот (2,18 – 2,87), флавоноїдів (0,13 – 5,46), суми поліфенолів (11,08 – 15,02), тритерпенових сапонінів (0,72 – 1,65).

6. Встановлено, що отримані екстракти відносяться до IV класу токсичності (малотоксичні), виявляють гемостатичну дію, бактеріостатичну активність відносно паличкоподібної та кокоподібної мікрофлори. Найбільш виражену ранозагоювальну та антиексудативну активність проявляє екстракт ПЄ_{тр.}-В.

7. Визначено діагностичні морфологічні та анатомічні ознаки трави та кореневищ з коренями п. європейського.

8. Визначено основні числові показники трави п. європейського: втрату в масі при висушуванні (не більше 10 %), вміст загальної золи (не більше 10 %), сторонніх домішок (не більше 2 %) та вміст суми поліфенолів (не менше 8 %). На основі дослідження показників доброякісності 5 серій сировини, їх змін в процесі зберігання встановлено, що термін придатності сировини є 2 роки.

9. Встановлено місця зростання п. європейського в Івано-Франківській та Чернівецькій областях. Визначено урожайність та біологічний запас. Встановлено умови культивування п. європейського в ґрунтово-кліматичних умовах Прикарпаття та проведено фенологічні спостереження за розвитком рослини.

10. За результатами фітохімічного та морфолого-анатомічного аналізу розроблено проекти МКЯ «Підлісника європейського трава», «Підлісника європейського трави екстракт сухий», «Інструкцію із заготівлі та сушіння трави підлісника європейського».

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Флора УРСР / М. В. Клокова, О. Д. Вісюліна К. : В-во Академії наук УРСР, 1955. Т. VII. С. 460 – 475.
2. Флора СССР : В 30-ти т. / под ред. акад. В. Л. Комарова. М. : Изд-во АН СССР, 1936. Т. XVI. 648 с.
3. The Effect of Transforming Growth Factor Beta (TGF- β 3) and Sanicle on Wound Healing / C. B. Beggs, M. C. Denyer, A. T. Lemmerz, F. Sefat, C. Wright, M Youseffi. *Proceedings of the World Congress on Engineering*. 2010. Vol. 1. P. 572 – 577.
4. Определитель высших растений Украины / Д. Н. Доброчаева., М. И. Котов, Ю. Н. Прокудин. 2 изд. стереот. Київ : Фитосоциоцентр, 1999. С. 225 – 228.
5. Определитель высших растений Украины / Д. Н. Доброчаева., М. И. Котов, Ю. Н. Прокудин. 1 изд. К. : Наук. думка, 1987. С. 225 – 228.
6. Визначник рослин України / за ред. В. Зерова. К. : Урожай, 1965. 878 с.
7. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник / відп. ред. А. М. Гродзинський. К. : Українська енциклопедія ім. М. П. Бажана, 1992. 544 с.
8. Флора Сибири. Т. 10: Geraniaceae – Cornaceae / Сост. М. Г. Пименов, Н. В. Власова, В. В. Зуев: В 14 т. Новосибирск : Наука. Сибирская издательская фирма РАН, 1996. С. 123 – 132.
9. 33 рецепта для мужчин: Активация половой функции с помощью фитотерапии / сост. В. Д. Шереметьев. Запорожье : РИО «Издатель», 1991. С. 27 – 28.
10. Товстуха Є. С. Фітотерапія: 3-є вид., перероб. і доп. К. : Оріяни, 2000. С. 248 – 249.
11. Галько А. В. Підлісник європейський – перспективна лікарська рослина. *Працюємо, творимо, презентуємо*: зб. матеріалів 80-ї ювілейної наук.-

практ. конф. студентів і молодих учених за участю міжнародних спеціалістів, 7 – 8 квіт. 2011 р. Івано-Франківськ, 2011. С. 197 – 198.

12. Смолінська М. О., Королюк В. І., Галицька Л. Г. Лікарські рослини Буковини. Довідник. Природна флора. Частина І. Чернівці : Рута, 2002. С. 191 – 192.

13. Краснов В. П., Орлов О. О., Ведмідь М. М. Атлас рослин-індикаторів і типів лісорослинних умов Українського Полісся. Монографія. Новоград-Волинський : «НОВОГрад», 2009. С. 280 – 281.

14. Шпуляр С. Б. Лікарські рослини Івано-Франківщини. Івано-Франківськ, 2010. С. 94.

15. Эфремов А. П. Шретер А. И. Травник для мужчин М. : Асадаль, 1996. С. 198.

16. Цветковые растения: у 6 т. / под. ред. акад. АН СССР А. Л. Тахтаджяна. М. : Просвещение, 1981. Т. 5., Ч. 1 : Цветковые растения. С. 41 – 43.

17. Цветковые растения: у 6 т. / под. ред. акад. АН СССР А. Л. Тахтаджяна. М. : Просвещение, 1981. Т. 5., Ч. 2 : Цветковые растения. С. 302 – 309.

18. K. Ghédira, P. Goetz, Sanicle *Sanicula europaea* L. (*Apiaceae*), *Phytothérapie*. 2018. No. 17. P. 106 – 108.

19. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав и использование; Семейства Rutaceae – Elegendaceae. Л. : Наука, 1988. С. 159 – 160.

20. Лукашук Г. Б. Екотопічна структура рослинності зрубів Горгани *Науковий вісник НЛТУ України*. 2010. Вип. 20.6. С. 33 – 39.

21. Токарюк А. І., Чорней І. І. Стан ценопопуляцій *Cypripedium calceolus* L. (*Orchidaceae* Juss.) у Буковинському Прикарпатті. *Інтродукція рослин*. 2009. № 2. С. 14 – 20.

22. Буняк В. І. Гнєздилова В. І., Антиків Н. Л. Аналіз флори урочища «Зимір» в передгір'ї Чорногори. *Вісник Прикарпатського національного*

університету ім. В. Стефаника. Серія : Біологія. Івано-Франківськ : Гостинець, 2008. Вип. 9. С. 8 – 15.

23. Вітер Р. М. Лісівнича оцінка вологої дубово-грабової Бучини на Передкарпатті. *Лісництво і агролісомеліорація*. Х. : УкрНДЛГА. 2009. Вип. 115. С. 97 – 101.

24. Стрямець Н. С., Рябчук В. П. Лікарські рослини екосистеми українського Розточчя та перспективи їх використання. *Науковий вісник НЛТУ України*. 2010. Вип. 20.1. С. 84 – 89.

25. Андрієнко Т. Л., Прядко О. І. Рідкісні центральноєвропейські види у флорі волинської частини Західного Полісся. *Український ботанічний журнал*. 2006. Т. 63, № 5. С. 661 – 670.

26. Панченко С. М., Карпенко Ю. О., Графін М. В. Флористичні знахідки на північному сході України. *Український ботанічний журнал*. 2006. Т. 63, № 1. С. 40 – 46.

27. Истомина И. И., Павлова М. Е., Терехин А. А. Морфометрические параметры этапов постэмбрионального онтогенеза подлесника европейского (*Sanicula europaea* L.) в природно-историческом парке «Битцевский лес». *Вестник РУДН, серия Агрономия и животноводство*. 2015. № 3. С. 23 – 30.

28. Истомина И. И., Павлова М. Е., Терехин А. А. Структура популяций подлесника европейского (*Sanicula europaea* L.) в природно-историческом парке «Битцевский лес». *Вестник РУДН, серия Агрономия и животноводство*. 2015. № 4. С. 57 – 65.

29. Małgorzata Klimko, Bogusław Bałuka, Aneta Czarna. Rosliny naczyniowe rezerwatu przyrody „Jezioro Daisy”. *Roczniki Akademii Rolniczej w Poznaniu*. 2001. CCCXXXIV. Bot. 4. S. 95 – 102.

30. Лебеда А. П. Інвентаризація флори України (Лікарські рослини носії сапонінів). К. : Академперіодика, 2007. С. 48.

31. Растительные ресурсы России и сопредельных государств: Часть I – Семейства Lysorodiaceae – Erhedraceae, Часть II. Дополнения к 1 – 7-му томам. СПб : Мир и семья – 95, 1996. С. 260 – 261.

32. Hiller, K. *Sanicula europaea* L. – Sanikel. *Zeitschrift für Phytotherapie*. 2005. 26 (5). P. 251 – 254.
33. Essential oil composition of *Sanicula europaea* L. / Milica Pavlović, Nada Kovačević, Olga Tzakou, Maria Couladis. *Flavour and Fragrance Journal*. 2006. Vol. 21, Issue 4. P. 687 – 689.
34. Remigius Chizzola. Essential Oil Composition of Wild Growing Apiaceae from Europe and the Mediterranean. *Natural Product Communications*. 2010. Vol. 5 No. 9. P. 1477 – 1492.
35. Talag, Agela Hussain Mohammed. Phytochemical investigation and biological activities of *Sanicula europaea* and *Teucrium davaeanum*. Isolation and identification of some constituents of *Sanicula europaea* and *Teucrium davaeanum* and evaluation of the antioxidant activity of ethanolic extracts of both plants and cytotoxic activity of some isolated compounds. PhD Thesis. 2016.
36. Saniculoside N from *Sanicula europaea* L. / Nazlı Arda, Nezhun Gören, Avni Kuru, Thitima Pengsuparp, John M. Pezzuto, Sheng-Xiang Qiu and Geoffrey A. Cordell. *J. Nat. Prod.* 1997. No. 60 (11). P. 1170–1173.
37. Saniculoside R-1: A New Triterpenoid Saponin from *Sanicula europaea* L. / Th. Schöpke, M. Janka, M. Nimtz, V. Wray, K. Hiller. *Planta Med.* 1998. № 64. P. 83 – 85.
38. Sesquiterpene and Norsesquiterpene Derivatives from *Sanicula lamelligera* and Their Biological Evaluation. Xue-Song Li, Xiao-Jiang Zhou, Xing-Jie Zhang, Jia Su, Xue-Jing Li, Yong-Ming Yan, Yong-Tang Zheng, Yan Li, Liu-Meng Yang, Yong-Xian Cheng. *Jornal of Natural Products*. 2011. No. 74. P. 1521 – 1525.
39. The General Chapters and General Monographs of the European Pharmacopoeia and Preamble of the French Pharmacopoeia apply. *French Pharmacopoeia* 2005. Режим доступа:
https://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/147395b8c0f7edcb14df8dc283b3c393.pdf
40. Natural products locally modulators of the cellular response: therapeutic perspectives in skin burns / G. D. Mogoşanu, Florina Carmen Popescu, Cristina Jana

Busuioc, H. Parvanescu, I. Lascar. *Romanian Journal Morphology & Embryology*. 2012. № 53 (2). P. 249 – 262.

41. Чекман І. С. Клінічна фітотерапія. К., 2000. 510 с.

42. Мамчур Ф. І. Фітотерапія в урології. К. : Здоров'я, 1991. С. 76.

43. Ion Tiță, George Dan Mogoșanu, Monica Gabriela Tiță. Ethnobotanical inventory of medicinal plants from the South-West of Romania. *Farmacica*. 2009. Vol. 57, 2. P. 141 – 156.

44. Steinmetz E. F. *Materia medica vegetabilis*. Amsterdam, 1954. V. 1 – 3. 1236 p.

45. Gruenwald J., Th. Brendler, Ch. Jaenicke. *PDR for Herbal Medicines*. Montvale, N J : Medical Economics Company, 2000. P. 296 – 297.

46. Jacker H. J., Hiller K. Antiexudative efficiency of the saponins from *Eryngium planum* L. and *Sanicula europaea* L. *Pharmazie*. 1976. No. 31. P. 747 – 748.

47. Ethnopharmacological in vitro studies on Austria's folk medicine – An unexplored lore in vitro anti-inflammatory activities of 71 Austrian traditional herbal drugs / Sylvia Vogl, Paolo Picker, Judit Mihaly-Bison, Nanang Fakhruddin, Atanas G. Atanasov, Elke H. Heiss. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013. Vol. 149. P. 750 – 771.

48. Попов П. Л. Виды растений, применявшиеся при вирусных болезнях человека и животных: закономерности распределения в филогенетической классификационной системе. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. 2008. Vol. 4, № 3. P. 17 – 64.

49. Antiviral activity of *Sanicula europaea* L. extracts on multiplication of human parainfluenza virus type 2. Ali Karagöz, Nazl Arda, Nezhun Gören, Kyosuke Nagata, Dr. Avni Kuru. *Phytotherapy Research*. 1999. Vol. 13, Issue 5. P. 436 – 438.

50. Kadir Turan, Kyosuke Nagata, Avni Kuru. Antiviral Effect of *Sanicula europaea* L. Leaves Extract on Influenza Virus-Infected Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1996. Vol. 225. Issue 1, P. 22 – 26.

51. Stefan Schmidt, Hans-Joachim Kaestle, Uwe Steinhausen. Homeopathic-Spagyric Therapy of Acute and Uncomplicated Rhinosinusitis: An Observational Trial on Symptom Severity in 2 General Practitioner Surgeries. *Forsch Komplementmed*. 2016. No. 23. P. 303 – 305.
52. Regulation of Homoeopathic and Anthroposophic Medicines in Australia. 2008. 85 p.
53. D. D. Banerjee. Augmented textbook of homoeopathic pharmacy. Second edition. 2000. 672 p.
54. Сухинин Денис. БАР фірми «Нутримед» в урологічній практиці. *Газета «Аптека»*. 2002. № 9 (330). Режим доступу:
<http://www.apteka.ua/article/12745>
55. Державна фармакопея України. 2-е вид. в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». Х., 2015. Т. 1. 1128 с.
56. Химический анализ лекарственных растений: учебное пособие для фармац. вузов / под ред. Н. И. Гринкевич, Л. Н. Сафронович. М. : Высшая школа, 1983. 176 с.
57. Кривавич А. С., Конечна Р. Т., В. П. Новіков. Вивчення біологічно активних речовин косариків черепитчастих (*Gladiolus imbricatus*). *Вісник Національного університету "Львівська політехніка". Хімія, технологія речовин та їх застосування*. 2014. № 787. С. 217 – 220.
58. Солодовниченко Н. М., Журавльов М. С., Ковальов В. М. Лікарська рослинна сировина та фітопрепарати: Посіб. з фармакогнозії з основами біохімії лікар. рослин. Х. : Вид-во НФаУ: Золоті сторінки, 2001. 408 с.
59. Шульга Л. І. Якісна ідентифікація біологічно активних речовин настойки «Касдент». *Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П. Л. Шупика*. 2014. № 23 (4). С. 413 – 417.
60. Практикум по фармакогнозии: Учеб. пособие для студ. вузов / под общ. ред. В. Н. Ковалева. Х. : 2004. 512 с.
61. Ковальов В. М., Павлій О. І., Ісакова Т. І. Фармакогнозія з основами біохімії рослин Х. : Прапор, видавництво НФаУ, 2000. 703 с.

