

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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Врубель Ольга Романівна

УДК 615.011:615.322:582.688.31:616.5

ДИСЕРТАЦІЯ

**Фармакогностичне дослідження бруслини європейської
(*Euonymus 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

_____ О.Р. Врубель

Науковий керівник Дармограй Роман Євдокимович, кандидат фармацевтичних
наук, доцент

Львів 2021

АНОТАЦІЯ

Врубель О.Р. Фармакогностичне дослідження бруслини європейської (*Euonymus 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». – Львівський національний медичний університет, МОЗ України, Львів, 2021.

Дисертаційна робота присвячена комплексному фармакогностичному дослідженню бруслини європейської, одержанню лектину із кори, розробці комплексної схеми одержання біологічно активних речовин, зокрема жирної олії насіння, вивчення її фармакологічної дії та дослідженню ліпофільних фракцій листя, квіток та кори.

За допомогою якісних реакції, тонкошарової, газової та високоефективної рідинної хроматографії, газової хроматографії мас- спектрометрії, та імунохімічних реакцій (реакція гемаглютинації та пригнічення гемаглютинації) було встановлено наявність в об'єктах дослідження лектинів, жирних кислот, токоферолів, каротиноїдів, алкалоїдів, стероїдів, кардіоглікозидів, сквалену та інших сполук терпенової природи, вуглеводів.

Вперше проведення одержання лектину кори бруслини європейської та здійснено його очистку. Відповідно до розробленого способу очищали лектин шляхом висолювання проводилося хлоридом натрію, діалізом, проведенням іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ-Tojopearl та афінної хроматографією на поперечно-зшитому овомуцині за допомогою елюції боратним буферним розчином (рН 9,0 – 9,8) при температурі +30 - +55°C.

Чистота одержаного лектину досліджена методом електрофорезу та здійснено порівняльне дослідження імунохімічних властивостей лектинів кори та принасінників (арилусів) насіння бруслини європейської. Для проведення гістохімічних досліджень зв'язування лектинів кори та насіння бруслини європейської з глікокон'югатами тканин ссавців було здійснене за допомогою лектинів, мічених пероксидазою хрому. Показано, що лектин кори бруслини європейської зв'язується з тими самими гістологічними структурами, що і лектин

арилусів насіння. Проте лектин, одержаний із кори рослини має перевагу над лектином із насіння у простішому способі очистки, а саме відсутністю процесу знежирення насіння, та у можливості заготівлі сировини протягом цілого року. Досліджено динаміку змін гемаглютинуючої активності лектинів в органах бруслини європейської протягом річного вегетаційного циклу рослини, для вибору найбільш оптимальні терміни заготівлі сировини для очистки цього лектину.

Дослідження вуглеводної специфічності очищеного лектину показало, що лектин не взаємодіє з більшістю випробуваних моно- та дисахаридів. Лише лактоза була слабким інгібітором лектину. Серед високомолекулярних речовин найкращими інгібіторами активності були групоспецифічні речовини крові людини, серед яких групоспецифічна речовина В була найактивнішою. Імуноглобулін G крові людини та антибіотик-глікозид ристоміцину сульфат були слабкими інгібіторами. Лектин не взаємодіяв з гуміарабіком, дріжджовим мананом, підщелепним муцином вівці.

У корі бруслини європейської виділено ще два хітин-зв'язуючі моновалентні лектини. Їх одержання проводилося двома способами: спільно із класичними двовалентним лектином та самотійно, використовуючи як екстрагент 0,9% сульфатну кистоту.

При очищенні лектину насіння на стадії знежирення одержано жирну олію. Вихід жирної олії з насіння при екстракційному способі одержання становив $24 \pm 5\%$. Встановлено її основні фізико-хімічні властивості, кількісні показники такі як кислотне, ефірне, йодне та число омилення фармакопейними методами.

Проведенню вивчення жирнокислотного складу жирної олії, методом газової хроматографії. В результаті дослідження встановлено наявність 9 жирних кислот, серед яких 4 є ненасичені (олеїнова, пальмітоолеїнова, лінолева та ліноленова), які в сумі складають 87,79 % усіх жирних кислот олії бруслини європейської.

Олія бруслини містить також 26 ± 5 мг% каротиноїдів в перерахунку на β -каротин та 40 ± 5 мг% токоферолів в перерахунку на α -токоферол, що було

визначено спектрофотометричним методом. Виявлення токоферолів та каротиноїдів проводили методом тонкошарової хроматографії.

Методом вискоєфективної хроматографії з УФ-детекцією із оберненою фазою (RP-HPLC UV) виявлено та визначено кількісний вміст сквалену у жирній олії насіння, що складає 1,84 мг/мл.

Для дослідження хімічного складу жирної олії було проведено фракціонування за допомогою органічних розчинників, змінюючи їх полярність. Одержано метанольну, ацетонову та хлороформну фракції олії. Метанольна становила близько 17% , ацетонова - 74%. Після випаровування ацетону залишок олії повністю розчинився у хлороформі та становив 5%.

Метанольна та ацетонова фракції були схожими за складом. Методом газової хроматографії мас-спектрометрії виявлено із високою ймовірністю такі речовини абітатрієн, каур-16-єн, гібереліни, лінолеву та пальмітинову кислоти, фуранон (бутенолід). У ацетоновій фракції виявлено сквален, велику кількість проміжних продуктів його синтезу, похідних індолу, аміноциклогексану, ароматичних кетонів.

Хлороформну фракцію додатково розділили колонковою хроматографією на силікагелі. Ідентифіковано такі речовини як ерукамід, вітамін Е, похідні акридину, жирні кислоти (стеаринова, пальмітинова, олеїнова та ліноленова), вуглеводні гексатрикозан, пентатрикозан, октадекан, гама-ситостерол, тетракозагексаєн, 10-деметилсквален та інші.

За допомогою газової хроматографії мас спектрометрії здійснено аналіз ліпофільних речовин, екстрагованих петролейним ефіром з листків та квітів бруслини європейської. Всього в квітках виявлено 28 сполук, а в листі – 19. Кора, квітки і листя бруслини європейської характеризуються високим вмістом парафінових вуглеводів (від $C_{20}H_{42}$ до $C_{31}H_{64}$). Їх вміст є найвищим у квіток (понад 50 % від усіх ліпофільних речовин), а в листі і корі складає біля 35 %. Стероїдні та терпенові сполуки у ліпофільному залишку з листя та кори рослини складають відповідно 28,26 % і 24,32 %. Серед них кількісно переважає фріделін. Звертає на себе увагу доволі високий вміст сквалену в листках рослини. Аналіз одержаних

результатів вказує на більшу перспективність застосування в медицині ліпофільних речовин кори та листків бруслини європейської, ніж квіток.

Встановлено, що бруслина європейська не накопичує токсичних металів, вміст яких визначали методом атомно-абсорбційної спектрометрії з електротермічною атомізацією та встановлено, що вміст важких металів, таких як плумбуму та кадмію не перевищує допустимих норм, тобто не більше 10 мг/кг та 0,3 мг/кг відповідно.

Не виявлено симптомів інтоксикації при введенні олії бруслини європейської у шлунок щурів і її можна віднести до 4 класу небезпеки згідно ГОСТу 12.1.005-88.

Вперше на моделі неалергічного контактного дерматиту досліджена протизапальна активність олії бруслини європейської в порівнянні з олією обліпихи. Вона виявилась менше вираженою, ніж в олії обліпихи, але все ж достатньо високою. Зміни гематологічних та біохімічних показників у досліджуваних тварин (щурів) були достовірно кращими при застосуванні олії бруслини в порівнянні з такими у нелікованих тварин.

Спостерігалася виражена дія настоек усіх досліджуваних видів сировини, а також жирної олії проти пліснявих грибів *Penicillium natatum*, *Aspergillus niger*.

Проведено визначення морфологічних ознак таких видів сировини як листя, кора та насіння. Встановлено основні діагностичні ознаки, що відрізняють бруслину європейську від найближчого дикорослого виду бруслини бородавчастої. Бруслина європейська має чотиригранне стебло зеленого кольору, ребра по краях сіро-бурі, насіння повністю покрите яскраво-помаранчевим принасіником, листя темно-зелене, шкірясте зверху і світліше знизу, проте не опушене.

При проведенні мікроскопічного дослідження сировини встановлено, що продиховий комплекс нижнього епідермісу аномоцитного типу, волоски прості. Зелена кора *Euonymus europaea* L. містить численні хлоропласти у фелодермі. При мікроскопічному аналізі кори встановлено наявність дилатацій, що є діагностичною ознакою сировини.

На основі одержаних у процесі дослідження даних розроблено інструкції по заготівлі кори та насіння, що включають у себе опис, умови заготівлі та сушіння відповідних видів сировини.

При розробці проектів контролю якості насіння рекомендовано параметри стандартизації за морфолого-анатомічними ознаками, кількісним вмістом жирної олії, який складає 25%-35%, втратою в масі при висушуванні не більше 10%, загальною золою не більше 10 %, без сторонніх домішок.

Жирну олію насіння рекомендовано стандартизувати за зовнішніми показниками, густиною (0,939), показником заломлення (1,475), кислотним, йодним, ефірним числами та за числом омилення, тонкошаровою хроматографією та кількісним вмістом суми каротиноїдів у перерахунку на β -каротин та параметрами доброякісності, такими як мікробіологічна чистота, залишкова кількість розчинника та сухий залишок.

У «Лабораторному регламенті одержання лектину з кори бруслини європейської (*Euphytius europaeus* L.)», який впроваджено науково - виробничим кооперативом «Лектинотест» (м. Львів), наведено вимоги до лектиновмісної сировини, опис технологічного процесу, основні параметри контролю на стадіях одержання, ідентифікація та визначення лектину в сировині за допомогою реакції гемаглютинації.

Новизна роботи полягає в наступному. Вперше проведено комплексне фітохімічне вивчення біологічно активних речовин насіння, кори, листя та квіток бруслини європейської. Одержано лектин кори, проведено порівняльний аналіз із лектином насіння. Розроблені схеми фракціонування гідрофільних та ліпофільних фракцій.

Вперше в олії насіння бруслини європейської виявлено та встановлено кількісний вміст сквалену.

Розроблено проекти методів контролю якості «Бруслини європейської насіння» та «Бруслини європейської олія насіння», які включають визначення числових показників, проведення тонкошарової хроматографії та кількісне визначення основних груп речовин.

Розроблено лабораторний регламент «Одержання лектину з кори бруслини європейської» та використано його при проведенні гістологічних досліджень.

Результати хімічного та анатомічного дослідження впроваджено в науково-дослідну роботу споріднених вищих навчальних закладів України.

Ключові слова: бруслина європейська, кора, насіння, листя, квітки, лектини, жирна олія насіння, сквален, дерматит.

Список публікацій здобувача

1. The lectin of the bark of European spindle (*Euonymus europaeus* L.): purification, physico-chemical characteristics and application in histochemical studies/ Vrubel O. R., Sogomonian E. A., Antonyuk V. O. *Biopolymers and Cell*. 2020. V. 36. N 1. P. 3–13. (Особистий внесок - підготовка сировини, проведення експериментальних досліджень, участь у обробці результатів).

2. Комплексне використання кори бруслини європейської (*Euonymus europaea* L.). Дослідження ліпофільних речовин / О. Р. Врубель, А. Р. Зинь, В. О. Антонюк. *Фармацевтичний журнал*. 2016. Т. 6. С. 79-87 (Особистий внесок – підготовка зразків для аналізу, проведення експериментальних досліджень, участь у обробці результатів та підготовці тексту статті).

3. Дослідження ліпофільних речовин листків та квітів бруслини європейської (*Euonymus europaea* L.) / О. Р. Врубель, А. Р. Зинь, В. О. Антонюк. *Фармацевтичний журнал*. 2019. Т. 2. С. 73-79. (Особистий внесок – підготовка зразків для аналізу, проведення експериментальних досліджень, участь у обробці результатів та підготовці тексту статті).

4. Investigation of the chemical composition and efficiency of seed oil of spindle tree (*Euonymus europaea* L.) on the model of non-allergic dermatitis/Vrubel O., Nektegaev I., Antonyuk V. *EUREKA: Health Sciences*. 2018. N 3. P. 45 – 54. (Особистий внесок – підготовка зразків для аналізу, проведення частини експериментальних досліджень, участь у обробці результатів та підготовці тексту статті).

5. Identification and quantification of squalene in Europaeen spindle seed oil (*Euonymus europaeus* L.) by optimized high performance liquid chromatography

(HPLC) procedure / O. Vrubel, O. Korobova, S. Humenyuk , V. Antonyuk. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2019, V.8, N.5, P. 1722-1726.(Особистий внесок – підготовка зразків для аналізу, проведення частини експериментальних досліджень, участь у обробці результатів та підготовка тексту статті).

6. Morphological and anatomical study of the bark, leaves and seeds of *Euonymus europaeus* L. / Vrubel OR, Darmohray RYE and Antonyk VO. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2020. V. 9, N.1, P. 1297-1299. (Особистий внесок – підготовка зразків для аналізу, проведення частини експериментальних досліджень, участь у обробці результатів та підготовка тексту статті).

7. Спосіб одержання лектину бруслини європейської (*Euonymus europaea* L.): пат. 59331 на корисну модель Україна: МПК А61К 36/00 С07К 1/00 № u 201012857; заявл. 29.10. 2010 року, опубл. 10.05.2011 р. Бюл. №9, (Особистий внесок - проведення експериментальних досліджень, здійснення патентного пошуку).

8. Врубель О.Р., Дармограй Р.Є. Види роду *Euonymus* L. Як перспективні джерела нових видів біологічно активних речовин . *Хімія природних сполук* : матеріали Всеукраїнської наук.-практ. конф., 21–22.04. 2016 р. Тернопіль, 2016. С. 48. (Особистий внесок- огляд літературних даних, узагальнення даних та підготовка до оформлення тез)

9. Врубель О.Р, Антонюк В.О. Визначення вмісту каротиноїдів та токоферолів в олії насіння бруслини європейської (*Euonymus europaea* L.) *Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження*: матеріали інтернет-конференції, 5.04.2018. м. Харків, 2018 -С. 30. (Особистий внесок-проведення експериментальних досліджень, участь у обробці результатів).

10. Антонюк В., Врубель О. Дармограй Р., Спосіб одержання хітизв'язуючих білків кори бруслини європейської (*Euonymus europaeus* L.) *Проблеми та перспективи розвитку сучасної науки в країнах Європи та Азії*: матеріали XXVI Міжнародної науково-практичної інтернет - конференції,

30.04.2020, Переяслав - Хмельницький, 2020, С. 23 - 28. (Особистий внесок-проведення експериментальних досліджень, участь у обробці результатів).

11. Vrubel O., Antonyuk V. Obtaining and researching the effectiveness of spindle tree (*Euonymus europaea* L.) oil on non-allergic contact dermatitis 7th *International Weigl conference: theses*. 26-29.09.2017 Lviv, 2017. P. 104. (Особистий внесок-проведення частини експериментальних досліджень, участь у обробці результатів та підготовці тез до друку).

12. Врубель О. Р., Антонюк В.О. Одержання лектинів з кори бруслини європейської *Фармація XXI століття: тенденції та перспективи*: матеріали VIII Національного з'їзду фармацевтів України 13.09-16.09 2016, Київ, 2016, С.54. (Особистий внесок-проведення експериментальних досліджень, участь у обробці результатів та підготовка тез до друку).

13. Кушак О., Цивінська М., Антонюк В. Дослідження жирної олії насіння бруслини європейської *Фармакологія та лікарська токсикологія*: матеріали IV Національного з'їзду фармакологів України. 10-12.10.2011, Київ-2011, С.184. (Особистий внесок-проведення експериментальних досліджень, оформлення тез до друку).

14. Врубель О.Р., Антонюк В.О., Дармограй Р.Є. Дослідження складу олії насіння бруслини європейської (*Euonymus europaeus* L.) *Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини та фармації*: матеріали II Науково-практичної конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю, 15.05. 2020. м.Харків, 2020. С.46. (Особистий внесок-проведення експериментальних досліджень, участь у обробці результатів, оформлення тез до друку).

SUMMARY

Vrubel O.R. Pharmacognostic study of European spindle tree (*Euonymus europaea* L.) - Qualification scientific work with the manuscript copyright.

The thesis for a candidate of pharmaceutical science degree in speciality 15.00.02 "Pharmaceutical chemistry and pharmacognosy". - Lviv National Medical University, Ministry of Public Health of Ukraine, Lviv, 2021.

The thesis is devoted to complex pharmacognostic research of European spindle tree (*Euonymus europaea L.*), obtaining the lectin from the bark, development of complex scheme of extraction of biologically active substances, in particular fatty oil of seeds, study of its pharmacological action and research of lipophilic fractions of leaves, flowers and bark.

By means of qualitative reactions, thin-layer, gas and high-performance liquid chromatography, gas chromatography -mass spectrometry, and immunochemical reactions (hemagglutination reaction and hemagglutination inhibition) the presence of lectins, fatty acids, tocopherols, steroids, carotenoids, cardiac glycosides, squalene and other terpene compounds.

For the first time, the lectin of European spindle tree bark was obtained and purified. According to the developed method of purification of this lectin by salting was performed with sodium chloride, dialysis, ion exchange chromatography on DEAE-Tojoppearl and affinity chromatography on cross-linked ovomucin by elution with borate buffer solution (pH 9.0 - 9.8 + temperature) in the range 30 - + 55°C.

The obtained lectin was studied for electrophoretic purity and a comparative study of the immunochemical properties of lectins of bark and arylus of European spindle tree seeds was performed. Histochemical study of the binding of lectins to the bark and seeds of European spindle tree with glycoconjugates of mammalian tissues was performed using lectins labeled with horseradish peroxidase. It has been shown that the lectin of the European spindle tree bark binds to the same histological structures as the lectin of aryl seeds. However, the lectin of the bark has an advantage over the lectin of arylus seeds in a simpler method of cleaning (no procedure for degreasing the seeds) and in the possibility of harvesting raw materials throughout the year. The dynamics of changes in the hemagglutinating activity of lectins in the organs of European spindle tree during the annual vegetation cycle of the plant was also studied, which allowed to choose the most optimal terms of raw material harvesting for purification of this lectin.

A study of the carbohydrate specificity of purified lectin showed that lectin does not interact with most of the tested mono- and disaccharides. Only lactose was a weak inhibitor of lectin. Among macromolecular substances, the best inhibitors of activity were group-specific substances in human blood, among which group-specific substance B was the most active. Human blood immunoglobulin G and the antibiotic glycoside ristomycin sulfate were weak inhibitors. Lectin did not interact with gum arabic, yeast manna, submandibular mucin of sheep.

Two chitin-binding monovalent lectins have been isolated in European spindle tree bark. They were obtained in two ways: together with the classic divalent lectin and independently, using 0.9% sulfuric acid as an extractant.

During the purification of seed lectin at the stage of degreasing, a fatty oil was obtained, its main physicochemical properties, quantitative indicators such as acid, essential, iodine and saponification numbers by pharmacopoeial methods were established.

The fatty acid composition of the fatty oil was investigated by gas chromatography. The study revealed the presence of 9 fatty acids, of which 4 are unsaturated (oleic, palmitoleic, linoleic and linolenic), which together amount to 87.79% of all fatty acids of European spindle tree oil.

Euonymus oil contains 26 ± 5 mg% of carotenoids in terms of β -carotene and 40 ± 5 mg% of tocopherols in terms of α -tocopherol, which was determined by spectrophotometric method.

High-performance reversed-phase chromatography (RP-HPLC UV) was used to detect and quantify squalene in seed oil at 1.84 mg / ml.

To study the chemical composition of the oil, fractionation was performed using organic solvents, changing their polarity. Methanol, acetone and chloroform fractions of oil were obtained. The methanol fraction was about 17%, acetone - 74%. After evaporation of the acetone, the oil residue was completely dissolved in chloroform and was 5%.

Methanol and acetone fractions were similar in composition. The following substances, abitatriene, kaur-16-ene, gibberellins, linoleic and palmitic acids, furanone

(butenolide), were detected with high probability by gas chromatography by mass spectrometry. Squalene, a large number of intermediate products of synthesis, indole derivatives, aminocyclohexane, aromatic ketones were found in the acetone fraction.

The chloroform fraction was further separated by column chromatography on silica gel. The following substances erucamide, vitamin E, acridine derivatives have been identified fatty acids stearic, palmitic, oleic and linolenic, hydrocarbons hexatricosan, pentatricosan, octadecane, gamma-sitosterol, tetracosahexaene 10-demethylsqualene and others.

Lipophilic substances extracted with petroleum ether from leaves and flowers of European spindle were analyzed by gas chromatography of mass spectrometry. A total of 28 compounds were found in the flowers and 19 in the leaves.

The bark, flowers and leaves of *Euonymus europaea* are characterized by a high content of paraffinic carbohydrates (from $C_{20}H_{42}$ to $C_{31}H_{64}$). Their content is highest in flowers (over 50% of all lipophilic substances), and in the leaves and bark is about 35%.

Steroid and terpene compounds in the lipophilic fraction from the leaves and bark of the plant are 28.26% and 24.32%, respectively. Friedelin predominates among them. The rather high content of squalene in the leaves of the plant attracts attention. The analysis of the obtained results indicates greater prospects for the use in medicine of lipophilic substances of the bark and leaves of *Euonymus europaea* than flowers.

It was found that *Euonymus europaea* did not accumulate toxic metals, the content of which was determined by atomic absorption spectrometry with electrothermal atomization and found that the content of toxic metals such as lead and cadmium does not exceed the permissible norms, ie not more than 10 mg / kg and 0.3 mg / kg, respectively.

No symptoms of intoxication were detected with the introduction of *Euonymus europaea* oil into the stomach of rats and it can be classified as danger class 4 according to GOST 12.1.005-88.

The anti-inflammatory activity of European spindle oil in comparison with sea buckthorn oil was studied in a model of non-allergic contact dermatitis. It was less pronounced than in sea buckthorn oil, but still quite high. Changes in hematological and

biochemical parameters in the studied animals (rats) were significantly better with the use of cowberry oil compared with those in untreated animals.

There was a pronounced effect of tinctures of all studied raw materials, as well as fatty oil against fungus *Penicillium natatum*, *Penicillium glaucum*, *Aspergillus niger*.

The morphological features of such types of raw materials as leaves, bark and seeds were determined. The main diagnostic features that distinguish *Euonymus europaea* from the nearest wild species *Euonymus verrucosa* have been established. *Euonymus europaea* has a quadrangular stem of green color, ribs on the edges of gray-brown, the seeds are completely covered with seeds, bright orange, the leaves are dark green, leathery above and lighter below, but not pubescent.

Microscopic examination of the raw material revealed that the respiratory complex of the lower epidermis of the anocytic type, the hairs are simple. The green bark of *Euonymus europaea* L. contains numerous chloroplasts in the feloderma. Microscopic analysis of the bark revealed the presence of dilatations, which is a diagnostic feature of raw materials.

Based on the data obtained during the study, instructions for harvesting bark and seeds were developed, which include a description, conditions of harvesting and drying of relevant types of raw materials.

When developing seed quality control projects, standardization parameters according to morphological and anatomical features, quantitative indicators, in particular acid and iodine values, which are set to 4 and 120, respectively, weight loss during drying not more than 10%, total ash not more than 10%, without impurities.