62. Бензель І. Л., Дармограй Р. Є., Бензель Л. В. Дослідження вмісту аскорбінової кислоти та вільних органічних кислот у фітосубстанціях бадану товстолистого. *Фармацевтичний журнал*. 2010. № 2. С. 98–101.
63. Rodriguez M., Oderiz M. Determination of Vitamin C and Organic Acids in Various Fruits by HPLC. *J Chromatogr Sci*. 2011. Vol. 11. P. 433–437.
64. Грицик Л. М., Тучак Н. І., Грицик А.Р. Ідентифікація та кількісне визначення органічних кислот у траві видів приворотня. *Фармацевтичний журнал*. 2013. № 3. С. 83 – 87.
65. Тернинко І. І. Вивчення амінокислотного складу мальви лісової (*Malvae sylvestris* L.). *Фармацевтичний журнал*. 2012. № 5. С. 81 – 84.
66. Вивчення амінокислотного складу трави та підземних органів гадючника в'язолистого (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.) / Н. Є. Бурда, І. О. Журавель, В. С. Кисличенко, Дем'яохін В. Б. *Фармацевтичний журнал*. 2011. № 2. С. 102 – 104.
67. Determination of amino acids in medicinal plants from Southern Sonora, Mexico / Edgar F. Moran-Palacio, Orlando Tortoledo-Ortiz, Grela A. Yanez-Farias [et al.]. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2014. Vol. 13 (4). P. 601–606.
68. Дослідження фенольних сполук спиртового екстракту з листки брусниці звичайної / М. А. Комісаренко, А. С. Гейдерих, А. М. Ковальова, О. М. Кошовий. *Український журнал клінічної та лабораторної медицини*. 2012. Том 7, № 2. С. 24 – 26.
69. Дослідження фенольних сполук спиртового екстракту з трави лаванди вузьколистої / А. С. Гейдеріх, Т. В. Упир, А. М. Комісаренко, О. М. Кошовий. *Український журнал клінічної та лабораторної медицини*. 2012. Том 7, № 1. С. 56 – 59.
70. Бурлака І. С., Кисличенко В. С. Дослідження гідроксикоричних кислот *Calamagrostis epigeios* (L.) Roth. *Вісник фармації*. 2013. № 1 (73). С. 51 – 53.
71. Адамова І. О., Хайдукова Е. В., Теслов Л. С. Изучение водорастворимого полисахаридного комплекса из надземной части шалфея

сухостепного – *Salvia tesquicola* Klok. et Pobed. *Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения: материалы VII международного съезда ФИТОФАРМ 2003*. СПб – Пушкин, 2003. С. 497 – 500.

72. Юнусходжаева Н. А., Абдуллабекова В. Н. Исследование химического состава травы *Polygoni avicularis* L. *Химия растительного сырья*. 2012. № 4. С. 187 – 191.

73. Машталер В. В. Вміст амінокислот у густих екстрактах із сировини синяка звичайного. *Запорожский медицинский журнал*. 2013. № 4 (79). С. 43 – 44.

74. Amino Acid Composition of the *Alchemilla* L. Genus Plants and *Nepeta cataria* L. L. M. Grytsyk, N. I. Tuchak , T. G. Stasiv, A. R. Grytsyk. *The pharma innovation*. 2013. Vol. 2 № 1. P. 50 – 53.

75. Кабар А. М., Заїко Г. А., Лихолат Т. Ю. Спецпрактикум з фізіології та біохімії рослин. Практичне видання. Дніпропетровськ : РВВ ДНУ, 2013. 33 с.

76. Analysis of Macroelements Content of some Medicinal and Aromatic Plants using Flame Atomic Absorption Spectrometry (FAAS) / Ilinca M. Imbrea, Isidora Radulov, Alma L. Nicolin, Florin Imbrea. *Romanian Biotechnological Letters*. 2016. Vol. 21, № 4. P. 11642 – 11649.

77. Грицик Л. М., Тучак Н. І., Грицик А. Р. Дослідження елементного складу трави приворотня віялоподібного. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів: 5-а наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 27 – 28 верес. 2013 р. Тернопіль : Укрмедкнига, 2013. С. 35 – 36.*

78. Марчишин С. М., Козачок С. С. Определение гидроксикоричных кислот в антиаллергическом сборе методом ВЭЖХ. *Сетевое научное издание: Медицина и образование в Сибири*. 2013. № 4 Режим доступа:

http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1101

79. Seal T. Quantitative HPLC analysis of phenolic acids, flavonoids and ascorbic acid in four different solvent extracts of two wild edible leaves, *Sonchus*

arvensis and Oenanthe linearis of North-Eastern region in India. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2016. Vol. 6, № 2. P. 157–166.

80. Sensitive Determination of Catechins in Tea by HPL. *Thermo scientific. DIONEX corporation*. – 2011. – AN 275. Режим доступа:

<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/110783-AN275-HPLC-Catechins-Tea-19May2011-LPN2799.pdf>

81. Криворучко О. В. Леткі речовини плодів шипшини собачої. *Збірник наук. праць снівробіт. НМАПО ім. П. Л. Шупика*. 2014. № 23 (4). С. 301 – 307.

82. Гур'єва І. Г. Вивчення стероїдних сполук листки та коренів тифону. *Фітотерапія. Часопис*. 2014. № 1. С. 71 – 74.

83. Дослідження компонентного складу летких фракцій трави та квіток дивини звичайної / А. А. Волошина, В. С. Кисличенко, І. О. Журавель, Бурда Н. Є. *Український медичний альманах*. 2013. Том 16, № 2. С. 19 – 21.

84. The volatile constituents of the flower, leaf, and stem of *Verbascum wiedemannianum* grown in Turkey / Nagihan Yilmaz Iskender, Nurettin Yayli, Nuri Yildirim, Tayyibe Beyza Cansu, Salih Terzioglu. *Journal of Oleo Science*. 2009. Vol. 58(3). P. 117 – 121.

85. Ющишена О. В., Цуркан О. О., Корабльов О. А. Жирні кислоти листків, стебел та суцвіть вітексу священного (*Vitex agnus-castus* L.). *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. 2014. № 1. С. 139 – 141.

86. Дроздова И. Л., Лупилина Т. И. Тритерпеновые соединения травы икотника серого. *Лекарственное растениеводство: от опыта прошлого к современным технологиям: материалы второй Международной науч.-практ. интернет-конф.* Полтава, 2013. С. 108 – 110.

87. Количественное определение тритерпеновых сапонинов в пятикомпонентной растительной композиции / Т. Г. Заркуа, Д. М. Попов, А. Д. Бакуридзе, Р. В. Махарадзе. *Современные аспекты изучения лекарственных растений. Научные труды*. 1995. Т. 34. С. 177.

88. Государственная Фармакопея СССР : вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. МЗ СССР. 11-е изд., доп. М. : Медицина, 1989. 400 с.
89. Кількісне визначення органічних кислот у траві *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. / Н. Є. Бурда, І. О. Журавель, В. С. Кисличенко, В. Б. Дем'яохін / *Український біофармацевтичний журнал*. 2010. № 1 (6). С. 59 – 61.
90. Челін Н. В., Марчишин С. М. Дослідження вільних органічних кислот та аскорбінової кислоти у листках, плодах та кореневищах і коренях любистку лікарського (*Levisticum officinale* Koch.). *Фармацевтичний часопис*. 2010. № 3. С. 13 – 16.
91. Тринеева О. В., Сливкин А. И., Воропаева С. С. Определение органических кислот в листьях крапивы двудомной. *Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация*. 2013. № 2. С. 215 – 219.
92. Государственная Фармакопея СССР : вып. 1. Общие методы анализа. МЗ СССР. 11-е изд., доп. М. : Медицина, 1987. 336 с.
93. Atanassova M., Christova-Bagdassarian V. Determination of tannins content by titrimetric method for comparison of different plant species. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*. 2009. No. 44 (4). P. 413 – 415.
94. Державна фармакопея України. 2-е вид. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». Доповнення 2. Х., 2018. 336 с.
95. Тимофєєва С. В., Журавель І. О. Визначення кількісного вмісту гідроксикоричних кислот в сировині канни садової (*Canna hybrida* Hort.). *Зб. наук. праць співробіт. НМАПО імені П. Л.Шупика*. 2016. № 26. С. 413 – 417.
96. Шестаков Т. С., Белоногова В. Д., Петриченко В. М. Спектрофотометрический метод определения содержания флавоноидов в траве *Veronica chamaedrys* (Scrophulariaceae). *Медицинский альманах*. 2016. № 1 (41). С. 127 – 130.

97. Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species / Natália Martins, Lillian Barros, Mariana Henriques et al. *Industrial Crops and Products*. 2015. №74. P. 648 – 670.

98. Смалюх О. Г., Процик Л. В., Кравчук Ж. М. Фітохімічні дослідження рослинної сировини для розробки складу та специфікації лікарського засобу холелесан у капсулах. *Агроекологічний журнал*. 2016. № 2. С. 138 – 144.

99. Вивчення вмісту вітаміну К у листі перспективних видів роду *Plantago* L. флори України у вегетаційний період / Т. В. Хортецька, О. В. Мазулін, Г. П. Смойловська, Г. В. Мазулін. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2012. № 3 (10). С. 26 – 28.

100. Бурцева О. В., Тернінко І. І. Вивчення полісахаридного складу *Avena Sativa* L. *Вісник Фармації*. 2010. № 2 (62). С. 46 – 48.

101. Analysis of the monosaccharide composition of purified polysaccharides in *Ganoderma atrum* by capillary gas chromatography / Y. Chen, M. Xie, Y. Wang [et al.]. *Phytochem. Anal.* 2009. 20(6). P. 503 – 510.

102. Кисличенко В. С., Карпюк У. В. Вивчення полісахариднів вегетативних органів трави сої щетинистої. *Фармацевтичний часопис*. 2014. № 1. С. 31 – 34.

103. Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації / за ред. О. В. Стефанова. К. : Авіцена. 2001. 528 с.

104. Монатко К. В., Подплетня О. А., Слесарчук В. Ю. Експериментальне дослідження протизапальних властивостей ліофільного порошку кавуна. *Медичні перспективи*. 2012. Т. 17, № 4. С. 25 – 29.

105. Лікарський засіб з кровоспинною дією: патент 103780 Україна : МПК А61К 36/899 (2006.01) А61Р 7/04. № и 2015 07268; заявл. 20.07.2015; опубл. 25.12.2015, Бюл. № 24.

106. Данко Г.В. Порівняльна характеристика лікарського препарату на основі розторопші плямистої із засобами рослинного походження, що використовуються при лікуванні тварин з ранами. *Науковий вісник ЛНУВМБТ ім. С. З. Гжицького*. 2010. Том 12, № 3 (45), Ч. 1. С. 48 – 53.

107. Методичні рекомендації «Експериментальне вивчення нових препаратів для місцевого лікування ран» / Л. В. Яковлева, О. В. Ткачова, Я. О. Бутко, Ю. Б. Лар'яновська. Х. : Вид-во НФаУ, 2013. – 52 с.

108. Справочник по применению антибиотиков и других химиотерапевтических препаратов. М., 1977. С. 118 – 119.

109. Дослідження антибактеріальної активності екстрактів видів роду Буквиця, Сосна, Астранція та Котяча м'ята справжня / А. Р. Грицик, І. А. Сас, Т. П. Мандзій, Т. І. Коляджин, Т. Г. Стасів. *Український вісник психоневрології*. 2014. Т. 22, вип. 2 (79), додаток. С. 119 – 122.

110. Дмитрук Л. Б., Ивановский В. В. Рациональное использование и охрана растительных ресурсов: учебно-методический комплекс, 2-е изд. Витебск : ВГУ им. П. М. Машерова, 2017. 82 с.

111. Зузук Б. М., Зузук Л. Б. Ресурсознавство лікарських рослин: підручник для студентів фармац. факультетів. Вінниця : НОВА КНИГА, 2009. 144 с.

112. Гойко О. В., Мохначов С. І. Технологія обробки й аналізу медичних даних з урахуванням їх особливостей. *Запорожский медицинский журнал*. 2013. № 1 (76). С. 82 – 83.

113. Римжа М. И., Манак Н. А., Гайшун И. В. Применение методов прикладной статистики в научных медицинских исследованиях. *Здравоохранение*. 2012. № 8. С. 64 – 76.

114. Римжа М. И., Манак Н. А., Гайшун И. В. Применение методов прикладной статистики в научных медицинских исследованиях. *Здравоохранение*. 2012. № 9. С. 59 – 68.

115. Перспективи використання підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) та астранції великої (*Astrantia major* L.) в медицині та фармації. / Грицик Л. М., Легінь Н. І., Коляджин Т. І., Грицик А. Р. Івано-Франківськ : Супрун В. П., 2017. 100 с.

116. Легінь Н. І. Ідентифікація біологічно активних речовин підлісника європейського. *Інновації в медицині*: 83-тя наук.-практ. конф. студентів і

молодих вчених з міжнародною участю, 27 – 28 берез. 2014 р. Івано-Франківськ, 2014. С. 196.