It is recommended to standardize the fatty oil of the seed by external indicators, density (0.939), refractive index (1.475), acid, iodine, essential numbers and saponification number, thin layer chromatography and quantitative content of the amount of carotenoids in terms of β -carotene and parameters microbiological purity, residual solvent and dry residue.

The "Laboratory regulations for obtaining lectin from European spindle bark (*Euonymus europaeus* L.)", which was introduced by the research and production cooperative "Lectinotest" (Lviv), contains requirements for lectin-containing raw

materials, description of the technological process, the main control parameters at the stages of production, identification and determination of lectin in raw materials by hemagglutination reaction.

The novelty of the work is as follows. For the first time a complex phytochemical study of biologically active substances of seeds, bark, leaves and flowers of *Euonymus europaea* was carried out. Bark lectin was obtained, comparative analysis with seed lectin was performed. Fractionation schemes of hydrophilic and lipophilic fractions were developed.

For the first time, the quantitative content of squalene was detected and established in European spindle seed oil.

A project of quality control methods "*Euonymus europaea* L. seed oil" has been developed, which includes determination of numerical indicators, thin layer chromatography and quantitative determination of carotenoids.

The laboratory regulations "Obtaining lectin from the bark of *Euonymus europaea* L." were developed and used in histological examinations.

The results of chemical and anatomical research are introduced into the research work of related higher educational institutions of Ukraine.

Key words: *Euonymus europaea* L., bark, seeds, leaves, flowers, lectins, fatty seed oil, squalene, dermatitis.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	18
ВСТУП.....	19
РОЗДІЛ 1 БОТАНІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА, ХІМІЧНИЙ СКЛАД ФАРМАКОТЕРАПЕВТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ БРУСЛИНИ ЄВРОПЕЙСЬКОЇ (<i>EUONYMUS EUROPAEA L.</i>)(огляд літератури).....	26
1.1 Ботанічна характеристика	26
1.2 Основні біологічно активні речовини	29
1.3. Сировинні джерела та локалізація лектинів.....	36
1.4 Біологічна дія бруслини європейської	40
Висновки до розділу 1.....	42
РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	44
2.1 Короткі відомості про об'єкти дослідження, прилади, методи та реактиви.....	44
2.2 Методи дослідження лектинів бруслини європейської.....	46
2.3 Дослідження жирної олії насіння	55
2.4 Виявлення серцевих глікозидів	58
2.5 Визначення кількісного вмісту вуглеводів	58
2.6 Визначення гострої токсичності та дослідження фармакологічної активності олії насіння бруслини на моделі неалергічного контактного дерматиту у щурів..	59
2.7Морфолого-анатомічне дослідження сировинних органів бруслини європейської.....	60
РОЗДІЛ 3 ДОСЛІДЖЕННЯ ЯКІСНОГО СКЛАДУ І КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН БРУСЛИНИ ЄВРОПЕЙСЬКОЇ (<i>EUONYMUS EUROPAEA L.</i>). РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	62
3.1 Фракціонування різних груп БАР за допомогою екстракції розчинниками....	62
3.2 Дослідження лектинів бруслини європейської	64
3.2.1 Дослідження впливу різних факторів на активність лектинів насіння та кори рослини.....	64

3.2.2 Одержання та дослідження лектину кори бруслини європейської.....	.. 67
3.2.3 Очистка лектину кори бруслини європейської.....	69
3.2.4 Одержання лектину насіння бруслини європейської.....	72
3.2.5. Результати порівняльного аналізу лектинів.....	72
3.2.6 Комплексне одержання лектину кори та хітинзв'язуючих білків кори....	77
3.3 Дослідження олії насіння бруслини європейської.....	80
3.3.1 Дослідження жирних кислот методом газової хроматографії.....	85
3.3.2 Дослідження вмісту каротиноїдів та токоферолів олії.....	86
3.2.3Ідентифікація та кількісне визначення сквалену в олії бруслини європейської.....	89
3.4.Дослідження ліпофільних фракцій сировинних органів бруслини європейської.....	92
3.4.1Дослідження ліпофільних фракцій бруслини європейської методом тонкошарової хроматографії.....	92
3.4.2 Дослідження ліпофільних фракцій бруслини європейської методом газової-мас спектроскопії.....	95
3.4.2.1 Дослідження ліпофільних речовин кори бруслини європейської.....	96
3.4.2.2Дослідження ліпофільних речовинлися та квіток бруслини європейської.....	103
3.5 Виявлення кардіоглікозидів та вуглеводів бруслини європейської.....	108
3.6 Дослідження мікроелементів бруслини європейської.....	... 110
Висновки до розділу 3.....	111
РОЗДІЛ 4 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ОЛІЇ НАСІННЯ БРУСЛИНИ ЄВРОПЕЙСЬКОЇ.....	115
4.1 Результати вивчення гострої токсичності.....	.. 115
4.2 Дослідження ефективності жирної олії на моделі неалергічного контактного дерматиту.....	116
4.3 Результати дослідження антимікробної дії олії та настоек кори, насіння, листя та квітів бруслини європейської	120
Висновки до розділу 4.....	122

РОЗДІЛ 5. СТАНДАРТИЗАЦІЯ СИРОВИНИ.....	124
5.1 Дослідження морфолого- анатомічної будови сировинних органів бруслини європейської.....	124
5.1.1 Макрокопічне дослідження бруслини європейської.....	124
5.1.2. Мікроскопічний аналіз листя, кори та насіння бруслини європейської	126
5.2 Розробка методик контролю якості насіння та жирної олії бруслини європейської.....	130
5.2.1Розробка методів контролю якості насіння бруслини європейської.....	130
5.2.2Розробка методів контролю якості жирної олії насіння бруслини європейської.....	132
5.2.3 Розробка інструкцій із заготівлі та сушіння насіння та кори бруслини європейської.....	135
Висновки до розділу 5.....	137
ВИСНОВКИ.....	139
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	141
ДОДАТКИ.....	160

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

БАР- біологічно активні речовини

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

ВЕРХ-МС- високоефективна рідинна хроматографія мас-спектрометрія

ГХ – МС- газова хроматографія мас-спектрометрія

ГХ- газова хроматографія

ДАЕА- диетиламіноетил

ДФУ- Державна фармакопея України

ЗФР- забуферений фізіологічний розчин

ЛРС- лікарська рослинна сировина

ПААГ- поліакрил амідний гель

СФ – спектрофотометрія

ТШХ- тонкошарова хроматографія

ШОЕ- швидкість осідання еритроцитів

Вступ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Важливим завданням сучасної фармацевтичної науки є дослідження лікарських рослин в плані вивчення їх біологічно активних речовин (БАР), встановлення фармакологічної активності отриманих біологічно активних субстанцій для розробки нових лікарських засобів. Актуальним напрямком сучасної системи пошуку, розробки та впровадження нових лікарських засобів рослинного походження є дослідження рослинних засобів народної медицини. Одними із таких видів є представники роду Бруслина (*Euonymus* L.), які здавна використовують в народній медицині як засоби із протизапальними, протипаразитними, проносними та жовчогінними властивостями.

Рід Бруслина (*Euonymus* L.) відноситься до родини Бруслинові (*Celastraceae* Lindl.), включає близько 200 видів. На території України зростає 10 видів цього роду, але широко розповсюджені лише 2 із них, а саме бруслина (б.) європейська (*Euonymus* (*E.*) *europaea* L.) та б. бородавчаста (*E. verrucosa* Scop.). Широке практичне застосування даних рослин було пов'язано із вмістом у їх коренях гутаперчі, проте на сьогоднішній день даний аспект використання втратив актуальність через синтетичний спосіб одержання каучуку.

Відповідно до останніх літературних даних встановлено, що найбільш досліджуваними БАР рослин роду *Euonymus* L. є алкалоїди, сесквітерпени, флавоноїди, жирна олія, білки, зокрема лектини. Екстракти, отримані із різних сировинних органів рослин цього роду, проявляють антиоксиданту, антирадикальну, антимікробну дію та інсектицидну активність. Найширше вивчені представники азійської флори даного роду, зокрема *E. alatus*, *E. fortunei*, *E. acanthocarpus* та ін.

Найбільше практичне значення на сьогоднішній день на території України має б. європейська як джерело нової групи БАР – лектинів. Із насіння цієї рослини отримано лектин, вивчено його основні фізико-хімічні властивості, вуглеводна специфічність, можливість застосування у гістохімічних дослідженнях та судовій медицині. В той же час, у корі цієї рослини також виявлений лектин, але методика

його одержання в літературі не описана. Як показали наші попередні дослідження цей лектин за своїми властивостями має ряд переваг над лектином, отриманим із насіння б. європейської. Тому важливим завданням є розробка методу його виділення із кори, очистка та дослідження біохімічних властивостей в порівнянні з лектином насіння.

Сучасні дослідження б. європейської, як лікарської рослини, стосуються вивчення сесквітерпенових сполук, а також цитотоксичної та протипухлинної дії окремих екстрактів та біологічно активних субстанцій. Однак, усі дослідження є фрагментарними та розглядають цю рослину лише під певним кутом, відповідно до поставлених завдань, а узагальнені та систематизовані дані експериментальних вивчень відсутні.

Отже, дослідження видів роду Бруслина є актуальними та перспективними, оскільки, незважаючи на певні дослідження їх хімічного складу та біологічної дії, відсутнє системне фармакогностичне вивчення представників цього роду, зокрема, б. європейської, яка найбільш поширена на території України.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана згідно з планами проблемної комісії «Фармація» МОЗ та НАМН України і є фрагментом комплексної науково-дослідної роботи Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (№ державної реєстрації 0116U004500, шифр теми ІН 10.06.0001.16)

Мета та завдання дослідження. Метою роботи є системне фармакогностичне дослідження бруслини європейської, розробка комплексної методики отримання БАР з сировини та вивчення фармакологічної дії одержаних біологічно активних субстанцій.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

- провести аналіз літературних даних щодо ботанічної характеристики, географічного розповсюдження, хімічного складу, біологічних особливостей та фармакологічної дії б. європейської;
- дослідити різні сировинні органи б. європейської на наявність лектинів (насіння, кора);

- розробити технологію отримання лектину з кори б. європейської, методи його очистки, встановити біологічну дію та порівняти з лектином насіння;
- дослідити якісний склад, кількісний вміст та фармакологічну активність жирної олії із насіння бруслини європейської, яка одержувалася в процесі виділення й очистки лектину насіння рослини;
- вивчити склад ліпофільних фракцій кори, листя та квіток б. європейської;
- провести морфолого-анатомічний аналіз насіння, листя та кори б. європейської в плані стандартизації нових видів рослинної сировини;
- встановити гостру токсичність і визначити фармакологічну активність отриманих субстанцій.

Об'єкт дослідження – комплексне фармакогностичне дослідження бруслини європейської.

Предмет дослідження – якісний та кількісний склад БАР кори, насіння, листя та квіток б. європейської, дослідження лектинів та жирної олії насіння у комплексній схемі одержання; дослідження ліпофільних фракцій кори, насіння, листя та квіток; вивчення фармакологічної дії жирної олії; макро- та мікроскопічне дослідження сировини.

Методи дослідження. Об'єктами для дослідження були кора, насіння, листя та квітки б. європейської (*E. europaea* L.), зібрані у Львівській області (Городоцький, Пустомитівський, Мостиський та Перемишлянський райони) відповідно до рекомендованих термінів заготівлі сировини.

Для проведення досліджень були використані фізичні, фізико-хімічні, хімічні, технологічні, макро- та мікроскопічні, мікробіологічні, фармакологічні методи та методи математичної статистики.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше проведено комплексне дослідження б. європейської. За допомогою якісних реакції, тонкошарової (ТШХ), газової (ГХ) та високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), газової хроматографії з мас-спектрометрією (ГХ-МС) та імунохімічних реакцій (реакція гемаглютинації та пригнічення гемаглютинації) було встановлено наявність в

об'єктах дослідження в значних кількостях лектинів, жирних кислот, токоферолів, каротиноїдів, стероїдів, сквалену та інших сполук терпенової природи.

Вперше одержано лектин з кори б. європейської та здійснено його очистку з використанням методів осадження, діалізу, центрифугування, афінної, іонообмінної та гель-хроматографії, ліофільного висушування. Здійснено порівняльний аналіз лектинів, виділених з кори та насіння рослини. Встановлено ідентичність одержаних лектинів з використанням сучасних методів електрофорезу, взаємодії з еритроцитами, визначенням вуглеводної специфічності та використанням у гістологічних дослідженнях.

Вперше методом ГХ-МС досліджено хімічний склад жирної олії насіння рослини, отриманої шляхом екстракції гексаном. Методом спектрофотометрії в жирній олії визначено вміст токоферолів (40 ± 5 мг% в перерахунку на α -токоферол) та каротиноїдів (26 ± 5 мг% в перерахунку на β -каротин).

Методом вискоефективної хроматографії з УФ-детекцією із оберненою фазою (RP-HPLC-UV) виявлено та визначено кількісний вміст сквалену у жирній олії насіння рослини, що складає 1,84 мг/мл.

З використанням ГХ-МС здійснено аналіз ліпофільних речовин, екстрагованих петролейним ефіром з листя та квіток б. європейської. Всього у квітках рослини виявлено 28 сполук, а в листі – 19. Кора, квітки і листя б. європейської характеризуються високим вмістом парафінових вуглеводнів (від $C_{20}H_{42}$ до $C_{31}H_{64}$). Їх вміст є найвищим у квітках (понад 50 % від усіх ліпофільних речовин), а в листі і корі складає біля 35 %.

З метою стандартизації нових видів ЛРС шляхом проведення морфолого-анатомічного аналізу сировинних органів б. європейської встановлені основні діагностичні ознаки листя, кори і насіння рослини.

Вперше вивчена гостра токсичність жирної олії насіння б. європейської, а на моделі неалергічного контактного дерматиту досліджена протизапальна активність в порівнянні з олією обліпихи.

Новизну досліджень підтверджено та захищено патентом України на корисну модель «Спосіб одержання лектину бруслини європейської (*Eupytis europaea* L.)». № 59331 від 10.05.2011 р.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено технологічну схему промислової переробки насіння б. європейської, яка передбачає сумісне отримання лектину і жирної олії. За результатами дисертаційної роботи розроблено «Лабораторний регламент одержання лектину з кори бруслини європейської (*Eupytis europaeus* L.)», який використовують в практичній роботі НВК «Лектинотест».

Насіння бруслини європейської запропоновано у якості нового виду ЛРС як джерела біологічно активної субстанції – жирної олії, опрацьовано критерії та параметри її стандартизації і підготовлено проекти МКЯ «Бруслини європейської насіння», «Бруслини європейської олія насіння» та «Інструкції із заготівлі та сушіння насіння бруслини європейської», «Інструкції із заготівлі та сушіння кори бруслини європейської».

Результати наукових досліджень впроваджено в навчальний процес та науково-дослідну роботу кафедри фармакогнозії з медичною ботанікою Тернопільського національного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського; кафедри фармацевтичної ботаніки та фармакогнозії Буковинського державного медичного університету; кафедри хімії природних сполук і нутриціології Національного фармацевтичного університету; кафедри фармакогнозії Національного фармацевтичного університету; кафедри фармакогнозії та ботаніки Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця; кафедри гістології Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького (акти впровадження від 24.12.2020 р., 11.01.2021 р., 06.10.2020 р., 05.11.2020 р., 13.01.2021 р., 25.05.2011 р. відповідно).

Особистий внесок здобувача. Дисертантом самостійно проведено інформаційно-патентний пошук та аналіз літературних даних щодо ботанічної характеристики, хімічного складу, фармакологічних властивостей, особливостей використання б. європейської. Разом з науковим керівником здобувачем визначені

мета, завдання, методики експериментальних досліджень. Проведено заготівлю сировини, вивчення якісного складу і кількісного вмісту БАР б. європейської, підготовку проб для проведення ГХ, ГХ-МС, ВЕРХ та фармакологічних досліджень. Досліджено морфолого-анатомічні особливості будови листя, кори та насіння досліджуваної рослини та розроблено проєкти МКЯ на нові перспективні види лікарської рослинної сировини та субстанції, одержані із них. Обґрунтовано технологію спільного одержання лектинів та ліпофільних сполук із кори та насіння бруслини європейської. Здійснено статистичну обробку, аналіз та узагальнення отриманих результатів, оформлено усі розділи дисертаційної роботи. Дисертантом взято безпосередню участь в оформленні статей, тез доповідей та патенту України на корисну модель. Наукові роботи опубліковані у співавторстві з науковим керівником Дармограєм Р. Є. та науковцями, спільно з якими проведені дослідження - Антонюком В. О., Нектегаєвим І. О., Коробовою О.В., Гуменюк С. В., Зинь А. Р., Согомоян Є. А., Цивінською М. П.

Апробація результатів досліджень. Основні результати дисертаційної роботи викладено на Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Хімія природних сполук» (Тернопіль, 2016); VIII Національному з'їзді фармацевтів України (Київ, 2016); 7-ій міжнародній Weigl конференції (Львів, 2017) ; I міжнародній науково - практичній інтернет-конференції «Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження» (Харків 2018); II Науково-практичній конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини та фармації» (Харків, 2020); науково-практичній дистанційній конференції з міжнародною участю «Сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження» (Івано-Франківськ, 2020); XXVI Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Проблеми та перспективи розвитку сучасної науки у країнах Європи та Азії», (Переяслав - Хмельницький, 2020).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 14 наукових праць, із яких 6 статей (3 статті у міжнародних фахових виданнях (1-Естонія та 2- Індія), 1 у виданні, що включене до міжнародних наукових баз даних, 1 – у фаховому науковому виданні України), 7 тез доповідей та 1 патент на корисну модель.

Обсяг та структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 173 сторінках машинописного тексту, складається зі вступу, 5 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел та 8 додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає 137 сторінки друкованого тексту. Робота ілюстрована 25 таблицями, 44 рисунками. Список використаних джерел містить 195 найменувань, з них 69 кирилицею та 126 латиницею.

**РОЗДІЛ 1. БОТАНІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА, ХІМІЧНИЙ СКЛАД
ФАРМАКОТЕРАПЕВТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ БРУСЛИНИ
ЄВРОПЕЙСЬКОЇ (*EUONYMUS EUROPAEA* L.) (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)**

Клас Дводольні - Dicotylédones

Порядок Бруслиноцвіті - Celastrales

Родина Бруслинові - Celastraceae

Рід Бруслина - *Euonymus*

Вид Бруслина європейська – *Euonymus europaea* L.

1.1 Ботанічна характеристика. Бруслина європейська (*Euonymus europaea* L.) належить до родини бруслинових (Celastraceae). Це –кущ заввишки 1,5-2 м, рідше дерево висотою 2-5 м [1-2]. Згідно із класифікацією Міжнародного союзу з охорони природи (Червоний список МСОП) має найнищий ризик зникнення [3]. Стовбур і старі гілки сірувато-бурі, із корковими наростами по кутах, молоді гілки зеленого кольору, в перерізі круглі, які згодом стають чотиригранними з буруватими опробковілими ребрами [4,6-8].

Листки рослини черешкові, супротивні, довгасто-еліптичні або обернено-яйцеподібні, 1,5-7 (до 11) см довжини, злегка шкірясті, зверху голі, знизу по жилках короткоопушені; біля основи клиноподібні, край листової пластинки дрібнозубчастий. Черешки жолобчасті, довжиною 2-15 мм . Восени листя стає жовто-зеленого або малинового кольору [9-11].

Квітки зібрані в півзонтики з нерозвиненою серединною квіткою, 2–5-квіткові, приквітки шиловидні, зближені з ними приквіточки лусковидні, нерідко залишаються біля основи квітконіжки. Пелюстки подовгасті, 2–5 мм завдовжки, зеленуваті; тичинки з жовтуватими пиляками.

Плід - поникла коробочка, має чотири гнізда, розкривна, грушовидної форми, на кінці вдавлена, помітно чотирилопатева 7-13 мм довжини, гладка, гола, недозріла – зелена, дозріла – яскраво-пурпурова. Насінини по одному в гнізді, обернено-яйцеподібні, білуваті, цілком покриті помаранчевим складчастим принасінником (арилусом) [13-14].

У роботі [15] вивчались квіткові нектарники бруслини європейської, що мають форму чотирикутного диска, розташованого на квітколожі, і являють собою тип відкритих нектарників, які легко доступні для запилення комахами. Зелені нектарники бруслини європейської являють собою тип фотосинтетичних мезенхіматозних нектарників, що складаються з епідермісу та залозистої тканини. Залозиста паренхіма містить хлоро- або хлороамілопласти, тобто місце синтезу вуглеводів, необхідних для продукування нектару. Унікальною особливістю підродини *Celastroideae* є наявність епідермальних секреторних клітин у нектарниках квіток бруслини європейської, крім цього у пиляках є друзи оксалату кальцію, що є діагностичною ознакою серед рослин роду *Euonymus* [15].

Вивчення будови принасіників (арилусів) бруслини європейської було предметом дослідження групи російських вчених. Встановлено, що принасіник бруслини європейської, який повністю вкриває насінину, складчастий, двошаровий, кожен шар вкритий кутикулою. Клітини шарів витягнуті перпендикулярно насінині. В клітинах рясні помаранчеві жирові включення двох видів: великі різних розмірів та маленькі однакові за розміром. В клітинах ендосперму і сім'ядолей часто зустрічаються дрібні помаранчеві жирові включення. Будова принасіника бруслини бородавчастої, близького виду, відрізняється тим, що він є багат шаровим, ззовні покритим кутикулою. Жирові включення дрібні, в внутрішніх шарах арилуса їх більше, ніж у двох зовнішніх. Принасіник (арилус) вкриває насінину бруслини бородавчастої не повністю [16,17].

Яскраво-помаранчеві арилуси бруслини європейської мали найвищий вміст каротиноїдів порівняно із іншими чагарниками зі схожими умовами проростання. Крім цього арилус містить значну кількість ліпідів (36–54% сухої маси).

Ареал бруслини європейської охоплює усю Європу. На півночі вона поширюється до південної частини Швеції, на сході — до Кавказьких гір та Малої Азії.

В Україні найчастіше трапляється у лісовій та лісостеповій зонах. Бруслина європейська є світлолюбною рослиною і найчастіше проростає у відкритих чагарникових заростях, в підліску широколистяних та змішаних лісів зростає поодинокі або невеликими групами, вона є найбільш поширеним видом роду *Euonymus* флори України [6-20].

В усіх європейських країнах популяції цього виду достатньо численні і не потребують охорони. Дослідження, проведені у Великій Британії, свідчать, що незважаючи на те, що в минулому бруслини європейська спеціально вилучалася з живоплотів та лісових масивів як засіб боротьби проти бобової попелиці, її нинішні популяції є стабільними. Повторне обстеження лісового масиву Nature Conservancy з 1971 року в 2001 році виявило, що популяція бруслини європейської не змінилася за частотою зустрічності як дерев, так і саджанців. Бруслину європейську розводять як декоративну рослину, а також вводять в полезахисні лісові смуги, проте їх не рекомендовано розміщувати у районах вирощування цукрового буряка, оскільки ці рослини мають спільного шкідника-бобову попелицю [1].