117. Легінь Н.І. Дослідження органічних кислот в траві та кореневищах з коренями підлісника європейського. *Інновації у фармації: матеріали 82-ї наук.-практ. конф. студентів і молодих вчених з міжнародною участю*, 18 – 19 квіт. 2013 р. Івано-Франківськ, 2013. С. 224.

118. Грицик Л. М., Легінь Н. І., Грицик А. Р. Вивчення якісного складу та кількісного вмісту органічних кислот в сировині *Sanicula europaea* L. *Український вісник психоневрології*. 2014. Том 22 № 2 (79) (додаток). С. 105 – 107.

119. Амінокислотний склад рослинної сировини *Plantago media* L. та *Plantago altissima* L. флори України / Т. В. Хортецька, О. В. Мазулін, Г. П. Смойловська, Г. В. Мазулін, О. В. Гречана. *Запорізький медичний журнал*. 2012. № 3 (72). С. 132 – 134.

120. Грицик Л. М., Легінь Н. І., Грицик А. Р. Ідентифікація деяких біологічно активних речовин у надземних і підземних органах підлісника європейського *Sanicula europaea* L. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології та біотехнології: матеріали IV наук.-практ. конф. з міжнародною участю*, 16 – 17 жовт. 2014 р. Харків : Вид-во НФаУ, 2014 С. 88.

121. Study of Amino Acid Composition of *Betonica* L., *Sanicula* L., and *Astrantia* L. Genera Species / L. M. Grytsyk, A. R. Grytsyk, I. A. Sas, N. I. Legin, T. I. Kolyadjin. *The Pharma Innovation Journal*. 2016. № 5 (7). P. 46 – 48.

122. Quantitative determination of phenolic compounds by UHPLC-UV-MS and use of partial least-square discriminant analysis to differentiate chemo-types of Chamomile / Chrysanthemum flower heads / Avula Bharatmi, Yan-Hong Wang, Mei Wang, Christine Avonto [et al.]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014. № 88. P. 278 – 288.

123. Грицик Л. М., Легінь Н.І. Дослідження полісахаридів трави підлісника європейського. *Хімія природних сполук: матеріали III Всеукраїнської наук.-практ. конф.*, 30 – 31 жовт. 2012 р. Тернопіль, 2012. С. 13 – 14.

124. Гонтова Т. М., Машталер В. В. Перспективи вивчення розеткового листя бораго лікарського. *Фармацевтичний часопис*. 2013. № 3. С. 6 – 8.
125. Cruz Amaya, J.M., Flórez Cuadros, M., Narváez Solarte, W. Aminoácidos de cadena ramificada en hepatitis. *Actualidad & Divulgación Científica*. 2016. No. 19 (1). P. 155 – 160.
126. Sydora N. V., Kovalyova A. M., Avidzba Yu. N., Komissarenko A. M. The comparative chemical study of the fatty acid composition of hawthorn flowers of *Sanguineae* sarg. section. *News of pharmacy*. 2015. 4 (84). P. 8 – 12.
127. Дослідження складу хлороформної фракції трави підмаренника несправжнього / Лещенко О. Ю., Горяча О. В., Ільїна Т.В., Ковальова А. М. *Запорожский медицинский журнал*. 2012. № 3 (72). С. 92 – 95.
128. Хромато-мас-спектрометричне дослідження низькомолекулярних аліфатичних, жирних та ароматичних кислот кореневища *Veronica teucrium* L. А. П. Осьмачко, А. М. Ковальова, Т. В. Ільїна, О. М. Кошовий, Н. В. Сидора. *Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science»*. 2017. № 2 (6). С. 22 – 25.
129. Лощакова Е. А., Мамкова А. А. Гигиеническая значимость фитостеролов. *Актуальные проблемы современной медицины и фармации: 70-й международная науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых, 20 – 22 апр. 2016 г. Минск : БГМУ, 2016. С. 688. Режим доступа:*
<https://www.bsmu.by/downloads/news/program.pdf>
130. Дослідження елементного складу підлісника європейського та астранції великої / Н. І. Легінь, Т. І. Коляджин, Л. М. Грицик, А. Р. Грицик. *Медична та клінічна хімія*. 2018. Т. 20, № 2. С. 112 – 116.
131. Возможные пути биоконверсии сапонинсодержащих растительных отходов / Д. А. Еделев, М. Г. Сульман, А. И. Сидоров, Е. В. Ожимкова, Б. Б. Тихонов, В. Ю. Долуда, Э. М. Сульман, Г. Ю. Рабинович. *Научно-технический вестник Поволжья*. 2013. №3. С. 136 – 140.
132. Марчишин С. М. Зарічанська О. В., Щербакова Т. О. Визначення якісного складу та кількісного вмісту гідроксикоричних кислот у сировині рослин роду Лілійник (*Nemerocallis* L.). *Здобутки клінічної і експериментальної*

медицини. 2015. № 2, 3. С. 101 – 103.

133. Легінь Н.І. Визначення вмісту окиснюваних фенолів в сировині підлісника європейського. *Інновації в медицині: матеріали 84-ої наук.-практ. конф. студентів і молодих вчених з міжнародною участю*, 12 – 13 берез. 2015 р. Івано-Франківськ, 2015. С. 170 – 171.

134. Грицик Л. М., Легінь Н. І., Грицик А. Р. Одержання екстрактів підлісника європейського. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів: матеріали 5-ї наук.-практ. конф. з міжнародною участю*, 27 – 28 верес. 2013 р. Тернопіль : Укрмедкнига, 2013. С. 34 – 35.

135. Екстракція рослинної сировини: навч. посібник / Ю. І. Сидоров, І. І. Губицька, Р. Т. Конечна, В. П. Новіков. Львів: вид-во Нац. ун-ту "Львівська політехніка", 2008. 336 с.

136. Doughari H. J. Phytochemicals: extraction methods, basic structures and mode of action as potential chemotherapeutic agents. In: *Phytochemicals – a global perspective of their role in nutrition and health* / Ed. by V. Rao. 2012. P. 1 – 32.

137. Глущенко А. В. Кількісне визначення суми поліфенолів в екстрактах кураю пагорбкового. *Збірник наукових праць співробіт. НМАПО імені П. Л. Шупика*. 2014. № 23 (4). С. 240 – 245.

138. Спосіб одержання екстракту з трави підлісника європейського з кровоспинною дією: пат. 132069 Україна: МПК А61К 9/00, А61К 36/23, А61Р 7/04. № и 2018 09017; заявл. 30.08.18 ; опубл. 11.02.19, Бюл. № 3.

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

140. Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 15.12.2009 р. Режим доступу:

<https://zakon.rada.gov.ua/cgi-in/laws/main.cgi?nreg=3447-1>

141. Біоетична експертиза доклінічних та інших наукових досліджень, що виконуються на тваринах: методичні рекомендації / О. Г. Резніков, А. І. Соловйов, Н. В. Добреля, О. В. Стефанов. К., 2006. 28 с.

142. Легінь Н.І., Грицик Л. М. Вивчення гострої токсичності екстрактів із трави підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.). *Фармаком.* 2018. № 3 С. 46 – 49.

143. Затильнікова О. О., Осолодченко Т. П., Ковальов В. М. Антимікробна активність екстрактів *Iris pseudacorus* L. *Annals of Mechnikov institute.* 2010. № 4. С. 44 – 47.

144. Дослідження антимікробної активності екстрактів підлісника європейського / Л. М. Грицик, Н. І. Легінь, А. Р. Грицик, В. О. Гондарук. *Український вісник психоневрології.* 2012. Том 20, вип. 2 (71) додаток. С. 66 – 67.

145. Грицик Л. М., Легінь Н. І., Грицик А. Р. Дослідження гемостатичної активності екстрактів підлісника європейського. *Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії:* матеріали І міжнародної наук.-практ. інтернет-конф. 7 – 8 листоп. 2014 р. Х. : НФаУ, 2014. С. 56 – 57.

146. Спосіб одержання біологічно активної субстанції рослинного походження з кровоспинною дією для використання в акушерстві та гінекології: пат. 103779 Україна: МПК А61К 36/899, А61Р 7/04. № u201507266; заявл. 20.07.2015; опобл. 25.12.2015, Бюл. № 24.

147. Грицик Л. М., Легінь Н. І., Грицик А. Р. Ідентифікація видів роду *Sanicula* L. і *Astrantia* L. родини *Apiaceae* L. *Український вісник психоневрології.* 2013. Т. 21, вип. 2 (75) додаток. С. 76 – 78.

148. Морфолого-анатомічне дослідження підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) / Л. М. Грицик, Н. І. Легінь, А. Р. Грицик, М. В. Мельник. *Фармацевтичний журнал.* 2014. № 4. С. 53 – 58.

149. Сологуб В. А. Перспективи плантаційного культивування звіробою звичайного (*Hypericum perforatum* L.). *Український медичний альманах.* 2013. Т. 16 № 3. С. 140 – 142.

150. Нейко О. В., Грицик А. Р., Мельник М. В. Дослідження умов зростання та способів розмноження *Achillea millefolium* L. та *Achillea*

diatans wald. Et kit. в умовах Прикарпаття. *Фармацевтичний часопис.* 2017. № 2. С. 33 – 37.

151. Грицик А. Р., Свірська С. П. Дослідження умов зростання *Anchusa officinalis* L. та *Anchusa procera* Bess. у деяких регіонах України. *Фармаком.* 2018. № 1. С. 77 – 81.

152. Настанова: Лікарські засоби. Належна практика культивування та збирання вихідної сировини рослинного походження СТ-Н МОЗУ 42-4.5:2012.

153. Бейдеман И.Н. Методика изучения фенологии растений и растительных сообществ. Новосибирск : Наука, 1974. – 156 с.

154. Фенологічні особливості росту та розмноження підлісника європейського / Л. М. Грицик, А. Р. Грицик, Н. І. Легінь, Т. І. Козак. *Вода і здоров'я людини: матеріали міжнародної міждисциплінарної наук.-практ. конф.* 19 – 20 квіт. 2013 р. Ужгород, 2013. С. 246 – 249.

155. Доспехов, Б.А. 1985. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). М. 1985. 323 с.

156. Біологічні особливості та агротехніка вирощування деревію звичайного, рути садової, буквиці лікарської, підлісника європейського та астранції великої / М. В. Мельник, А. Р. Грицик, О. В. Нейко, І. А. Сас, Н. І. Легінь, Т. І. Коляджин. *Сучасні аспекти збереження здоров'я людини: матеріали VIII міжнародної міждисциплінарної наук.-практ. конф.* 17 – 18 квіт. 2015 року. Ужгород, 2015. С. 228 – 231.

157. Cultivation of Apiaceae L. family plants in Precarpathion region / L. M. Grytsyk, N. I. Legin, T. I. Kolyadzhyn, A. R. Grytsyk. *Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality.* Nitra: Slovak University of Agriculture, 2015. Part 1. – P. 216 – 218.

158. Баула О. П., Деркач Т. М. Забезпечення якості лікарських засобів рослинного походження: стан та перспективи. *Фармацевтичний часопис.* 2017. № 2. С. 79 – 86.

159. Котова Е. Е., Котов А. Г Фармакопейні стандартні зразки як складова стандартизації лікарської рослинної сировини в Україні. *Фармаком.* 2016. № 2. С. 15 – 21.

160. Ідентифікація видів роду *Sanicula* L. і *Astrantia* L. родини *Apiaceae* L. / Л. М. Грицик, Н. І. Легінь, Т. І. Коляджин, А. Р. Грицик. *Український вісник психоневрології.* 2013. Т. 21, вип. 2 (75) додаток. С. 76 – 78.

ДОДАТКИ

Список публікацій здобувача

1. Дослідження антимікробної активності екстрактів підлісника європейського / Л. М. Грицик, Н. І. Легінь, А. Р. Грицик, В. О. Гондарук. *Український вісник психоневрології*. 2012. Т. 20, вип. 2 (71) додаток. С. 66 – 67. (Особистий внесок – проведення експериментальних досліджень антимікробної активності підлісника європейського, узагальнення одержаних даних та оформлення статті до друку).
2. Ідентифікація видів роду *Sanicula* L. і *Astrantia* L. родини *Apiaceae* L. / Л. М. Грицик, Н. І. Легінь, Т. І. Коляджин, А. Р. Грицик. *Український вісник психоневрології*. 2013. Т. 21, вип. 2 (75) додаток. С. 76 – 78. (Особистий внесок – проведення аналізу досліджуваної сировини, обробка одержаних даних та оформлення статті до друку).
3. Морфолого-анатомічне дослідження підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) / Л. М. Грицик, Н. І. Легінь, А. Р. Грицик, М. В. Мельник. *Фармацевтичний журнал*. 2014. № 4. С. 53 – 58. (Особистий внесок – проведення макро- та мікроскопічного аналізу сировини підлісника європейського, обробка одержаних даних та оформлення статті до друку).
4. Грицик Л. М., Легінь Н. І., Грицик А. Р. Вивчення якісного складу та кількісного вмісту органічних кислот в сировині *Sanicula europaea* L. *Український вісник психоневрології*. 2014. Т. 22, вип. 2 (79) додаток. С. 105 – 107. (Особистий внесок – участь у проведенні експериментальних досліджень, статистична обробка даних та оформлення статті до друку).
5. Дослідження елементного складу підлісника європейського та астранції великої / Н. І. Легінь, Т. І. Коляджин, Л. М. Грицик, А. Р. Грицик. *Медична та клінічна хімія*. 2018. Т. 20, № 2. С. 112 – 116. (Особистий внесок – участь у проведенні аналізу сировини підлісника європейського, обробка одержаних результатів та оформлення статті до друку).