В ґрунтовному огляді «Biological Flora of the British Isles : *Euonymus europaeus* L.» детально описано умови проростання, вплив клімату та середовища на мінливість цієї рослини, шкідників, характерних для бруслини та зроблено опис основних сфер застосування [1]. Відповідно до результатів досліджень умов проростання відзначено, що ймовірною причиною поширення бруслини європейської лише у складі групи насаджень (одиночні екземпляри майже не зустрічаються) пов'язане швидше із способом розмноження за допомогою птахів, а не умовами середовища, наприклад вологістю. Найбільш привабливим для поїдання птахами є соковитий арилус, а не сама насінина. При розмноженні рослини насінням, проводять схожу операцію, видаляючи арилус для кращого проростання.

Розмножується бруслина європейська пагонами при торканні гілок до вологого ґрунту або живцями. Рослина тіневитривала, проте зустрічається частіше на освітлених ділянках у густих заростях, що ймовірно зумовлено

розповсюдженням насіння птахами. Бруслина європейська росте достатньо повільно, близько 60 см за 2 роки, стійка до морозу (пагони витримували температуру -30-40 °C), при дослідженні стійкості до посухи чи сильної заболоченості результати середні. Терміни вегетації незначно відрізняються у різних зонах проростання, зокрема встановлено, що листя рослини розпускається протягом квітня - травня, плоди повністю дозрівають до кінця жовтня. Проростання при посіві плодів відбувається у другій половині квітня, що було встановлено в умовах розсадника.

1.2 Основні біологічно активні речовини бруслини європейської

У 2012 р. опубліковано огляд китайських вчених щодо стану дослідження рослин роду *Euonymus* [21,23-24]. Найбільш вивченими, згідно з цими даними є види *E. alatus*, *E. yaponicus*, *E. fortunei*. Згідно даних авторів огляду найтипівішими та найпоширенішими речовинами у видів даного роду є тритерпеноїди, сесквітерпени (дигідро-β-агарофуранового типу), флавоноїди, жирні кислоти, алкалоїди (ксантинові, сесквітерпенові піридинові та ін.) стероїди, карденоліди, лігнаноїди та інші [25-36]. Ряд різних сесквітерпенів, алкалоїдів, карденолідів, поліізопреноїдів та тритерпенів було виявлено і у бруслини європейської у насінні, листі та коренях рослини [10,21].

Характерною особливістю багатьох видів роду Бруслина є наявність в тканинах гутаперчі, яка була вперше виявлена у 1932 р., вміст якої може сягати до 35 %, при чому в коренях її більше ніж в інших органах.

У коренях бруслини європейської, гутаперча накопичується у ідіобластах первинної кори коренів, що стало причиною дослідження даної рослини як промислового джерела цієї речовини. Проте з втратою актуальності гутаперчі дослідження хімічного складу бруслини продовжились у напрямку вивчення жирної олії, оскільки її вміст у рослині є досить високим. Згодом дослідження хімічного складу бруслини продовжились у напрямку вивчення жирної олії, оскільки її вміст у рослині є досить високим [17].

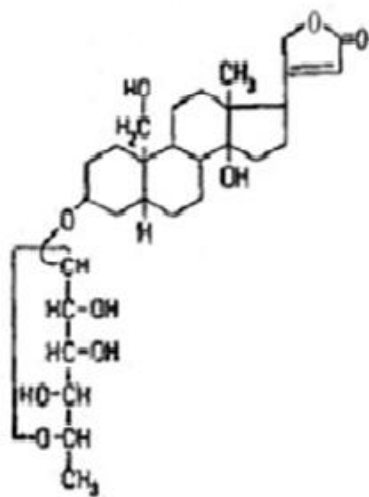


Рис. 1.1 Евонолозид

Дослідження бруслини європейської проводилось українськими вченими С.Г. Кисличенком, І.Ф. Макаревичем, Д.Г. Колесниковим [37-40], зокрема вивчали серцеві глікозиди насіння рослини, карденоліди (евонозид, евобіозид, евомонозид, евоногенін та ін.) (Рис. 1.3).

Хроматографією на папері встановлено, що в насінні міститься не менше вісім карденолідів. Глікозиди екстрагували 70%-вим спиртом, карденоліди очищували екстракцією хлороформом, та сумішшю спирт-хлороформ (1:2). Хлороформні і спиртово-хлороформні витяжки упарювали роздільно і залишки хроматографували на колонках з оксидом алюмінію.

Було виділено евонолозид, який мав доволі високу біологічну активність (10 370 КОД) (Рис 1.1).

Після кислотного гідролізу було отримано в кристалічному стані аглікон, ангідроаглікон, цукровий компонент. Аглікон за фізико-хімічними властивостями і даними ІЧ-спектроскопії ідентифікований авторами як канногенол, а моносахарид – як L-рамноза.

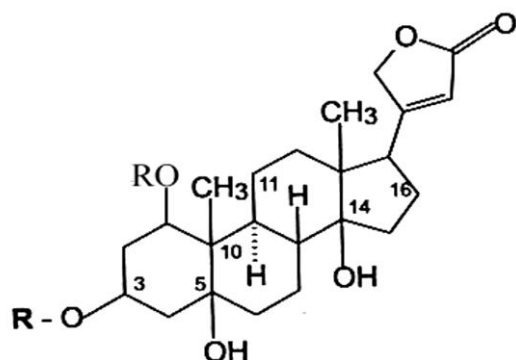


Рис.1.2 Евоногенін

Продовжуючи дослідження карденолідного складу бруслини європейської, автори виділили ще одну речовину. Після встановлення її структури було дано назву евоногенін (рис 1.2). Евоногенін виявляє кардіотонічну активність, приблизно рівною активності периплогеніну, який був виділений із обвійника грецького *Periploca graeca* L.

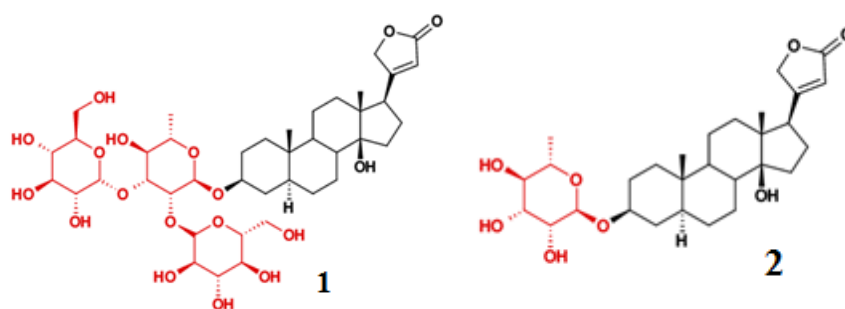


Рис. 1.3 Серцеві глікозиди бруслини європейської. 1- евонозид, 2- евомонозид

Основні алкалоїди бруслини європейської належать до групи сесквітерпенпіридинових, що є складними ефірами сесквітерпенових спиртів і піридинкарбонових кислот (евонін, ізоевонін, еворин, евозин, евонолін, еуонімін, неоеуонімін; сумарний вміст в насінні-0,1%) (Рис 1.4). Залежно від того якою піридинкарбоною кислотою етерифіковане дигідроагарофуранове ядро ці алкалоїди поділяються на евоніати (евонікова кислота), вілфордати (вілфординова) та інші [41,46].

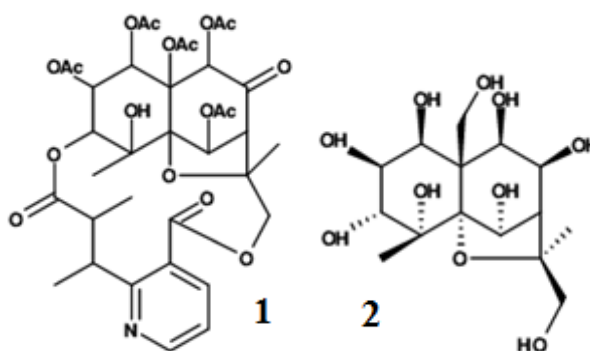


Рис. 1.4 Алкалоїди 1- евонін, 2- еунімінол

У роботі Bishay D. et al. (1973) встановлено, що серед алкалоїдів бруслини європейської є 3 р-арилокси макроциклічні пептидні алкалоїди франгуланін, франганін та франгуфолін спільно із 1-бензилтетрагідроізохіноліновим алкалоїдом, армепавином, який проявляє антифібротний ефект як *in vitro* так і *in vivo* дослідження на щурах, а також має протизапальну та цитотоксичну дію (рис. 1.5) [41-42, 44].

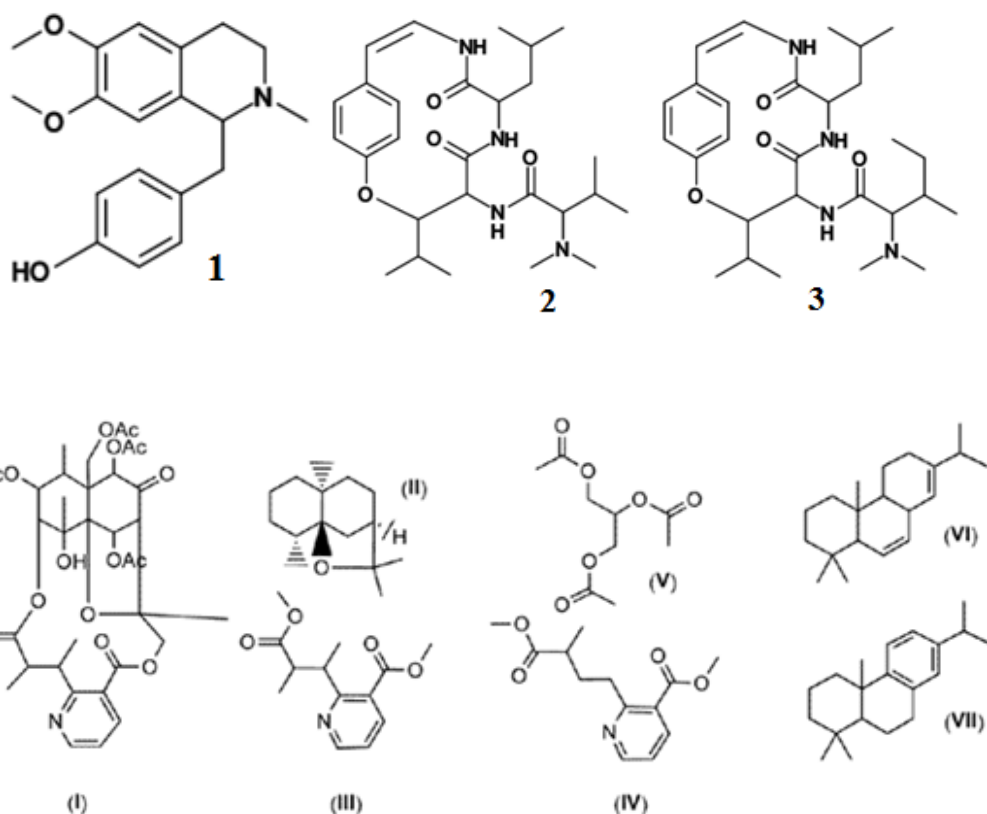


Рис.1.5 Структурні формули алкалоїдів бруслини європейської. 1- армепавин, 2- франганін, 3- франгуланін.

Алкалоїди евонінового типу (I) складаються з гідроксильованого ядра дигідроагарофурану (II), яке етерифіковане рядом піридинкарбонових кислот (III-вілфординова, IV-евонікова) та оцтовою кислотою. Крім цього виділені сесквітерпени насіння абітадієн VI та абітатрієн VII (рис.1.5).