6. Легінь Н. І., Грицик Л. М. Вивчення гострої токсичності екстрактів з трави підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.). *Фармаком.* 2018. № 3. С. 46 – 49. (Особистий внесок – проведення експериментальної частини, обґрунтування одержаних результатів та оформлення статті до друку).
7. Cultivation of *Apiaceae* L. family plants in Precarpathion region / L. M. Grytsyk, N. I. Legin, T. I. Kolyadzhyn, A. R. Grytsyk. *Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality*. Nitra: Slovak University of Agriculture. 2015. Part 1. P. 216 – 218. (Особистий внесок – проведення експериментальних досліджень, узагальнення одержаних даних, оформлення статті до друку).
8. Study of Amino Acid Composition of *Betonica* L., *Sanicula* L. and *Astrantia* L. Genera Species / L. M. Grytsyk, A. R. Grytsyk, I. A. Sas, N. I. Legin, T. I. Kolyadjin. *The Pharma Innovation Journal*. 2016. No 5 (7). P. 47 – 49. (Особистий внесок – аналіз літературних джерел, виконання експериментальної частини з дослідження амінокислотного складу сировини підлісника європейського, узагальнення одержаних даних, оформлення статті до друку).
9. Пошук перспективних джерел лікарських засобів з кровозупинною дією / Л. М. Грицик, І. Л. Бензель, Н. І. Легінь, Н. І. Тучак, О. В. Нейко, І. А. Сас, А. Р. Грицик. *Актуальні проблеми профілактичної медицини: зб. наук. праць (Присвячується 80-річчю від дня народження професора М. Й. Гжегоцького та 25-річчю заснування лабораторії промислової токсикології)*. Львів, 2012. № 10. С. 52 – 59. (Особистий внесок – аналіз літературних джерел, узагальнення одержаних даних, оформлення статті до друку).
10. Фенологічні особливості росту та розмноження підлісника європейського / Л. М. Грицик, А. Р. Грицик, Н. І. Легінь, Т. І. Козак. *Вода і здоров'я людини (До 150-річчя з дня народження В. І. Вернадського)*: матеріали міжнар. міждисциплінарної наук.-практ. конф., 19 – 20 квіт. 2013 р. Ужгород, 2013. С. 246 – 249. (Особистий внесок – виконання експериментальної частини з дослідження фенологічних особливостей розмноження підлісника європейського, оформлення статті до друку).

11. Біологічні особливості та агротехніка вирощування деревію звичайного, рути садової, буквиці лікарської, підлісника європейського та астранції великої / М. В. Мельник, А. Р. Грицик, О. В. Нейко, І. А. Сас, Н. І. Легінь, Т. І. Коляджин. *Сучасні аспекти збереження здоров'я людини: матеріали VIII міжнар. міждисциплінарної наук.-практ. конф.* 17 – 18 квіт. 2015 р. Ужгород, 2015. С. 228 – 231. (Особистий внесок – аналіз літературних джерел, узагальнення одержаних даних, виконання експериментальної частини з агротехнології вирощування підлісника європейського, оформлення статті до друку).

12. Спосіб одержання екстракту з трави підлісника європейського з кровоспинною дією: пат. 132069 Україна: МПК А61К 9/00, А61К 36/23, А61Р 7/04. № и 201809017; заявл. 30.08.18 ; опубл. 11.02.19, Бюл. № 3. (Особистий внесок – здійснення патентного пошуку, проведення експериментальних досліджень, оформлення патенту).

13. Легінь Н. І. Досвід використання підлісника європейського в народній медицині. *Сучасні проблеми медицини і фармації в наукових розробках студентів і молодих вчених: матеріали 81-ої наук.-практ. конф. студентів і молодих вчених з міжнар. участю*, 29 – 30 берез. 2012 р. Івано-Франківськ, 2012. С. 201.

14. Грицик Л. М., Легінь Н. І. Дослідження полісахаридів трави підлісника європейського. *Хімія природних сполук: матеріали III Всеукр. наук.-практ. конф.*, 30 – 31 жовт. 2012 р. Тернопіль, 2012. С. 13 – 14. (Особистий внесок – виконання експериментальної частини з дослідження полісахаридного складу сировини підлісника європейського, узагальнення даних, оформлення тез до друку).

15. Легінь Н. І. Дослідження органічних кислот в траві та кореневищах з коренями підлісника європейського. *Інновації в медицині: матеріали 82-ої наук.-практ. конф. студентів і молодих вчених з міжнар. участю*, 18 – 19 квіт. 2013 р. Івано-Франківськ, 2013. С. 224.

16. Грицик Л. М., Легінь Н. І., Грицик А. Р. Одержання екстрактів підлісника європейського. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів*: матеріали 5-ї наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 27 – 28 верес. 2013 р. Тернопіль : Укрмедкнига, 2013. С. 34 – 35. (Особистий внесок – проведення експериментальних досліджень, узагальнення даних, оформлення тез до друку).

17. Грицик Л. М., Легінь Н. І. Поширення підлісника європейського на території Західної України. *Теоретичні і практичні аспекти дослідження лікарських рослин*: матеріали I міжнар. наук.-практ. internet-конф., 20 – 21 берез. 2014 р. Х. : Вид-во НФаУ, 2014. С. 178 – 179. (Особистий внесок – збір матеріалу, його аналіз, оформлення тез до друку).

18. Легінь Н. І. Ідентифікація біологічно активних речовин підлісника європейського. *Інновації в медицині*: матеріали 83-ої наук.-практ. конф. студентів і молодих вчених з міжнар. участю, 27 – 28 берез. 2014 р. Івано-Франківськ, 2014. С. 196.

19. Грицик Л. М., Легінь Н. І., Грицик А. Р. Ідентифікація деяких біологічно активних речовин у надземних і підземних органах підлісника європейського *Sanicula europaea* L. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології та біотехнології*: матеріали IV наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 16 – 17 жовт. 2014 р. Х. : Вид-во НФаУ, 2014 С. 88. (Особистий внесок – проведення експериментальних досліджень, узагальнення даних, оформлення тез до друку).

20. Грицик Л. М., Легінь Н. І., Грицик А. Р. Дослідження гемостатичної активності екстрактів підлісника європейського. *Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії*: матеріали I Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., 7 – 8 листоп. 2014 р. Х. : НфаУ, 2014. С. 56 – 57. (Особистий внесок – проведення експериментальних досліджень, узагальнення даних, оформлення тез до друку).

21. Легінь Н. І. Визначення вмісту окиснюваних фенолів в сировині підлісника європейського. *Інновації в медицині*: матеріали 84-ої наук.-практ. конф. студентів і молодих вчених з міжнар. участю, 12 – 13 берез. 2015 р. Івано-Франківськ, 2015. С. 170 – 171.

22. Перспективи використання підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) та астранції великої (*Astrantia major* L.) в медицині та фармації / Л. М. Грицик, Н. І. Легінь, Т. І. Коляджин, А. Р. Грицик. Івано-Франківськ : Супрун В. П., 2017. 100 с. (Особистий внесок – збір матеріалів, узагальнення одержаних даних, оформлення монографії до друку).

Додаток Б

Основні положення дисертаційної роботи доповідалися і обговорювалися на науково-практичних конференціях:

1. 81-а науково-практична конференція студентів і молодих вчених з міжнародною участю “Сучасні проблеми медицини і фармації в наукових розробках студентів і молодих вчених” (Івано-Франківськ, 2012 р.);
2. III Всеукраїнська науково-практична конференція «Хімія природніх сполук» (Тернопіль, 2012 р.);
3. 82-а науково-практична конференція студентів і молодих вчених з міжнародною участю “Інновації в медицині” (Івано-Франківськ, 2013 р.);
4. Міжнародна міждисциплінарна науково-практична конференція «Вода і здоров’я людини» (Ужгород, 2013 року);
5. 5-а науково-практична конференція з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (Тернопіль, 2013 р.);
6. I міжнародна науково-практична internet-конференція «Теоретичні і практичні аспекти дослідження лікарських рослин» (Харків, 2014 р.)
7. 83-я науково-практична конференція студентів і молодих вчених з міжнародною участю “Інновації в медицині” (Івано-Франківськ, 2014 р.);
8. IV наукова-практична конференція з міжнародною участю «Сучасні досягнення фармацевтичної технології та біотехнології» (Харків, 2014 р.);
9. I міжнародна науково-практична internet-конференція «Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії» (Харків, 2014 р.);
10. XI науково-практична конференція за участю міжнародних спеціалістів «Слобожанські читання. Медичне та фармацевтичне право України: інновації, якість, безпека та перспективи розвитку» (м.Харків, 2014 р.).
11. 84-я науково-практична конференція студентів і молодих вчених з міжнародною участю “Інновації в медицині” (Івано-Франківськ, 2015 р.);

12. VIII міжнародна міждисциплінарна науково-практична конференція «Сучасні аспекти збереження здоров'я людини» (Ужгород, 2015);
13. II міжнародна наукова конференція «Агробіорізнноманіття для покращення харчування, здоров'я та якості життя» (Nitra, 2015).



Додаток Д.1



Проректор з наукової роботи Національного
фармацевтичного університету, професор
Г.В. Крутських
«_____» 20__ р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Фармакогностичне дослідження підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) та астранції великої (*Astrantia major* L.).
2. **Установа, автор:** Івано-Франківський національний медичний університет, кафедра фармації, ас. Легінь Н.І., ас. Коляджин Т.І., керівник проф. Грициу А.Р.
3. **Джерела інформації:**
 1. Грицик Л. М., Легінь Н. І., Коляджин Т. І., Грицик А. Р. Перспективи використання підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) та астранції великої (*Astrantia major* L.) в медицині та фармації. / Грицик Л. М., Легінь Н. І., Коляджин Т. І., Грицик А. Р. – Івано-Франківськ : Супрун В. П., 2017. – 100 с.
 2. Ідентифікація видів роду *Sanicula* L. і *Astrantia* L. родини *Apiaceae* L. / Л. М. Грицик, Н. І. Легінь, Т. І. Коляджин, А. Р. Грицик // Український вісник психоневрології. – 2013. – Том 21 № 2 (75) (додаток). С. 76 – 78.
 3. Study of Amino Acid Composition of *Betonica* L., *Sanicula* L., and *Astrantia* L. Genera Species / L. M. Grytsyk, A. R. Grytsyk, I. A. Sas, N. I. Legin, T. I. Kolyadzhin // The Pharma Innovation Journal. – 2016. – No. 5 (7). – P. 46 – 48.
 4. Біологічні особливості та агротехніка вирощування деревію звичайного, рути садової, буквиці лікарської, підлісника європейського та астранції великої / Мельник М. В., Грицик А. Р., Нейко О. В., Сас І. А., Легінь Н. І., Коляджин Т. І. // Матеріали VIII міжнародної міждисциплінарної науково-практичної конференції [«Сучасні аспекти збереження здоров'я людини»] (Ужгород 17 – 18 квітня 2015 року). – Ужгород, 2015. – С. 228 – 231.
 5. Cultivation of *Apiaceae* L. family plants in Precarpathion region / Grytsyk L. M., Legin N. I., Kolyadzhyn T. I., Grytsyk A. R. // Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality. – Nitra: Slovak University of Agriculture, 2015. – Part 1. – P. 216 – 218.
4. **Де впроваджено:** кафедра хімії природних сполук Національного фармацевтичного університету.
5. **Форма впровадження:** навчальний процес, у лекційному курсі.
6. **Ефект від впровадження:** поглиблення знань студентів з питань морфолого-анатомічної будови та хімічного складу підлісника європейського та астранції великої.
7. **Строки впровадження:** 2017-2018 навчальний рік.

Зав. кафедри хімії природних сполук НФаУ,
д. фармацев. н., професор

В.С. Кисличенко

Відповідальний за впровадження:
к. фармацев. н., доцент кафедри хімії
природних сполук НФаУ,

О.М. Новосел

Додаток Д.2

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи ДВНЗ

«Тернопільський державний

медичний університет

імені І.Я. Горбачевського МОЗ України»,

проф. Г.М. Кіш

« 19 » « 02 » 2018 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції для впровадження: Фармакогностичне дослідження підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) та астранції великої (*Astrantia major* L.).

2. Заклад, що розробив, його поштова адреса: ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет»; 76018, м. Івано-Франківськ, вул. Галицька, 2.

3. Прізвище, ім'я, по батькові авторів: Л. М. Грицик, Н. І. Легінь, Т. І. Коляджин, А. Р. Грицик.

4. Джерела інформації:

1. Грицик Л. М., Легінь Н. І., Коляджин Т. І., Грицик А. Р. Перспективи використання підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) та астранції великої (*Astrantia major* L.) в медицині та фармації / Грицик Л. М., Легінь Н. І., Коляджин Т. І., Грицик А. Р. – Івано-Франківськ : Супрун В. П., 2017. – 100 с.

2. Ідентифікація видів роду *Sanicula* L. і *Astrantia* L. родини *Apiaceae* L. / Л. М. Грицик, Н. І. Легінь, Т. І. Коляджин, А. Р. Грицик // Український вісник психоневрології. – 2013. – Том 21, № 2 (75) (додаток). С. 76–78. ●

3. Study of Amino Acid Composition of *Betonica* L., *Sanicula* L., and *Astrantia* L. Genera Species / L. M. Grytsyk, A. R. Grytsyk, I. A. Sas, N. I. Legin, T. I. Kolyadzhin // The Pharma Innovation Journal. – 2016. – No. 5 (7). – P. 46 – 48.

4. Cultivation of *Apiaceae* L. family plants in Precarpathion region / Grytsyk L. M., Legin N. I., Kolyadzhyn T. I., Grytsyk A. R. // Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality. – Nitra: Slovak University of Agriculture, 2015. – P. 216–218.

5. Форма впровадження: навчальний процес, науково-дослідна робота, в лекційному курсі.

6. Ефект від впровадження: поглиблення знань студентів з питань морфолого-анатомічної будови та хімічного складу лікарських рослин родини Зонтичні.

7. Строки впровадження: 2017-2018 навчальний рік.