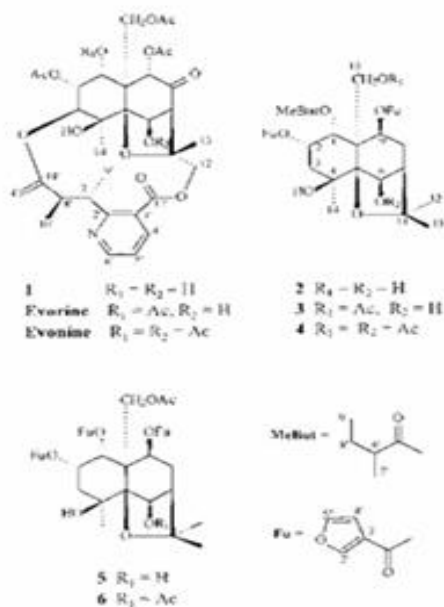


Рис.1.6 Сесквітерпени бруслини європейської

У складі бруслини європейської є також сесквітерпени дигідро- β -агарофуранового типу, в основі яких знаходиться трициклічний 5,11-епокси-5 β , 10 α - еудезма-4(14)-ен скелет. Дослідження сесквітерпенів насіння бруслини європейської проводилося різними авторами [47-51]. У 2002 р. дослідження сесквітерпенів проводила група іспанських вчених. У результаті

було одержано із насіння бруслини європейської сесквітерпеновий алкалоїд (1), 2 сесквітерпени (2,3) з дигідроагарофурановим скелетом спільно із відомими раніше сесквітерпенами (4-6) (Рис. 1.6) [46]. Для цього висушені плоди екстрагували сумішшю етанол-гексан (1:1) з подальшою хроматографією одержаної олії на Sephadex LH-20 сумішшю *n*-гексан–CHCl₃–MeOH (2 : 1 : 1) і силікагелі сумішшю гексан-етилацетат, збільшуючи полярність. Далі проводили тонкошарову хроматографію в системі дихлоретан-ацетон (8.5 : 1.5) [47].

Біологічно активні речовини насіння

Крім зазначених вище біологічно активних речовин у насінні бруслини європейської є ще каротиноїди: β-каротин, криптоксантин, зеаксантин, епоксид зеаксантину, вуглеводи: глюкоза, рамноза, сахароза, флавоноїди: кемпферол.

Жирна олія насіння у кількості понад 30 %, в її складі гліцериди кислот : пальмітинової, міристинової, стеаринової, олеїнової, лінолевої, цис-ліноленової, транс-ліноленової, пальмітоолеїнової, елаїдинової. Вищі жирні кислоти: пальмітинова, міристинова, олеїнова, ерукова, лінолева, ліноленова [53-58].

Основними біологічно активними речовинами листя є алкалоїди еворин, евозин і евонін, армепавін, евонін, еворин, кофеїн, теофілін, франгуланін, франганін, франгофолін та ін. Евонін- складний ефір сесквітерпенового спирту евонікової кислоти, яка є похідною нікотинової кислоти. Флавоноїди, з яких в основному глікозиди кемпферолу і кверцетину: 3-рамнозидо-7-глюкозид кемферолу, 7-глюкозид кверцетину, 3-галактозид, 3-арабінозид, 3-рамнозид кверцетину, 3-рамно глюкозид і 3,7-диглюкозид кверцетину, рутин, кверциметрин, бересклетин, який є глікозидом кверцетину, ацилірований кофейною кислотою [10,27,32,35]. Лейкоантоціани: лейкоціанідин, лейкодельфінідин. Антоціани: 3-глюкозид і 3-галактозид ціанідина, вуглеводи, циклітоли (дульцит), каротиноїди β-каротин, криптоксантин, зеаксантин, епоксид зеаксантину; в листі –тритерпеноїди (фриделін, α-амірин та ін.), стероїди (β-ситостерин), бутеноліди, ізосифонодин [3-гідроксиметил-2 (5H) -фуранон], разом із слідом сифонадину [4-гідроксиметил-2 (5H) –фуранон] [59-62].

З кори та листя бруслини європейської були виділені два структурно різні білки, що зв'язують хітин (Ее-СВР та Ее-хітиназа). Обидва вони мають протигрибкові властивості і є потужними антимікробними пептидами (AMP) (Van den Bergh et al. 2002, 2004) [63-70].

Хітинзв'язуючі пептиди. Пептиди рослин, як біологічно активні речовини, можуть бути біорегуляторами, відігравати роль у захисті від фітопатогенів, бути високотоксичними до комах та молюсків та брати участь у системі стійкості до впливу біотичних та абіотичних факторів. До таких пептидів відносяться антибактеріальні та інсектицидні пептиди. На основі амінокислотної послідовності і просторової структури їх ділять на кілька груп: дефензини, тіоніни, гевеїно- і нотіноподібні пептиди та циклотиди. Оскільки антимікробні пептиди володіють широким спектром антимікробної активності, вони представляють інтерес для розробки лікарських препаратів нового покоління, а також для підвищення стійкості сільськогосподарських рослин методами генної інженерії. [63-64]

З кори бруслини європейської очистили хітинзв'язуючий пептид (Ее-СВР), що складається з 45 амінокислот (4992.5 Da) і має протимікробні і протигрибкові властивості. Цей пептид не є глікозилізованим, має ізоелектричну точку при рН 11,81 і позбавлений екзо- і ендохітиназної активності [65]. Цей пептид зв'язує хітин (що є полімером N-ацетил-D-глюкозаміну), і може розглядатись як лектин з одним центром зв'язування вуглеводів, через що його неможливо виявити за допомогою реакції гемаглютинації.

За структурою даний пептид відноситься до гевеїнового типу. Він містить 10 залишків цистеїну, що утворюють 5 дисульфідних зв'язків, які в результаті надають молекулі високу структурну стабільність. Хоча первинна структура цього так званого білка, що зв'язує хітин *E. europaeus*, дуже схожа на домен гевеїну, вона відрізняється від більшості раніше ідентифікованих антимікробних пептидів типу гевеїну наявністю двох зайвих залишків цистеїну, що утворюють додатковий дисульфідний зв'язок. Завдяки цим п'яти дисульфідним зв'язкам Ее-СВР є надзвичайно стабільним білком. На протигрибкову активність не впливає

кип'ятіння пептиду протягом 10 хв або тривале зберігання. Ee-SBP стабільний у широкому діапазоні рН (від рН 2 до рН 11). Дослідження показали, що Ee-SBP є потужним антимікробним білком. Для гриба *Botrytis cinerea* спостерігали значення IC50 від 1 мкг / мл. Порівняльні аналізи також показали, що Ee-SBP є сильнішим інгібітором росту грибів, ніж Ac-AMP2 з насіння *Amaranthus caudatus*, який вважається одним із найпотужніших протигрибкових рослинних білків гевоїну.

Перевіряли, протигрибкову дію Ee-SBP, порівнювали морфологію різних грибів, вирощених у присутності та відсутності білка. Мікроскопічний аналіз показав, що Ee-SBP суттєво впливає на морфологію досліджуваних грибів. Зазвичай спостерігаються ефекти цибулини, виділення спор, гіфальне розгалуження та затримка росту. Ці мікроскопічні спостереження добре узгоджуються з результатами гевоїну та IWF4, протигрибкового пептиду з листя буряка. Окрім грибів, Ee-SBP також пригнічував ріст грампозитивних бактерій, але не грамнегативних бактерій та дріжджів. Ee-SBP виявляє сильнішу протимікробну активність, ніж Ac-AMP2, щодо більшості випробуваних грибів. Наприклад, IC50 Ee-SBP у 16 і в шість разів нижчий, ніж у Ac-AMP2 для *A. brassicicola* та *F. oxysporum* sp. Лише для *Deuteromycete P. exigua* Ee-SBP був трохи менш активним, ніж Ac-AMP2.

Оскільки Ee-SBP не має ані екзо-, ані ендохітіназної активності, протигрибкова активність білка, швидше за все, пояснюється високою спорідненістю білка до хітину та олігомерів β -1,4-N-ацетил-глюкозаміну. Ця активність, що зв'язує хітин, очевидно, залежить від присутності добре збережених ароматичних амінокислот та N-кінцевого залишку піроглутамату. Слід зазначити, однак, що хітинзв'язувальна активність Ee-SBP сама по собі не може пояснити інгібуючу активність щодо ооміцетів (які не містять хітину в клітинній стінці) та грампозитивних бактерій. Подальші дослідження щодо способу дії Ee-SBP будуть потрібні перед його використанням для генно-інженерних цілей, окремо або в поєднанні з іншими захисними білками рослин.

Разом із даним пептидом з кори бруслини європейської була виділена хітиназа, цистеїновий зв'язок якої такий же, як і у пептиду. Вони обидва, як гевоїн-подібний хітин-зв'язуючий білок (Ee-CBP), так і хітиназа класу-1 (Ee-chitinase) володіють протигрибковими властивостями, але Ee-CBP має сильнішу дію.

В додаток, вони виявляють різко виражену синергічну дію, при спільному застосуванні [68].

Оскільки хітин не виявлений у клітинах рослин, але широко поширений у грибах, комах, нематодах, було припущено, що хітинзв'язуючі білки беруть участь у захисті рослини від патогенів шляхом взаємодії з мембраною мікроорганізмів, порушуючи її проникність. Тому цей пептид неактивний проти ооміцетів і грам-позитивних бактерій, які не містять хітину.

У роботі бельгійських вчених [65] хітинзв'язуючий білок бруслини європейської екстрагували із свіжозібраної ліофільно висушеної сировини 0,2 М розчином NaCl. Очищали на колонці хітину. Промивали колонку 0,2 М NaCl, після чого пептид елюювали 20 мМ оцтовою кислотою з подальшим 48 годинним діалізом проти цієї кислоти.

1.3 Сировинні джерела та локалізація лектинів.

Насіння різних видів роду Бруслина було досліджено з метою виявлення лектинів, які можуть знайти застосування в судово-медичній експертизі (Потапов, 1970). Зокрема, було знайдено, що екстракти *E. europaea*, *E. bungeana*, *E. sieboldiana*, *E. latifolia*, *E. sachalinensis*, *E. Maackii* вміщують анти-B+N лектини, а оболонки насінин *E. elata* та *E. sacrosancta* вміщують анти-B₁ лектини. Продовжуючи ці дослідження, Кочетковою (1981) було знайдено, що екстракти з оболонок насінин *E. Maackii* Rupr., *E. pauciflora* Maxim., *E. macroptera* Rupr. вміщують лектини анти-B в титрах від 1:4 до 1:512. При дослідженні кори *E. europaea* також було знайдено анти B+N лектин, і очевидно, кора як і насіння може бути сировинним джерелом для одержання лектину. Однак, лектин, пропонований відомими закордонними фармацевтичними фірмами, одержують з насіння рослини [71,75].

Одержання та фізико-хімічні властивості. Вперше про лектин з властивостями анти-В+Н в екстрактах з насіння *E. europaeus* було повідомлено у 1954 р. Schmidt (цит. по Goldstein, Poretz, 1986). Автор повідомляв, що після сорбції на еритроцитах активність анти-В значно підвищувалась. Однак, Krüpe (1956) не підтвердив даних про два окремих лектини. Подальші дослідження (Потапов, 1970; Расак, Косореk, 1975; Petryniak e. a., 1977) підтвердили, що така активність належить одному білку [71,72].

Расак, Косореk (1975) очистили лектин з оболонки насіння *E. europaeus*, застосовуючи висолювання сульфатом амонію та препаративний електрофорез на ПААГ. Ними було одержано дві активні фракції, одна з яких була гомогенна, а інша давала розмиту зону в ПААГ і була сумішшю ізолектинів. Обидві фракції мали дуже близький амінокислотний склад, в якому переважала аспарагінова кислота, аланін та гліцин. Молекулярна маса першої фракції - 127 кДа, а для другої фракції встановлено 129 кДа. Вони відрізнялись також вмістом вуглеводів: перша фракція містила 4,7 % нейтральних вуглеводів, а друга - 1,9 %. В складі лектину були виявлені також іони кальцію, магнію, цинку та міді. Однак, присутність ЕДТА не впливала на гемаглютинуючу активність [73].