Завідувач кафедри фармакогнозії з
медичною ботанікою ДВНЗ
«Тернопільський державний медичний
університет імені І.Я. Горбачевського
МОЗ України»,
д. фарм. н., професор



С. М. Марчишин

Додаток Д.3

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи
Вищого державного навчального
закладу України «Буковинський
державний медичний університет»
І.В. Геруш
« 20 » 2018 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Фармакогностичне дослідження підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) та астранції великої (*Astrantia major* L.).
2. **Заклад, що розробив, його поштова адреса:** ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет»; 76018, м. Івано-Франківськ, вул. Галицька, 2.
3. **Прізвище, ім'я, по батькові авторів:** Л. М. Грицик, Н. І. Лєгін, Т. І. Коляджин, А. Р. Грицик.
4. **Джерела інформації:**
 1. Грицик Л. М., Лєгін Н. І., Коляджин Т. І., Грицик А. Р. Перспективи використання підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) та астранції великої (*Astrantia major* L.) в медицині та фармації. / Грицик Л. М., Лєгін Н. І., Коляджин Т. І., Грицик А. Р. – Івано-Франківськ : Супрун В. П., 2017. – 100 с.
 2. Ідентифікація видів роду *Sanicula* L. і *Astrantia* L. родини *Apiaceae* L. / Л. М. Грицик, Н. І. Лєгін, Т. І. Коляджин, А. Р. Грицик // Український вісник психоневрології. – 2013. – Том 21 № 2 (75) (додаток). С. 76 – 78.
 3. Study of Amino Acid Composition of *Betonica* L., *Sanicula* L., and *Astrantia* L. Genera Species / L. M. Grytsyk, A. R. Grytsyk, I. A. Sas, N. I. Legin, T. I. Kolyadzhin // The Pharma Innovation Journal. – 2016. – No. 5 (7). – P. 46 – 48.
 4. Біологічні особливості та агротехніка вирощування деревію звичайного, рути садової, буквиці лікарської, підлісника європейського та астранції великої / Мельник М. В., Грицик А. Р., Нейко О. В., Сас І. А., Лєгін Н. І., Коляджин Т. І. // Матеріали VIII міжнародної міждисциплінарної науково-практичної конференції [«Сучасні аспекти збереження здоров'я людини»] (Ужгород 17 – 18 квітня 2015 року). – Ужгород, 2015. – С. 228 – 231.
 5. Cultivation of *Apiaceae* L. family plants in Precarpathion region / Grytsyk L. M., Legin N. I., Kolyadzhyn T. I., Grytsyk A. R. // Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality. – Nitra: Slovak University of Agriculture, 2015. – Part 1. – P. 216 – 218.
5. **Впроваджено:** у навчальний процес кафедри фармації Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет»
6. **Терміни впровадження:** 2017 - 2018 н. р.
7. **Результати впровадження:** поглиблення знань студентів та провізорів-інтернів щодо розповсюдження, хімічного складу, морфолого-анатомічних особливостей будови та стандартизації сировини, фармакологічної дії та медичного застосування підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) та астранції великої (*Astrantia major* L.).

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри фармації
Вищого державного навчального
закладу України «Буковинський державний
медичний університет» (м. Чернівці)
к.фарм.н., доцент



О.В. Геруш

Додаток Д.4



“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Перший проректор
Київського медичного університету
професор Серeda П.І.

«22» 02 2018 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції для впровадження: Фармакогностичне дослідження підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) та астранції великої (*Astrantia major* L.).

2. Заклад, що розробив, його поштова адреса: ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет»; 76018, м. Івано-Франківськ, вул. Галицька, 2.

3. Прізвище, ім'я, по батькові авторів: Л.М. Грицик, Н.І. Легін, Т.І. Коляджин, А.Р. Грицик

4. Джерела інформації:

1. Грицик Л. М., Легін Н. І., Коляджин Т. І., Грицик А. Р. Перспективи використання підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) та астранції великої (*Astrantia major* L.) в медицині та фармації. / Грицик Л. М., Легін Н. І., Коляджин Т. І., Грицик А. Р. – Івано-Франківськ : Супрун В. П., 2017. – 100 с.

2. Ідентифікація видів роду *Sanicula* L. і *Astrantia* L. родини *Apiaceae* L. / Л. М. Грицик, Н. І. Легін, Т. І. Коляджин, А. Р. Грицик // Український вісник психоневрології. – 2013. – Том 21 № 2 (75) (додаток). С. 76 – 78.

3. Study of Amino Acid Composition of *Betonica* L., *Sanicula* L., and *Astrantia* L. Genera Species / L. M. Grytsyk, A. R. Grytsyk, I. A. Sas, N. I. Legin, T. I. Kolyadzhyn // The Pharma Innovation Journal. – 2016. – No. 5 (7). – P. 46 – 48.

4. Біологічні особливості та агротехніка вирощування деревію звичайного, рути садової, буквиці лікарської, підлісника європейського та астранції великої / Мельник М. В., Грицик А. Р., Нейко О. В., Сас І. А., Легін Н. І., Коляджин Т. І. // Матеріали VIII міжнародної міждисциплінарної науково-практичної конференції [«Сучасні аспекти збереження здоров'я людини»] (Ужгород 17 – 18 квітня 2015 року). – Ужгород, 2015. – С. 228 – 231.

5. Cultivation of *Apiaceae* L. family plants in Precarpathion region / Grytsyk L. M., Legin N. I., Kolyadzhyn T. I., Grytsyk A. R. // Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality. – Nitra: Slovak University of Agriculture, 2015. – Part 1. – P. 216 – 218.

5. Впроваджено: кафедра фармацевтичної хімії та фармакогнозії Київського медичного університету.

6. Терміни впровадження: з 01.09.17 по 01.02.18

7. Результати впровадження: поглиблення знань студентів з питань фармакологічної активності та перспективного використання лікарської рослинної сировини.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри
фармацевтичної хімії та фармакогнозії КМУ
д.фарм.н., професор

«22» 02 2018 р.

О.Ю. Коновалова

Додаток Д.5



Затверджую

Перший проректор

НМАПО імені П.Л. Шупика

чл. кор. НАМН України,

професор Ю.П. Вдовиченко

» 2018 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Фармакогностичне дослідження підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) та астранції великої (*Astrantia major* L.).
2. **Установа, автори:** Івано-Франківський національний медичний університет; 76018, м. Івано-Франківськ, вул. Галицька, 2 Л. М. Грицик, Н. І. Легінь, Т. І. Коляджин, А. Р. Грицик
3. **Джерело інформації** –
 1. Грицик Л. М., Легінь Н. І., Коляджин Т. І., Грицик А. Р. Перспективи використання підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) та астранції великої (*Astrantia major* L.) в медицині та фармації. / Грицик Л. М., Легінь Н. І., Коляджин Т. І., Грицик А. Р. – Івано-Франківськ : Супрун В. П., 2017. – 100 с.
 2. Study of Amino Acid Composition of *Betonica* L., *Sanicula* L., and *Astrantia* L. Genera Species / L. M. Grytsyk, A. R. Grytsyk, I. A. Sas, N. I. Legin, T. I. Kolyadjin // The Pharma Innovation Journal. – 2016. – No. 5 (7). – P. 46 – 48.
 3. Cultivation of Apiaceae L. family plants in Precarpathion region / Grytsyk L. M., Legin N. I., Kolyadzhyn T. I., Grytsyk A. R. // Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality. – Nitra: Slovak University of Agriculture, 2015. – Part 1. – P. 216 – 218.
4. **Впроваджено:** у науковий та освітній процес кафедри контролю якості і стандартизації лікарських засобів.
5. **Термін впровадження:** вересень 2017 року – лютий 2018 року
6. **Ефективність впровадження:** Результати наукових досліджень використані при формуванні інформаційного забезпечення науково-освітнього процесу кафедри.
7. **Пропозиції та зауваження:** немає.

Відповідальний за впровадження:Завідувач кафедри контролю якості і
стандартизації лікарських засобів
професор Н.О. Ветютнева

Додаток Д.6



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор
з науково-педагогічної роботи
ЛНМУ ім. Данила Галицького
член-кор. НАМН України
проф. Гжегоцький М. Р.
« 22 » « 02 » 2018 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції для впровадження: Результати фармакогностичного дослідження підлісника європейського (*Sanicula europea* L.) та астранції великої (*Astrantia major* L.).

2. Заклад, що розробив, його поштова адреса: ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет»; 76018, м. Івано-Франківськ, вул. Галицька, 2.

3. Прізвища, імя, по-батькові авторів: Л. М. Грицик, Н. І. Лєгін, Т. І. Коляджин, А. Р. Грицик.

4. Джерела інформації:

1. Грицик Л. М., Лєгін Н. І., Коляджин Т. І., Грицик А. Р. Перспективи використання підлісника європейського (*Sanicula europea* L.) та астранції великої (*Astrantia major* L.) в медицині та фармації / Грицик Л. М., Лєгін Н. І., Коляджин Т. І., Грицик А. Р. - Івано-Франківськ : Супрун В. П., 2017.-100 с.

2. Доказова інформація: ідентифікація видів роду *Sanicula* L. і *Astrantia* L. родини *Apiaceae* L. / Л. М. Грицик, Н. І. Лєгін, Т. І. Коляджин, А. Р. Грицик // Український вісник психоневрології. - 2013. - Том 21 № 2 (75) (додаток). С. 76 - 78.

3. Study of Amino Acid Composition of *Betonica* L., *Sanicula* L., and *Astrantia* L. Genera Species / L. M. Grytsyk, A. R. Grytsyk, I. A. Sas, N. I. Legin, T. I. Kolyadjin // The Pharma Innovation Journal. - 2016. - No. 5 (7). - P. 47 - 49.

4. Біологічні особливості та агротехніка вирощування деревію звичайного, рути садової, буквиці лікарської, підлісника європейського та астранції великої / Мельник М. В., Грицик А. Р., Нейко О. В., Сас І. А., Лєгін Н. І., Коляджин Т. І. // Матеріали VIII міжнародної міждисциплінарної науково-практичної конференції [«Сучасні аспекти збереження здоров'я людини»] (Ужгород 17 - 18 квітня 2015 року). - Ужгород, 2015. - С. 228 - 231.

5. Cultivation of *Apiaceae* L. family plants in Precarpathion region / Grytsyk L. M., Legin N. I., Kolyadzhyn T. I., Grytsyk A. R. // Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality. - Nitra: Slovak University of Agriculture, 2015. - Part 1. - P.216-218.

5. Де впроваджено: навчальний процес (лекційний курс) та наукова робота викладачів кафедри фармакогнозії і ботаніки.

6. Терміни впровадження: 2017/2018 н.р.

7. Результати впровадження: поглиблення знань студентів з питань морфолого-анатомічної будови, хімічного складу, фармакологічної активності та перспектив використання в медицині підлісника європейського та астранції великої флори України.

Завідувач кафедри фармакогнозії і ботаніки
канд. фарм. наук, доцент

Р. С. Дармограй

Додаток Д.7

“ЗАТВЕРДЖУЮ”



Проректор з наукової роботи
Запорізького державного медичного
університету, професор Гуманський В. А.

” березня 2018 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Фармакогностичне дослідження підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) та астранції великої (*Astrantia major* L.).

2. **Заклад, що розробив, його поштова адреса:** Івано-Франківський національний медичний університет; 76018, м. Івано-Франківськ, вул. Галицька, 2, кафедра фармації.

3. **Прізвище, ім'я, по батькові авторів:** Л. М. Грицик, Н. І. Лєгін, Т. І. Коляджин, А. Р. Грицик.

4. **Джерела інформації:**

1. Грицик Л. М., Лєгін Н. І., Коляджин Т. І., Грицик А. Р. Перспективи використання підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) та астранції великої (*Astrantia major* L.) в медицині та фармації. / Грицик Л. М., Лєгін Н. І., Коляджин Т. І., Грицик А. Р. – Івано-Франківськ : Супрун В. П., 2017. – 100 с.

2. Ідентифікація видів роду *Sanicula* L. і *Astrantia* L. родини *Apiaceae* L. / Л. М. Грицик, Н. І. Лєгін, Т. І. Коляджин, А. Р. Грицик // Український вісник психоневрології. – 2013. – Том 21 № 2 (75) (додаток). С. 76 – 78.

3. Study of Amino Acid Composition of *Betonica* L., *Sanicula* L., and *Astrantia* L. Genera Species / L. M. Grytsyk, A. R. Grytsyk, I. A. Sas, N. I. Legin, T. I. Kolyadzhin // The Pharma Innovation Journal. – 2016. – N 5 (7). – P. 46 – 48.

4. Біологічні особливості та агротехніка вирощування деревію звичайного, рути садової, буквиці лікарської, підлісника європейського та астранції великої / Мельник М. В., Грицик А. Р., Нейко О. В., Сас І. А., Лєгін Н. І., Коляджин Т. І. // Матеріали VIII міжнародної міждисциплінарної науково-практичної конференції. – Ужгород, 2015. – С. 228 – 231.

5. Cultivation of *Apiaceae* L. family plants in Precarpathion region / Grytsyk L. M., Legin N. I., Kolyadzhyn T. I., Grytsyk A. R. // Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality. – Nitra: Slovak University of Agriculture, 2015. – Part 1. – P. 216 – 218.

5. **Впроваджено:** в науково – дослідну роботу кафедри фармакогнозії, фармацевтичної хімії та технології ліків ФПО ЗДМУ.

6. **Терміни впровадження:** 2017-2018 навчальний рік.

7. **Результати впровадження:** методики дослідження *Sanicula europaea* L., *Astrantia major* L. прискорюють процес аналізу рослинної сировини.

8. **Зауваження:** надати отримані результати в відповідні проекти МКЯ.

Відповідальний за впровадження:

Зав. каф. фармакогнозії, фармацевтичної хімії та технології ліків ФПО, проф.

Мазулін О. В.

« 5 » березня 2018 р.

Додаток Д.8

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

*Загальнодержавний вивчальний центр
ДП «Івано-Франківський
метраполіс»*
«14» 03 2018 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції для впровадження: Фармакогностичне дослідження підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) та астранції великої (*Astrantia major* L.).

2. Заклад, що розробив, його поштова адреса: ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет»; 76018, м. Івано-Франківськ, вул. Галицька, 2.

3. Прізвище, ім'я, по батькові авторів: Л. М. Грицик, Н. І. Лєгін, Т. І. Коляджин, А. Р. Грицик

4. Джерела інформації:

1. Грицик Л. М., Лєгін Н. І., Коляджин Т. І., Грицик А. Р. Перспективи використання підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) та астранції великої (*Astrantia major* L.) в медицині та фармації. / Грицик Л. М., Лєгін Н. І., Коляджин Т. І., Грицик А. Р. – Івано-Франківськ : Супрун В. П., 2017. – 100 с.

2. Ідентифікація видів роду *Sanicula* L. і *Astrantia* L. родини *Apiaceae* L. / Л. М. Грицик, Н. І. Лєгін, Т. І. Коляджин, А. Р. Грицик // Український вісник психоневрології. – 2013. – Том 21 № 2 (75) (додаток). С. 76 – 78.

3. Study of Amino Acid Composition of *Betonica* L., *Sanicula* L., and *Astrantia* L. Genera Species / L. M. Grytsyk, A. R. Grytsyk, I. A. Sas, N. I. Legin, T. I. Kolyadjin // The Pharma Innovation Journal. – 2016. – No. 5 (7). – P. 46 – 48.

4. Біологічні особливості та агротехніка вирощування деревію звичайного, рути садової, буквиці лікарської, підлісника європейського та астранції великої / Мельник М. В., Грицик А. Р., Нейко О. В., Сас І. А., Лєгін Н. І., Коляджин Т. І. // Матеріали VIII міжнародної міждисциплінарної науково-практичної конференції [«Сучасні аспекти збереження здоров'я людини»] (Ужгород 17 – 18 квітня 2015 року). – Ужгород, 2015. – С. 228 – 231.

5. Cultivation of *Apiaceae* L. family plants in Precarpathion region / Grytsyk L. M., Legin N. I., Kolyadzhyn T. I., Grytsyk A. R. // Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality. – Nitra: Slovak University of Agriculture, 2015. – Part 1. – P. 216 – 218.

5. Впроваджено:6. Терміни впровадження:7. Результати впровадження:Відповідальний за впровадження:

Л. М. Грицик
ДП «Івано-Франківський
метраполіс»
«14» 03 2018 р.



Додаток Д.9



“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Директор ТОВ «Фітолінк»
 Канд. біол. наук
 Фундатор Володимир
 Просняковський
 “16” березня 2018 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Фармакогностичне дослідження підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) та астранції великої (*Astrantia major* L.).

2. **Заклад, що розробив, його поштова адреса:** ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет»; 76018, м. Івано-Франківськ, вул. Галицька, 2.

3. **Прізвище, ім'я, по батькові авторів:** Л. М. Грицик, Н. І. Лєгін, Т. І. Коляджин, А. Р. Грицик

4. **Джерела інформації:**

1. Грицик Л. М., Лєгін Н. І., Коляджин Т. І., Грицик А. Р. Перспективи використання підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) та астранції великої (*Astrantia major* L.) в медицині та фармації. / Грицик Л. М., Лєгін Н. І., Коляджин Т. І., Грицик А. Р. – Івано-Франківськ : Супрун В. П., 2017. – 100 с.

2. Ідентифікація видів роду *Sanicula* L. і *Astrantia* L. родини *Apiaceae* L. / Л. М. Грицик, Н. І. Лєгін, Т. І. Коляджин, А. Р. Грицик // Український вісник психоневрології. – 2013. – Том 21 № 2 (75) (додаток). С. 76 – 78.

3. Study of Amino Acid Composition of *Betonica* L., *Sanicula* L., and *Astrantia* L. Genera Species / L. M. Grytsyk, A. R. Grytsyk, I. A. Sas, N. I. Legin, T. I. Kolyadzhin // The Pharma Innovation Journal. – 2016. – No. 5 (7). – P. 46 – 48.

4. Біологічні особливості та агротехніка вирощування деревію звичайного, рути садової, буквиці лікарської, підлісника європейського та астранції великої / Мельник М. В., Грицик А. Р., Нейко О. В., Сас І. А., Лєгін Н. І., Коляджин Т. І. // Матеріали VIII міжнародної міждисциплінарної науково-практичної конференції [«Сучасні аспекти збереження здоров'я людини»] (Ужгород 17 – 18 квітня 2015 року). – Ужгород, 2015. – С. 228 – 231.

5. Cultivation of *Apiaceae* L. family plants in Precarpathion region / Grytsyk L. M., Legin N. I., Kolyadzhyn T. I., Grytsyk A. R. // Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality. – Nitra: Slovak University of Agriculture, 2015. – Part 1. – P. 216 – 218.

5. **Впроваджено:** ТОВ «Фітолінк»

6. **Терміни впровадження:** 2012 – 2019 роки

7. **Результати впровадження:** розробка технічної документації та використання в складі фітогаїв

Відповідальний за впровадження:

заст. директора
 ТОВ «Фітолінк»
 Просняковський

«16» березня 2018 р.

Додаток Д.10

“ЗАТВЕРДЖУЮ”
 Перший проректор
 ДВНЗ «Івано-Франківський національний
 медичний університет»
 проф. Ерстенюк А.М.
 2018 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції для впровадження: Фармакогностичне дослідження підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) та астранції великої (*Astrantia major* L.).

2. Заклад, що розробив, його поштова адреса: ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет»; 76018, м. Івано-Франківськ, вул. Галицька, 2.

3. Прізвище, ім'я, по батькові авторів: Л. М. Грицик, Н. І. Легінь, Т. І. Коляджин, А. Р. Грицик

4. Джерела інформації:

1. Грицик Л. М., Легінь Н. І., Коляджин Т. І., Грицик А. Р. Перспективи використання підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) та астранції великої (*Astrantia major* L.) в медицині та фармації. / Грицик Л. М., Легінь Н. І., Коляджин Т. І., Грицик А. Р. – Івано-Франківськ : Супрун В. П., 2017. – 100 с.

2. Ідентифікація видів роду *Sanicula* L. і *Astrantia* L. родини *Apiaceae* L. / Л. М. Грицик, Н. І. Легінь, Т. І. Коляджин, А. Р. Грицик // Український вісник психоневрології. – 2013. – Том 21 № 2 (75) (додаток). С. 76 – 78.

3. Study of Amino Acid Composition of *Betonica* L., *Sanicula* L., and *Astrantia* L. Genera Species / L. M. Grytsyk, A. R. Grytsyk, I. A. Sas, N. I. Legin, T. I. Kolyadjin // The Pharma Innovation Journal. – 2016. – No. 5 (7). – P. 46 – 48.

4. Біологічні особливості та агротехніка вирощування деревію звичайного, рути садової, буквиці лікарської, підлісника європейського та астранції великої / Мельник М. В., Грицик А. Р., Нейко О. В., Сас І. А., Легінь Н. І., Коляджин Т. І. // Матеріали VIII міжнародної міждисциплінарної науково-практичної конференції [«Сучасні аспекти збереження здоров'я людини»] (Ужгород 17 – 18 квітня 2015 року). – Ужгород, 2015. – С. 228 – 231.

5. Cultivation of *Apiaceae* L. family plants in Precarpathion region / Grytsyk L. M., Legin N. I., Kolyadzhyn T. I., Grytsyk A. R. // Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality. – Nitra: Slovak University of Agriculture, 2015. – Part 1. – P. 216 – 218.

5. Впроваджено: в наукову роботу та навчальний процес кафедри фармації ІФНМУ при вивченні тем: «Методи фармакогнозії. Макроскопічний аналіз листків, трав, квітів, коренів, кореневищ, кори, плодів». «Лікарські рослини та лікарська рослинна сировина, що містить флавоноїди».

6. Терміни впровадження: 2017 – 2018 н.р.

7. Результати впровадження: поглиблення знань студентів з питань розповсюдження, хімічного складу, фармакологічної дії та медичного застосування рослин родини Зонтичні, розробка проекту МКЯ.

Завідувач кафедри фармації

проф. А. Р. Грицик

Відповідальний за впровадження:

доцент кафедри фармації

к.фарм.н. Мельник М. В.

«20» березня 2018 р.

Додаток Д. 11



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції для впровадження: Фармакогностичне дослідження підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.).

2. Заклад, що розробив, його поштова адреса: ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет»; 76018, м. Івано-Франківськ, вул. Галицька, 2.

3. Прізвище, ім'я, по батькові авторів: Л. М. Грицик, Н. І. Легінь

4. Джерела інформації:

1. Грицик Л. М., Легінь Н. І., Коляджин Т. І., Грицик А. Р. Перспективи використання підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) та астранції великої (*Astrantia major* L.) в медицині та фармації. / Грицик Л. М., Легінь Н. І., Коляджин Т. І., Грицик А. Р. – Івано-Франківськ : Супрун В. П., 2017. – 100 с.

2. Морфолого-анатомічне дослідження підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) / Л. М. Грицик, Н. І. Легінь, А. Р. Грицик, М. В. Мельник // Фармацевтичний журнал. – 2014. – № 4. – С. 53 – 58.

3. Фенологічні особливості росту та розмноження підлісника європейського / Л. М. Грицик, А. Р. Грицик, Н. І. Легінь, Т. І. Козак // Матеріали міжнародної міждисциплінарної науково-практичної конференції [«Вода і здоров'я людини»] (Ужгород 19 – 20 квітня 2013 року). – Ужгород, 2013. – С. 246 – 249.

4. Грицик Л.М. Одержання екстрактів підлісника європейського / Л. М. Грицик, Н. І. Легінь, А. Р. Грицик // Матеріали 5-ї науково-практичної конференції з міжнародною участю [«Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів»] (Тернопіль 27 – 28 вересня 2013 року). – Тернопіль : «Укрмедкнига», 2013. – С. 34 – 35.

5. Грицик Л. М. Поширення підлісника європейського на території Західної України / Л. М. Грицик, Н. І. Легінь // Матеріали I Міжнародної науково-практичної internet-конференції [«Теоретичні і практичні аспекти дослідження лікарських рослин»] (20 – 21 березня 2014 року). – Х. : Вид-во НФаУ, 2014. – С. 178 – 179.

5. Впроваджено: кафедра ботаніки Національного фармацевтичного університету.

6. Терміни впровадження: 2017-2018 навчальний рік

7. Результати впровадження: поглиблення знань студентів з питань поширення та використання підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.).

Відповідальний за впровадження:

завідувач кафедри ботаніки,
проф. Гонтова Т. М.

«22» березня 2018 р.

Додаток Д.12

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Перший проректор ЗДМУ

доцент Авраменко Н.О.



квітня 2018 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Фармакогностичне дослідження підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.).

2. **Заклад, що розробив, його поштова адреса:** ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет»; 76018, м. Івано-Франківськ, вул. Галицька, 2.

3. **Прізвище, ім'я, по батькові авторів:** Л. М. Грицик, Н. І. Легінь

4. **Джерела інформації:**

1. Грицик Л. М., Легінь Н. І., Коляджин Т. І., Грицик А. Р. Перспективи використання підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) та астранції великої (*Astrantia major* L.) в медицині та фармації. / Грицик Л. М., Легінь Н. І., Коляджин Т. І., Грицик А. Р. – Івано-Франківськ : Супрун В. П., 2017. – 100 с.

2. Морфолого-анатомічне дослідження підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) / Л. М. Грицик, Н. І. Легінь, А. Р. Грицик, М. В. Мельник // Фармацевтичний журнал. – 2014. – № 4. – С. 53 – 58.

3. Фенологічні особливості росту та розмноження підлісника європейського / Л. М. Грицик, А. Р. Грицик, Н. І. Легінь, Т. І. Козак // Матеріали міжнародної міждисциплінарної науково-практичної конференції [«Вода і здоров'я людини»] (Ужгород 19 – 20 квітня 2013 року). – Ужгород, 2013. – С. 246 – 249.

4. Грицик Л.М. Одержання екстрактів підлісника європейського / Л. М. Грицик, Н. І. Легінь, А. Р. Грицик // Матеріали 5-ї науково-практичної конференції з міжнародною участю [«Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів»] (Тернопіль 27 – 28 вересня 2013 року). – Тернопіль : «Укрмедкнига», 2013. – С. 34 – 35.

5. Грицик Л. М. Поширення підлісника європейського на території Західної України / Л. М. Грицик, Н. І. Легінь // Матеріали I Міжнародної науково-практичної internet-конференції [«Теоретичні і практичні аспекти дослідження лікарських рослин»] (20 – 21 березня 2014 року). – Х. : Вид-во НФаУ, 2014. – С. 178 – 179.

5. **Впроваджено:** в лекційний курс з фармакогнозії кафедри фармакогнозії, фармакології та ботаніки ЗДМУ.

6. **Терміни впровадження:** постійно з 1 березня 2018 року.

7. **Результати впровадження:** розширює уявлення студентів про перспективні лікарські рослини родини Зонтичні.

Відповідальний за впровадження: Доцент Мозуль В.І. доцент Денисенко О.М.

Завідувач кафедри фармакогнозії, фармакології та ботаніки ЗДМУ

доцент, д. біол.н. Тржецинський С.Д.

«6» квітня 2018 р.

Додаток Д.13

«ЗАТВЕРДЖУЮ»



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції для впровадження: Фармакогностичне дослідження підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.).

2. Заклад, що розробив, його поштова адреса: ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет»; 76018, м. Івано-Франківськ, вул. Галицька, 2.

3. Прізвище, ім'я, по батькові авторів: Л. М. Грицик, Н. І. Легінь

4. Джерела інформації:

1. Грицик Л. М., Легінь Н. І., Коляджин Т. І., Грицик А. Р. Перспективи використання підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) та астранції великої (*Astrantia major* L.) в медицині та фармації. / Грицик Л. М., Легінь Н. І., Коляджин Т. І., Грицик А. Р. – Івано-Франківськ : Супрун В. П., 2017. – 100 с.