Petryniak e. a. (1977) очистили лектин насіння за допомогою афінної сорбції на імобілізованій А+Н субстанції шлунку свині на полілейцині з наступним елююванням лектину лактозою. З 1 кг насіння за такою методикою можна одержати 320-650 мг лектину. За даними ізоелектричного фокусування лектин складався з 6 ізоформ, ізоелектричні точки яких лежали в діапазоні рН 4,3-4,7. Молекулярна маса лектину - 167 кДа. При електрофорезі в ПААГ в присутності DDS-Na та 2-меркаптоетанолу 80 % білку розпадалось на поліпептиди з мол. масою 17 кДа, а решту становили недисоційовані субодиниці з молекулярними масами 35, 53 та 67 кДа. Лектин у своєму складі вміщував 10 % ковалентно зв'язаних вуглеводів, в т.ч. 4,8 % D-галактози, 2,9 % D-глюкози, 2,8 % N-ацетил-D-глюкозаміну. Амінокислотний склад цього лектину представлений в таблиці 1.1.

Хімічний склад лектину *E. europaeus* (Petryniak e. a.,1977).

Аміно-кислота	Залишків на 167 кДа	Аміно-кислота	Залишків на 167 кДа	Аміно-кислота	Залишків на 167 кДа
Lys	40,0	Val	80,1	His	51,2
Arg	29,0	Met	12,0	Ile	49,4
Asp	169,5	Leu	95,2	Thr	77,7
Ser	68,0	Pro	81,2	Tyr	65,1
Phe	10,0	Trp	45,7	Gly	86,7
Glu	80,4	Ala	109,6	1/2Cys	16,3
Глюкозамін	18,5	Галактоза	44,5	Глюкоза	97,0

Дещо пізніше Petryniak e.a. (1977) для очистки лектину застосували десіалізовані NM-активні еритроцитарні глікопротеїни, приєднані до Сефарози 2В. Лектин елюювали за допомогою лактози. Одержаний препарат був подібний до описаного раніше [71].

Взаємодія з вуглеводами та глікокон'югатами. Взаємодію з моно- та олігосахаридами було вивчено Petryniak e. a. (1977). Пізніше ці дані були доповнені результатами вивчення реакції преципітації між лектином та синтетичними глікокон'югатами [72]. Деякі дані цих досліджень представлені в таблиці 1.2.

Центр зв'язування вуглеводів у лектині бруслини європейської має значну протяжність і є комплементарним до вуглеводу наступної структури:

L Fuc α 1

↑2

DGal α (β)1-3D Gal β 1-3(або4)GlcNAc

На відміну від високоспецифічних лектинів анти-В він нечітко диференціює α - і β - зв'язок термінальної D-галактози, що можливо є причиною перехресної реакції з групоспецифічною речовиною Н. Порівняно невеликі зміни в структурі цього олігосахариду приводять до зменшення або взагалі до зникнення взаємодії з вуглеводом. Моносахариди L-фукоза та D-галактоза не пригнічують активності цього лектину, але, будучи термінальними залишками, вони є найбільш суттєвими для взаємодії лектину з вуглеводом. Відщеплення термінальної L-фукози приводить до значного зниження активності інгібітора. В той же час,

дифукоолігосахариди майже не взаємодіють з лектином. Тому лектин не взаємодіє з групоспецифічними речовинами Le^a та Le^b, а також не аглютинує еритроцити O_hLe^a та O_hLe^b ("Бомбей"-типу) і не преципітує синтетичні глікокон'югати Le^a-BSA та Le^b-BSA [72]. В той же час групоспецифічні речовини A₂, HLe^a та HLe^b були лише дещо менш активні, ніж групоспецифічна речовина В.

Табл.1.2

Структури олігосахаридів, що взаємодіють з лектином
бруслини європейської [88]

Структура олігосахариду	Концентрація в мкМ, що дає 50 % пригнічення
$\begin{array}{ccc} \text{Fuc } \alpha 1 & & \text{DGal } \beta 1 \\ \uparrow 2 & & \uparrow 3 \\ \text{D Gal } \alpha 1-3\text{D Gal } \beta 1-4\text{D GlcNAc } \beta 1-6\text{NAcD-} \\ \text{галактозамінітол} \end{array}$	3,5
$\begin{array}{c} \text{L Fuc } \alpha 1 \\ \uparrow 2 \\ \text{D Gal } \alpha 1-3\text{D Gal } \beta 1-4\text{D GlcNAc } \beta 1-6-3\text{-гексентетрол} \end{array}$	3,5
$\begin{array}{c} \text{L Fuc } \alpha 1 \\ \uparrow 2 \\ \text{D Gal } \alpha 1-3\text{D Gal } \beta 1-3\text{D GlcNAc } \beta 1-3/\text{або } 4\text{-D-} \\ \text{галактітол} \end{array}$	3,5
$\begin{array}{c} \text{L Fuc } \alpha 1 \\ \uparrow 2 \\ \text{D Gal } \alpha 1-3\text{D Gal } \beta 1-3\text{D GlcNAcD-галактозамінітол} \end{array}$	300
$\begin{array}{c} \text{L Fuc } \alpha 1 \\ \uparrow 2 \\ \text{D Gal } \beta 1-3\text{D GlcNAc } \beta 1-3\text{D Gal } \beta 1-4\text{D Glc} \\ \text{(лакто-N-фукопентаоза-1)} \end{array}$	350
L-Fuc α 1-2D Gal β 1-4D Glc (2-фукозиллактоза)	2500
D Gal α 1-6D Glc (мелібіоза)	220 000
D Gal β 1-4D Glc (лактоза)	290 000
$\begin{array}{ccc} \text{L Fuc } \alpha 1 & & \text{L Fuc } \alpha 1 \\ \uparrow 2 & & \uparrow 2 \\ \text{DGal } \beta 1-3 \text{ DGlcNAc } \beta 1-3\text{DGal } \beta 1-4\text{Glc} \\ \text{(лакто-N-фукогексаоза 1)} \end{array}$	25 000 (26 % пригнічення)

L Fuc α 1 $\uparrow$ 2 DGal β 1-4 DGlc (лактодифукотетроза)	L Fuc α 1 $\uparrow$ 2 DGal β 1-4 DGlc (лактодифукотетроза)	4 000 (0 % пригнічення)
---	---	----------------------------

Лектин бруслини європейської за своєю імунохімічною специфічністю близький до лектину лугового опенька (*Marasmius oreades*), який також проявляє відносну специфічність до В-еритроцитів людини. Порівняльне вивчення взаємодії цих двох лектинів з глікосфінголіпідами показало важливість α - 2-зв'язаної фукози в структурі олігосахариду для обох лектинів. Але лектин бруслини європейської володіє ширшою вуглеводною специфічністю. Більша толерантність лектину з цієї рослини проявлялась у його взаємодії з глікосфінголіпідами наступної структури, з якими лектин *M. oreades* не взаємодівав: GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer та GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer. Глікосфінголіпіди GalNAc α 3[Fuc α 2]Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer та GalNAc α 3Gal β 4 GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1-Cer не розпізнавались обома лектинами, незважаючи на взаємодію з Gal α 3[Fuc α 2]Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer та Gal α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer. Ці результати пояснюються абсолютною необхідністю вільного гідроксилу при 2-ій позиції Gal α 3 і що лектин бруслини європейської може пристосовуватись до залишків GlcNAc замість термінального вуглеводу, в той час як для лектину *M. oreades* така заміна не характерна (Teneberg e. a., 2003) [84].

1.4 Фармакологічна дія бруслини європейської

Рослини родини Celastraceae проявляють в основному такі види біологічної активності як протипухлинна, інсектицидна, протидіабетична, протизапальна, антимікробна та інші [21-23, 92-111]. Бруслина європейська, зокрема, виявляє антибактеріальну активність. Кора гілок рослини застосовується в народній медицині як антигельмінтний та інсектицидний, молоді гілки-діуретичний, послаблюючий, інсектицидний засоби. Листки мають протистоксидні, антигельмінтні, протипаразитарні властивості використовуються при дерматомікозах. Плоди рослини застосовуються у гомеопатії при гострому ентероколіті, холері, а у народній медицині, як блювотний та сильний

послаблюючий засоби, при малярії, хворобах печінки, діуретичний засіб при асциті, гонореї та антигельмінтний, протипаразитарний, інсектицидний засоби для лікування домашніх тварин у ветеринарії, при лікуванні дерматомікозів та екземи людей. Жирну олію з насіння використовують при екземі, дерматомікозах [36].

У дослідженні [92] проводилось вивчення біологічної дії екстрактів насіння бруслини європейської. Дихлорметановий і метанольний екстракти виявили інгібуючу дію проти *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus plantarum* та *Proteus mirabilis*. Метанольний екстракт також пригнічував ріст *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* та *Serratia marcescens*. Найбільш значуща антибактеріальна активність досліджуваних екстрактів спостерігали проти *E. faecalis*. Гексановий екстракт не виявляв інгібіторної активності у тестовій концентрації, крім цього значної загальної токсичності гексанового екстракту в тестових концентраціях не виявлено.

Якісний аналіз DPPH на основі ТШХ w15,16x. У кількісному аналізі DPPH w15,16x, значення IC для екстрактів н-гексану, DCM та MeOH становили $2,4 \times 10^{-2}$, $5,6 \times 10^{-2}$ та $7,2 \times 10^{-2}$ мг/мл відповідно, для позитивного контролю використовували кверцетин, добре відомий антиоксидант ($2,88 \times 10^{-5}$ мг/мл).

У спільному дослідженні австрійських та американських науковців встановлено, що і олія і метанольний екстракт насіння бруслини європейської проявляли інсектицидну дію проти *A. aegypti* та *A. americanum* у концентрації 0.206 мг/см^2 [49].

У 2017 р. проводилося вивчення протипухлинної активності насіння та плодів бруслини європейської на клітинах меланоми людини [112,113]. У цьому дослідженні вивчався протипухлинний ефект in vitro водно-спиртового екстракту бруслини європейської, отриманого із свіжих плодів рослини. Якісний та кількісний аналіз цього екстракту, який проводився з використанням ВЕРХ-МС, показав наявність в значних кількостях еводіаміну, потужної протиракової сполуки (рис. 1.7). Клітини меланоми in vitro інгібувались залежно від концентрації екстракту, ($IC_{50} = 6,76 \text{ мкг / мл}$), і вони були майже вдесятеро

чутливішими, ніж фібробласти ($IC_{50} = 53,08$ мкг / мл). Бруслина європейська виявила значну і селективну протипухлинну активність.

Протипухлинна дія еводіаміну, який є індолквіназоліновим алкалоїдом, спостерігалася на ряді інших клітин.

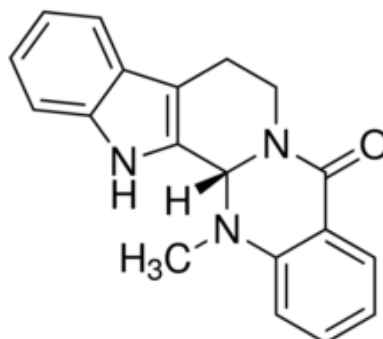


Рис. 1.7 Еводіамін, алкалоїд бруслини європейської.

Висновки до розділу 1

Бруслина європейська є широко розповсюдженим видом на території України, який мав широке практичне застосування у зв'язку із вмістом у коренях гутаперчі. На сьогоднішній день рослина більш відома як джерело нової групи БАР – лектинів, зокрема із насіння бруслини європейської отримано лектин, вивчені його основні фізико-хімічні властивості, вуглеводна специфічність, доведена можливість використання у гістохімічних дослідженнях та судовій медицині. В інших сировинних органах цієї рослини також виявлені лектини, однак в літературі відсутні дані про їх виділення, вивчення біохімічних властивостей, перспектив використання в медицині та фармації.