2. Морфолого-анатомічне дослідження підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) / Л. М. Грицик, Н. І. Легінь, А. Р. Грицик, М. В. Мельник // Фармацевтичний журнал. – 2014. – № 4. – С. 53 – 58.

3. Фенологічні особливості росту та розмноження підлісника європейського / Л. М. Грицик, А. Р. Грицик, Н. І. Легінь, Т. І. Козак // Матеріали міжнародної міждисциплінарної науково-практичної конференції [«Вода і здоров'я людини»] (Ужгород 19 – 20 квітня 2013 року). – Ужгород, 2013. – С. 246 – 249.

4. Грицик Л.М. Одержання екстрактів підлісника європейського / Л. М. Грицик, Н. І. Легінь, А. Р. Грицик // Матеріали 5-ї науково-практичної конференції з міжнародною участю [«Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів»] (Тернопіль 27 – 28 вересня 2013 року). – Тернопіль : «Укрмедкнига», 2013. – С. 34 – 35.

5. Грицик Л. М. Поширення підлісника європейського на території Західної України / Л. М. Грицик, Н. І. Легінь // Матеріали I Міжнародної науково-практичної internet-конференції [«Теоретичні і практичні аспекти дослідження лікарських рослин»] (20 – 21 березня 2014 року). – Х. : Вид-во НФаУ, 2014. – С. 178 – 179.

5. Впроваджено: кафедра фармакогнозії Національного фармацевтичного університету.

6. Форма впровадження: навчальний процес (лекційний курс, практичні заняття), наукова робота викладачів кафедри.

7. Ефект від впровадження: поглиблення знань студентів з питань дослідження хімічного складу, фармакологічної активності та перспектив використання підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.).

8. Строки впровадження: 2017-2018 навч. рік.

Завідувач кафедри фармакогнозії
Національного фармацевтичного університету
д. фарм. н, проф.

Відповідальна за впровадження:
к. фарм. н., доц.

Кошовий О.М.

Бородіна Н.В.

Додаток Д.14

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Перший проректор з науково-педагогічної роботи
ДВНЗ «Івано-Франківський державний медичний університет»
проф. С.М. Селішів
«15» 05 2018 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Фармакогностичне дослідження підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.).

2. **Заклад, що розробив, його поштова адреса:** ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет»; 76018, м. Івано-Франківськ, вул. Галицька, 2.

3. **Прізвище, ім'я, по батькові авторів:** Л. М. Грицик, Н. І. Легінь

4. **Джерела інформації:**

1. Грицик Л. М., Легінь Н. І., Коляджин Т. І., Грицик А. Р. Перспективи використання підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) та астранції великої (*Astrantia major* L.) в медицині та фармації. / Грицик Л. М., Легінь Н. І., Коляджин Т. І., Грицик А. Р. – Івано-Франківськ : Супрун В. П., 2017. – 100 с.

2. Морфолого-анатомічне дослідження підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) / Л. М. Грицик, Н. І. Легінь, А. Р. Грицик, М. В. Мельник // Фармацевтичний журнал. – 2014. – № 4. – С. 53 – 58.

3. Фенологічні особливості росту та розмноження підлісника європейського / Л. М. Грицик, А. Р. Грицик, Н. І. Легінь, Т. І. Козак // Матеріали міжнародної міждисциплінарної науково-практичної конференції [«Вода і здоров'я людини»] (Ужгород 19 – 20 квітня 2013 року). – Ужгород, 2013. – С. 246 – 249.

4. Грицик Л.М. Одержання екстрактів підлісника європейського / Л. М. Грицик, Н. І. Легінь, А. Р. Грицик // Матеріали 5-ї науково-практичної конференції з міжнародною участю [«Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів»] (Тернопіль 27 – 28 вересня 2013 року). – Тернопіль : «Укрмедкнига», 2013. – С. 34 – 35.

5. Грицик Л. М. Поширення підлісника європейського на території Західної України / Л. М. Грицик, Н. І. Легінь // Матеріали I Міжнародної науково-практичної internet-конференції [«Теоретичні і практичні аспекти дослідження лікарських рослин»] (20 – 21 березня 2014 року). – Х. : Вид-во НФаУ, 2014. – С. 178 – 179.

5. **Впроваджено:** кафедра фармацевтичної хімії та фармакології
ДВНЗ «Івано-Франківський державний медичний університет»

6. **Терміни впровадження:** 2014-2018 навчальний рік

7. **Результати впровадження:** дозволяє поглибити знання студентів про порівнювальне, хімічний склад, фармакологію дію та медичне застосування підлісника європейського та астранції великої

Відповідальний за впровадження:

Зав. кафедрою фармакології
та фармації ДВНЗ «Івано-Франківський державний медичний університет»
проф. С.М. Селішів
«15» 05 2018 р.

Вр. О.А. Олійник

Додаток Е.1

ПРОЕКТ**ЗАТВЕРДЖЕНО**

Наказ Міністерства охорони
здоров'я України

№ ____ від _____

Реєстраційне посвідчення

№

Заявник, країна _____

Виробник, країна _____

МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

Sanicula europaea L. herbae extractum siccum

Підлісника європейського трава екстракт сухий

*Порошок (субстанція) в пакетах подвійних поліетиленових для
виробництва нестерильних лікарських форм*

Продовж. дод. Е.1

ПАКУВАННЯ

В пакетах подвійних поліетиленових, вкладених в герметично закупорені контейнери.

МАРКУВАННЯ

На етикетці українською або англійською мовою зазначають країну виробника, фірму-виробника, назву субстанції, масу субстанції, умови зберігання, номер серії, термін придатності, штриховий код.

ЗБЕРІГАННЯ

В сухому, захищеному від світла місці.

ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ

2 роки.

Ректор Івано-Франківського
національного медичного
університету



професор М. М. Рожко

« 20 » листопада 2019 р.

Додаток Е.2

ПРОЕКТ**ЗАТВЕРДЖЕНО**

Наказ Міністерства охорони
здоров'я України

№ ____ від _____

Реєстраційне посвідчення
№ ____

Заявник, країна _____

Виробник, країна _____

**МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ
ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ**

Sanicula europaea L. herba

Підлісник європейський трава

Трава, по 50 г у пакетах

Продовж дод. Е.2

На етикетці групової тари додатково зазначають кількість упаковок. Транспортне маркування відповідно до ГОСТ 14192-96.

УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ

У сухому захищеному від світла місці (при температурі 15 – 25 °С).

ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ

3 роки.

Ректор Івано-Франківського
національного медичного
університету



професор М. М. Рожко
« 20 » лютого 2019 р.

Додаток Ж.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 ректор Івано-Франківського
 національного медичного університету
 професор М. М. Рожко
 «14» _____ 2019 р.



ІНСТРУКЦІЯ ІЗ ЗАГОТІВЛІ ТА СУШІННЯ ТРАВИ ПІДЛІСНИКА ЄВРОПЕЙСЬКОГО

Підлісник європейський (*Sanicula europaea* L.) родини Селерові (*Ariaceae*) – багаторічна трав'яниста рослина з повзучим коротким кореневищем і придатковими коренями. Стебло прямостояче, просте, 20 – 50 см заввишки. Прикореневі листки довгочерешкові, пальчатороздільні, з 3 – 5 оберненояйцевидними дво- або тринадрізаними пилчастими частками з зубцями, що закінчуються щетинкою; стеблові – трироздільні короткочерешкові або сидячі, дрібні. Квітки дрібні, 5-пелюсткові, двостатеві (сидячі) і тичинкові (на квітконіжках), у головчастих суцвіттях, зібраних у 3 – 5-променеий зонтик, оточений обгорткою з ланцетних, зубчастих або перистороздільних листочків; пелюстки білі до блідо-рожевих, виїмчасті, з довгою увігнутою всередину верхівкою. Плід – двосім'янка.

Підлісник європейський зростає в тінистих широколистих, рідше змішаних і хвойних лісах. Поширений в Європі, Західному Сибіру, Північній Африці, Західній Азії до Гімалаїв і Цейлону, на Кавказі. На території України *Sanicula europaea* L. поширений у Карпатах і на Правобережжі (східна межа проходить через Київ – Житомир – Вінницю – Гайсин – Ольгопіль – Ямпіль), на лівобережному Поліссі (на вододілі Дніпра та Десни) і в Криму, де зростає поодинокі в тінистих лісах.

Продовж. дод. Ж.

пліснявого грибка, оскільки в цьому випадку вона стане непридатною для застосування. Вихід повітряно-сухої сировини 23 %.

Згідно МКЯ «Підлісник європейський трава» сировина складається з частин стебел з листками, прикориневих листків, квітів. Смак гіркуватий.

Числові показники доброякісності сировини: сума поліфенолів в перерахунку на пірогалол – не менше 10 %, сума гідроксикоричних кислот в перерахунку на розмаринову кислоту – не менше – 1 %, втрата в масі при висушуванні – не більше 10 %, зола загальна – не більше 10,0 %, сторонні домішки – не більше 1 %, мінеральні домішки – не більше 1 %.

Готову сировину пакують в мішки по 15 кг або в тюки по 40 кг. Зберігають на стелажах в сухому, прохолодному, затемненому, добре провітрюваному приміщенні при температурі не вище + 25 °C і вологості 80 %. Термін придатності сировини 3 роки.

Підлісник європейський використовують як кровоспинний, ранозагоювальний, відхаркувальний, в'язучий, седативний, антимікробний засіб і для одержання екстракту з кровоспинною, ранозагоювальною, протизапальною та антимікробною дією.

Доцент кафедри організації та економіки фармації
і технології ліків

Івано-Франківського національного
медичного університету
к.фарм.н.



Л. М. Грицик

Асистент кафедри організації та економіки фармації
і технології ліків

Івано-Франківського національного
медичного університету



Н. І. Легін

Завідуючий кафедри фармації
Івано-Франківського національного
медичного університету
д.фарм.н., професор



А. Р. Грицик

Додаток Й.1

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
ДВНЗ «Івано-Франківський національний
медичний університет»
проф. Вакалюк І. П.
«22»  2018 р.

А К Т

про проведення дослідження гострої токсичності екстрактів з трави та
кореневищ з коренями підлісника європейського

На кафедрі фармації ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет» одержано екстракти з трави та кореневищ з коренями підлісника європейського (виконавець – асистент кафедри фармації Легінь Н. І., керівник – доцент кафедри організації та економіки фармації і технології ліків – к.фарм.н., доц. Грицик Л. М.). Гостру токсичність отриманих екстрактів досліджували при консультативній допомозі завідувача кафедри анатомії людини професора Попадинець О. Г. та доцента кафедри анатомії людини Іваночка В. М.

В Україні підлісник європейський є неофіційною рослиною, його використовують тільки в народній медицині. До фармакопеї Франції включена монографія на сировину підлісника європейського.

У народній медицині підлісник (п.) європейський використовують як кровозупинний, протизапальний, ранозагоювальний, відхаркувальний, жовчогінний, в'язучий, сечогінний, седативний, антимікробний та протигрибковий засіб. Настій трави або відвар кореневищ з коренями вживають при легеневих, шлункових, кишкових, ниркових, маткових та гемороїдальних кровотечах, при запальних захворюваннях шлунково-кишкового тракту, бронхітах та пневмоніях. Зовнішньо його використовують при лікуванні свіжих та гнійних ран, юнацьких вугрів, фурункулів та карбункулів. Як припарки, *Sanicula europaea* L. використовують при лікуванні опіків, обморожень та інших шкірних пошкодженнях. Також сировину використовують для полоскань і промивань при запаленні ясен, слизової оболонки рота і горла, при ангінах, стоматитах тощо [1 – 8].

Настойка кореневищ з коренями вважається засобом, який посилює статеву функцію у чоловіків. Екстракти з надземних органів підлісника європейського використовують для загоєння ран і зупинки кровотечі [1, 4, 5].

Для встановлення безпечності нових лікарських засобів обов'язковим є вивчення їх гострої токсичності.

Вивчення гострої токсичності водних та водно-спиртових екстрактів з трави та кореневищ з коренями підлісника європейського було проведено на білих нелінійних статевозрілих мишах-самцях масою 18 – 22 г, які були вирощені у віварію ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет» та стандартизовані за фізіологічними і біохімічними показниками.

Тварини знаходилися в умовах віварію з дотриманням вимог санітарно-гігієнічних норм, у пластикових клітках на стандартному харчовому раціоні відповідно до діючих норм. Утримання тварин та маніпуляції з ними проводили відповідно до міжнародних та вітчизняних вимог про гуманне ставлення до

Продовж. дод. Й.1

7. Ion Tiță Ethnobotanical inventory of medicinal plants from the South-West of Romania / Ion Tiță, George Dan Mogoșanu, Monica Gabriela Tiță // Farmacia. – 2009. – Vol. 57. 2. – P. 141 – 156.

8. Gruenwald J., Th. Brendler, Ch. Jaenicke (sc. eds.). PDR for Herbal Medicines. – Montvale, NJ: Medical Economics Company, 2000. – 296 – 297 p.

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

10. Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 15.12.2009 р.

11. Біоетична експертиза доклінічних та інших наукових досліджень, що виконуються на тваринах: [методичні рекомендації] / О.Г. Резніков, А.І. Соловйов, Н.В. Добреля, О.В. Стефанов. – Київ, 2006. – 28 с.

12. Доклінічні дослідження лікарських засобів: [методичні рекомендації] / Під. ред. О.В. Стефанова. – К.: Авіцена, 2001. – 528 с.

Завідувач кафедри анатомії людини

 д.мед.н., проф. Попадинець О. Г.

Завідувач кафедри фармації

 д.фарм.н., проф. Грицик А. Р.

Доцент кафедри анатомії людини

 к.мед.н., доц. Іваночко В. М.



Додаток Й.2

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
ДВНЗ «Івано-Франківський національний
медичний університет»

проф. Вакалюк І. П.

«25»  2018 р.

А К Т

про проведення дослідження кровозупинної та ранозагоювальної дій
екстрактів з трави та кореневищ з коренями підлісника європейського

На кафедрі фармації ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет» одержано екстракти з трави та кореневищ з коренями підлісника європейського (виконавець – асистент кафедри фармації Легінь Н. І., керівник – доцент кафедри організації та економіки фармації і технології ліків – к.фарм.н., доц. Грицик Л. М.). Дослідження кровоспинної та ранозагоювальної дій отриманих екстрактів проводили при консультативній допомозі завідувача кафедри анатомії людини професора Попадинець О. Г. та доцента кафедри анатомії людини Іваночка В. М.

В Україні підлісник європейський є неофіційною рослиною. Підземні та надземні органи підлісника європейського вміщують різноманітні за хімічною будовою біологічно активні речовини: органічні кислоти (яблучна, аскорбінова, лимонна, малінова, щавлева); тритерпенові сапоніни; азотовмісні сполуки (алантоїн); гідроксикоричні кислоти (хлорогенова, розмаринова); флавоноїди; дубильні та гіркі речовини; ефірну олію [1].

У народній медицині України використовують траву та кореневище з коренями підлісника європейського у вигляді відварів, настоїв, чаїв або як компонент зборів. Настій трави або відвар кореневищ з коренями вживають при легеневих, шлункових, кишкових та ниркових кровотечах, при запальних захворюваннях шлунково-кишкового тракту та як відхаркувальний засіб. Підлісник європейський застосовують для полоскань і промивань при запаленні ясен, слизової оболонки рота і горла, для примочок і компресів при шкірних висипах, при забоях та гнійних ранах [1].

У Чехії *Sanicula europaea* L. використовують при лікуванні ран, які погано загоюються; на Кавказі – при респіраторних захворюваннях та як ранозагоювальний засіб; в Болгарії – при шкірних захворюваннях [1].

Вивчення кровозупинної дії водного та водно-спиртового екстрактів з трави та кореневищ з коренями підлісника європейського було проведено на

Продовж. дод. Й.2

великої (*Astrantia major* L.) в медицині та фармації. / Грицик Л. М., Легінь Н. І., Коляджин Т. І., Грицик А. Р. – Івано-Франківськ : Супрун В. П., 2017. – 100 с.

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

3. Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 15.12.2009 р.

4. Біоетична експертиза доклінічних та інших наукових досліджень, що виконуються на тваринах: [методичні рекомендації] / О.Г. Резніков, А.І. Соловйов, Н.В. Добреля, О.В. Стефанов. – Київ, 2006. – 28 с.

5. Пат. 103780 Україна, МПК А61К 36/899, А61Р 7/04. Лікарський засіб з кровозупинною дією / Кисличенко В. С., Карпюк У. В. заявник і власник патенту Національний фармацевтичний університет. – № u201507268 ; заявл. 20.07.2015; опубл. 25.12.2015, Бюл. № 24.

6. Данко Г. В. Прорівняльна характеристика лікарського препарату на основі розторопші плямистої із засобами рослинного походження, що використовуються при лікуванні тварин з ранами / Г. В. Данко / Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С. З. Гжицького. – 2010. – Том 12 № 3 (45), Ч. 1. – С. 48 – 53.

Завідувач кафедри анатомії людини

д.мед.н., проф. Попадинець О. Г.

Завідувач кафедри фармації

д.фарм.н., проф. Грицик А. Р.

Доцент кафедри анатомії людини

к.мед.н., доц. Іваночко В. М.



Додаток Й.3

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Проректор з наукової роботи
 Івано-Франківського національного
 медичного університету
 проф. Вакалюк І.П.
 «20» листопада 2016 р.

АКТ

про проведення дослідження протизапальної і антиексудативної активності
 екстрактів підлісника європейського

На кафедрі фармації Івано-Франківського національного медичного університету одержано екстракти трави та кореневищ з коренями підлісника європейського (виконавці – доцент Грицик Л.М. та асистент Легінь Н.І.). Вивчення протизапальної і антиексудативної активності отриманих екстрактів проводили при консультативній допомозі доцента кафедри анатомії людини Іваночка В. М.

Підземні та надземні органи підлісника європейського вміщують різноманітні за хімічною будовою біологічно активні речовини: флавоноїди, тритерпенові сапоніни, дубильні речовини, органічні кислоти, гідроксикоричні кислоти, ефірну олію, азотовмісні сполуки [1].

В Україні підлісник європейський є неофіційною рослиною. У народній медицині використовують траву та кореневища з коренями підлісника європейського у вигляді відварів, настоїв, чаїв або як компонент зборів. Настій трави або відвар кореневищ з коренями вживають при легеневих, шлункових, кишкових та ниркових кровотечах, при запальних захворюваннях шлунково-кишкового тракту та як відхаркувальний засіб. Підлісник європейський застосовують для полоскань і промивань при запаленні ясен, слизової оболонки рота і горла, для примочок і компресів при шкірних висипах, при забоях та гнійних ранах [1].

Вивчення протизапальної і антиексудативної активності екстрактів підлісника європейського (екстрагент вода очищена або 70 % етанол) було проведено на білих нелінійних щурах, які були вирощені у віварії ІФНМУ та стандартизовані за фізіологічними і біохімічними показниками.

Тварини знаходилися в умовах віварію з дотриманням вимог санітарно-гігієнічних норм, у пластикових клітках на стандартному харчовому раціоні відповідно до лікувчих норм. Утримання тварин та маніпуляції з ними

Продовж. дод. Й.3

Отримані результати свідчить про те, що екстракти п. європейського проявляють протизапальну дію. Більш виражену антиексудативну дію проявляють екстракти трави п. європейського, активність яких є вищою за дію референс-препарату кверцетину. Антиексудативна активність екстрактів кореневищ з коренями п. європейського прирівнювалась до дії кверцетину.

Отже, можна зробити висновок про те, що досліджувані екстракти підлісника європейського проявляють достатньо виражену протизапальну дію при карагеніновому набряку та не поступаються за своєю активністю референс-препарату рослинного походження кверцетину.

Література:

1. Грицик Л. М., Лєгін Н. І., Коляджин Т. І., Грицик А. Р. Перспективи використання підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) та астранції великої (*Astrantia major* L.) в медицині та фармації / Грицик Л. М., Лєгін Н. І., Коляджин Т. І., Грицик А. Р. Івано-Франківськ : Супрун В. П., 2017. – 100 с.
2. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council of Europe, Strasbourg, 1986. 53 p.
3. Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 15.12.2009 р.
4. Біоетична експертиза доклінічних та інших наукових досліджень, що виконуються на тваринах: [методичні рекомендації] / О.Г. Резніков, А.І. Соловійов, Н.В. Добреля, О.В. Стефанов. Київ, 2006. 28 с.
5. Монатко К. В., Подплетня О. А., Слесарчук В. Ю. Експериментальне дослідження протизапальних властивостей ліофільного порошку кавуна. *Медичні перспективи*. 2012. Т. 17, № 4. С. 25 – 29.

Завідувач кафедри фармації



д.фарм.н., проф. Грицик А. Р.

Доцент кафедри анатомії людини



к.мед.н., доц. Іваночко В. М.

Додаток К

„ЗАТВЕРДЖУЮ”

ГВО командира військової частини А4520
підполковник м/с С.А. Кармазін**З в і т**

про дослідження наявності бактеріостатичної активності до окремих мікроорганізмів в екстрактах лікарських рослин

В бактеріологічному відділенні 28 СЕЗ (регіональному) МО України в період з 10 по 27 липня 2012 року спеціалістами бактеріологічного відділення (начальником бактеріологічного відділення майором м/с Капелюхою А.К., лікарями бактеріологічного відділення працівниками ЗСУ Сребродольським О.Б., Осадчою Н.Г.) було проведено дослідження 8-ми рослинних екстрактів, наданих завідуючим кафедри фармації Івано-Франківського національного медичного університету Грициком А.Р., на предмет вивчення їх бактеріостатичної здатності.

Для проведення цих досліджень використовувався метод дифузії активної речовини в агар із застосуванням паперових дисків.

Нанесення активної речовини на паперові диски здійснювалось за методикою А.Б. Черномірдіка ("Справочник по применению антибиотиков и других химиотерапевтических препаратов", Москва, 1977 г., с.118-119).

Концентрація активної речовини на дисках складала 5 мг. Для дослідження в якості універсального поживного середовища використовувався 5% кров'яний агар та добові бульйонні культури, на основі 1% цукрового бульйону, в суспензії щільністю 1 млрд. мікробних тіл.

1 мл. бактеріальної суспензії наносився на поверхню 5% кров'яного агару та рівномірно втирався в нього. Посіви інкубувалися при температурі 37^о С на протязі 24 -72 годин в залежності від культуральних особливостей досліджуваної культури. Оцінка впливу активної речовини на мікроорганізми здійснювалась замірами лінійкою діаметру затримки росту мікроорганізмів (в мм.) навколо паперового диску насиченого досліджуваною речовиною. В якості досліджуваних культур використовувались:

- паличкоподібні форми: - *Pseudomonas aeruginosa*;
- *Escherichia coli*;
- *Proteus vulgaris*;
- кокоподібні форми: - *Staphylococcus aureus*;
- *Staphylococcus epidermidis*.

Представлені на дослідження рослинні екстракти мали символічні позначення, які наведені в таблиці.

В результаті проведених досліджень можна зробити наступні висновки:

1. Зазначені зразки рослинних екстрактів затримують ріст паличкоподібної та кокоподібної мікрофлори.
2. Екстракти ПП, ПСТрС, ПСКОрС, ПСКОрВ виявили бактеріостатичну дію проти всіх досліджуваних мікроорганізмів.
3. Екстракти ББ і БЛ виявили найгіршу бактеріостатичну здатність.
4. У екстракта БЛ відмічається бактеріостатична здатність лише щодо кокоподібної мікрофлори.

Продовж. дод. К

Результати досліджень відображено в таблиці.

Таблиця обліку результатів дослідів

№ з/п	Умовне позначен ня	Зона затримки росту мікроорганізмів, мм				
		Pseudomonas aeruginosa	Esherichia coli	Proteus vulgaris	Staphylo coccus aureus	Staphylo coccus epidermidis
1	ПС	0	6	7	6	7
2	ПП	13	16	10	12	10
3	ББ	0	7	0	0	0
4	БЛ	0	0	0	6	7
5	ПЄ Тр С	12	11	10	11	12
6	ПЄ Тр В	0	15	0	15	8
7	ПЄ Кор С	15	9	7	7	11
8	ПЄ КорВ	10	10	9	9	9

Начальник бактеріологічного відділення
військової частини А4520
Майор м/с



Капелюха А.К.

Додаток Л

„ЗАТВЕРДЖУЮ”

Завідуючий Івано-Франківського
міськрайонного відділу ДУ
«Івано-Франківський ОЛЦ МОЗ України»

“ 28 ” квітня 2017 р. С.М. Марцинюк

Звіт

про дослідження мікробіологічної чистоти
рослинних екстрактів

В мікробіологічній лабораторії Івано-Франківського міськрайонного відділу ДУ «Івано-Франківський ОЛЦ МОЗ України» в період з 25 квітня по 28 квітня 2017 року спеціалістами мікробіологічної лабораторії (завідувач Гірак С.Б.) було проведено дослідження 12 зразків рослинних екстрактів, наданих завідуючим кафедри фармації Івано-Франківського національного медичного університету Грициком А.Р., на предмет вивчення мікробіологічної чистоти.

Вивчення мікробіологічної чистоти проводили відповідно до вимог ДФУ, 5.1.4 N, 2.6.13 N. Категорія 3 В.

Випробовування на мікробіологічну чистоту включає кількісне визначення життєздатних бактерій та грибів, а також виявлення певних видів мікроорганізмів, наявність яких не допускається в нестерильних лікарських засобах.

Підготовка зразка. 10 г субстанції поміщали в мірну ємність, доводили об'єм до 50 мл фосфатним буферним розчином з натрію хлоридом та пептоном рН 7,0, гомогенізували, доводили об'єм до 100 мл фосфатним буферним розчином з натрію хлоридом та пептоном рН 7,0 і струшували до отримання однорідної суспензії.

Визначення загальної кількості бактерій. По 1 мл зразка вносили у пробірки, що містять 4 мл розплавленого живильного середовища МПА, охолодженого до 45 °С, швидко перемішували вміст пробірок і переносили на чашки Петрі з 15 – 20 мл середовища МПА. Інкубацію проводили при 37 °С, облік результатів через 24 год.

Визначення загальної кількості грибів. По 1 мл зразка вносили у пробірки, що містять 4 мл розплавленого живильного середовища Сабуро, охолодженого до 45 °С, швидко перемішували вміст пробірок і переносили на чашки Петрі з 15 – 20 мл середовища Сабуро. Інкубацію проводили при 37 °С, облік результатів через 24 – 72 год.

Виявлення *E. coli*. 10 мл кожного зразка вносили в 100 мл рідкого живильного середовища Кода, інкубували при 37°С 24 год. З наступним висівом на тверде живильне середовище Ендо та інкубацією при 37 °С 24 год.

Виявлення бактерій *Salmonella*. 10 г субстанції вносили в 100 мл рідкого живильного подвійного Селенітового середовища інкубували при температурі

Продовж. дод. Л

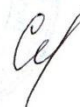
Продовж. табл. 1

АВ-В	Нема росту	Нема росту	Нема росту	Нема росту	Нема росту
АВ-С	Нема росту	Нема росту	Нема росту	Нема росту	Нема росту
ВЗ-В	Нема росту	Нема росту	Нема росту	Нема росту	Нема росту
ВЗ-С	Нема росту	Нема росту	Нема росту	Нема росту	Нема росту

Примітка: нема росту – в 1 г рослинних екстрактах знаходиться менше 10 бактерій.

Результати проведених досліджень свідчать, що представлені для дослідження препарати відповідають вимогам ДФУ щодо мікробіологічної чистоти для нестерильних лікарських засобів.

Завідувач
мікробіологічної лабораторії
Івано-Франківського
міськрайонного відділу ДУ
«Івано-Франківський ОЛЦ МОЗ України»



Гірак С.Б.