Тому виділення та вивчення лектинів із сировинних органів бруслини європейської, насамперед кори, опрацювання технологій комплексної переробки насіння рослини, вивчення складу ліпофільних фракцій сировинних органів, якісного складу, кількісного вмісту та фармакологічної активності жирної олії, а також перспектив її використання в науковій медицині та фармації є актуальним та важливим.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Види роду *Euonymus* L. Як перспективні джерела нових видів біологічно активних речовин./ Врубель О.Р., Дармограй Р.Є. *Хімія природних сполук* : матеріали конф., 21–22 квіт. 2016 р. Тернопіль, 2016. С. 48

РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Короткі відомості про об'єкти дослідження, прилади, методи та реактиви

Об'єктами дослідження були кора, листя, квітки та насіння бруслини європейської, які заготовляли відповідно до рекомендованих термінів заготівлі сировини у Львівській області (Городоцький, Пустомитівський, Мостиський та Перемишлянський райони).

Рослинну сировину висушували в сушильній шафі при $+50^{\circ}\text{C}$ до повітряно-сухого стану.

Реактиви, які були використані в роботі, мали кваліфікацію «Ч.Д.А.» або «Х.Ч.».

Для екстрагування лектину з насіння рослинну сировину після подрібнення обробляли гексаном. У результаті на даному етапі одержали жирну олію у кількості 21-28%, яка досліджувалася окремо у рамках комплексного одержання із сировини. Лектини із сировини екстрагували 1 % розчином натрію хлориду.

Ліпофільні речовини кори рослини досліджували шляхо отримання їх із сировини після екстракції лектинів при комплексному фракціонуванні. При дослідженні ліпофільних речовин листя та квіток одержували петролейноефірні (гексанові), хлороформні та метанольні екстракти.

Хімічний склад одержаних ліпофільних фракцій визначали за допомогою газової хроматографії-мас-спектрометрії (ГХ-МС).

Ідентифікацію речовин у фракціях здійснювали за допомогою мас-спектрометра 6C/MS Agilent Technologies 6890 N/5975 B, приєднаного до хроматографічної колонки (модель HP-5MS, довжина 30 м, діаметр 0,25 мм, наповнювач: 95% диметилполісилоксан + 5% дифенілполісилоксан); газ-носій – гелій з постійним потоком 1,5 мл/хв). Колонку промивали метанолом. Газова хроматографія була запрограмована на рівень зростання температури на $15^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ від 75°C до 300°C . Початкова температура підтримувалася протягом 1 хв, а кінцева – протягом 8 хв. Використовували мас-селективний детектор із температурою інтерфейсу $T = 250^{\circ}\text{C}$. Іонізацію здійснювали електронним ударом, енергія

іонізації – 70 eV, температура іонного джерела 230 °C; температура квадруполя – 150 °C.

При проведенні очищення та фракціонуванні екстрактів використовували колонкову хроматографію на силікагелі. Іонобмінну хроматографію проводили на катіоніті DEAE-Tojoparl виробництва Tojo-Soda (Японія). Афінну хроматографію здійснювали на поперечно-зшитому овомукоїді, одержаному за описаним методом [85].

Визначення значення рН в рослинних екстрактах здійснювали за допомогою рН-метра (рН-340), осадження лектинів з екстракту здійснювали за допомогою нейтральних солей та етилового спирту. В якості нейтральних солей було випробувано амонію сульфат та натрію хлорид.

Для дослідження якісного та кількісного складу БАР використовували реакції ідентифікації, сучасні методи хроматографії: ТШХ, ГХ, ГХ-МАС, ВЕРХ, СФ.

Для мікроскопічного дослідження використовували мікроскоп Olympus bx51 (Olympus, Японія), оснащений високоапартурними об'єктивами 1,5x, 5x, 10x, 40x та камерою LUMC-B11/Sony (Labtron, ВБ). Обробку одержаних знімків здійснювали за допомогою комп'ютерних програм.

Отримані результати експериментальних досліджень обробляли статистично, використовуючи стандартний пакет статистичних програм Statistica 4.3.

При виконанні досліджень із залученням тварин та біоматеріалів керувалися чинними принципами біоетики. Робота з тваринами поводитись згідно з "Загальними етичними принципами експериментів на тваринах, що узгоджуються з положеннями "Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та наукових цілей" (Страсбург, 1986 р. із змінами, внесеними в 1998 р.), Директивою Ради Європи 2010/63/EU , Законом України №3447-IV "Про захист тварин від жорстокого поводження".

Протокол дослідження узгоджено із комісією з питань етики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (витяг з протоколу №2 від 15.02.2016р.) та протоколом №9 комісії з питань етики

наукових досліджень, експериментальних розробок і наукових творів ЛНМУ ім. Д. Галицького від 21.12 2020 р.

2.2 Методи дослідження лектинів у екстрактах

Лектини в екстрактах з сировинних органів бруслини виявляли за допомогою реакції гемаглютинації з використанням відмитої від сироватки крові 2 % суспензії еритроцитів людини О, А та В груп та тварин різних видів у забуференому фізіологічному розчині. Еритроцити крові людини були отримані у Львівській обласній службі крові, а еритроцити кролика, щура, миші та морської свинки у віварії Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького. Еритроцити качки та курки були взяті на птахофабриці, розміщеній у Пустомитівському районі Львівської області.

До серії послідовних двократних розведень лектину або екстракту у мікропробірках, додавали 2 %-ну суспензію еритроцитів у забуференому фізіологічному розчині (ЗФР) і після 10-ти хвилинної інкубації пробірки центрифугували 30 с при 500g.

Результат аглютинації спостерігали візуально (неозброєним оком). Аглютинація (позитивний результат) характеризується утворенням згустка еритроцитів, який не розпадається при обережному збовтуванні пробірки. При відсутності аглютинації еритроцити при збовтуванні підіймаються з дна пробірки кожен окремо, без утворення згустка (негативний результат).

Суспензію еритроцитів готували шляхом відмивання їх від плазми або сироватки крові ЗФР. 5-10 крапель крові поміщають у пробірку з 10 мл ЗФР, перемішують і через 10 хв центрифугували при 1000 -1500 g протягом 5 хв. ЗФР має такий склад: в 1 л дистильованої води вносили 8,0 г NaCl, 0,2 г KCl, 1,15 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; рН після розчинення солей доводили до 7,4 за допомогою 1 н. HCl або NaOH. Еритроцити 2 рази відмивали ЗФР, після чого визначали їхній вміст у суспензії за допомогою гематокрита і розбавляли сольовим розчином до 2 % концентрації. Цю суспензію можна зберігати в холодильнику протягом тижня.

Вимірювання білку в процесі очистки

Метод Лоурі. Найчастіше цитується в біохімічній літературі робота Лоурі та співавторів [73], в якій був описаний новий метод визначення білків. Було виявлено, що при поєднанні біуретової реакції та реакції з застосуванням реактиву Фоліна-Чіокальті білки, які містять тирозин, дають інтенсивне темно-синє забарвлення. Метод відзначається високою чутливістю, так як дає відчутне забарвлення з білками, концентрація яких складає 0,1 мг/мл та нижче. Речовини, що заважають проведенню реакції найчастіше при цьому є розбавлені до такого рівня, що їх вплив стає незначним.

Реакцію виконували наступним чином. До 0,4 мл розчину, що містить білок, додавали 2 мл реактиву Лоурі, перемішували і через 10 хв додавали 0,2 мл реактиву Фоліна-Чіокальті. Перемішували і через 30 хв вимірювали забарвлення при 740 нм на спектрофотометрі або колориметрі. У контрольній пробі замість білкового розчину додавали дистильовану воду. Калібрувальний графік будували по сироватковому альбуміні бика. Лінійна залежність спостерігалась в діапазоні 0,05 – 0,5 мг/мл концентрації білка.

Реактив Лоурі. Готували два розчини: №1 – 2 % розчин Na_2CO_3 в 0,1 н. NaOH і №2 – 0,5 % розчин $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1 % розчині тартрату натрію або калію. Перед застосуванням до 50 мл розчину №1 додають 1 мл розчину №2.

Реактив Фоліна-Чіокальті. Його готують наступним чином. В колбу на 2 л вносять 100 г $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ і 25 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ і все це розчиняють в 700 мл води. Пізніше додають 50 мл 85 % розчину H_3PO_4 і 100 мл концентрованої HCl . Суміш обережно кип'ятять 10 годин із зворотним холодильником. Потім додають 150 г Li_2SO_4 , 50 мл води і декілька крапель рідкого бром. Кип'ятять 15 хв без холодильника для видалення надлишку бром. Після охолодження загальний об'єм доводять до 1 л і фільтрують через папір у дуже чисту темну склянку з притертим корком. Зберігають в темному місці. Перед вживанням розводять у співвідношенні 1:2.

Поглинання в УФ-області спектру. Білки поглинають ультрафіолетове світло в ділянці 280 нм через присутність в їх молекулах залишків тирозину і триптофану. Так як вміст цих двох амінокислот в білках сильно відрізняється, коефіцієнт

поглинання, виражений звичайно як $E_{280}^{1\%}$ або $E_{280}^{1\text{ мг/мл}}$ також для різних білків є неоднаковим. Для більшості білків величина $E_{280}^{1\text{ мг/мл}}$ лежить в інтервалі 0,4 – 1,5, але є білки, які займають в цьому ряді крайні позиції.

Визначення чистоти білку методом електрофорезу та диск-електофорезу.

Молекулярну масу поліпептидних ланцюгів лектина визначали за допомогою електрофорезу в 15% ПААГ з 0,1% додецилсульфату натрію у тріс-НСІ буферному розчині, рН 8,6 . Як стандарт використовували суміш білків відомої молекулярної маси виробництва "Fermentas" (Олайн, Латвія).

Структуру молекули лектину (мінімальну молекулярну масу поліпептидних ланцюгів) визначали за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі (ПААГ) в присутності 0,1 % додецилсульфату натрію як детергента [13].

З цією метою використовували варіант електрофорезу на пластинках ПААГ. В залежності від молекулярної маси зразків використовували 15 % концентрацію ПААГ.

Стабілізований постійний струм створював стабілізатор ПЭФА-1 з вихідною напругою до 200 В та силою струму до 200 мА

Реактиви та проведення електрофорезу. Розчини для нижнього (розділяючого) гелю виготовляли за наступним прописом (таблиця 2.1).

Табл. 2.1

Реактиви та розчини для проведення електрофорезу в присутності ДДС-Na

Буфер: ТРІС – 3,6, 1 н. НСІ –4,8 мл, ТЕМЕД –0,04 мл, вода – 1,56, рН 8,8 Розчин акриламід у 40 % : акриламід – 7,77 г , бісакриламід –0,28 г, води – до 20 мл Розчин персульфату амонію (ПСА) – 2,8 мг/мл Нижній гель:						
Гелю, %	Буфер	Розчин ак-риламід у	10 % р-н ДДС-Na	Розчин ПСА	Вода	Загальний об'єм
5 %	1,0	0,88	0,07	2,0	3,05	7,0
10 %	1,0	1,75	0,07	2,0	2,18	7,0
15 %	1,0	2,63	0,07	2,0	1,30	7,0

20 %	1,0	3,5	0,07	2,0	0,43	7,0
Верхній гель Розчин акриламід у 10 % : 1 г акриламід, 0,25 г БісАА, ТЕМЕД 0,02, води до 10 мл Буфер: Тріс – 1,2, 1 н НСІ –9,6, ТЕМЕД –0,05 мл, води до 10 мл, рН 6,7 Розчин персульфату амонію (ПСА) – 2,8 мг/мл						
2,5 %	0,4	0,8	0,08	0,8	0,92	3,0

У електродні резервуари наливали електродний буферний розчин наступного складу:

Тріс – 3,0 г; Гліцин – 14,4 г; Додецилсульфат натрію – 1,0 г;

Дистильованої води – до 1 л, рН буферу – 8,3.

У верхньому електродному резервуарі знаходився катод, а в нижньому – анод. Електроди катоду і анаду були виготовлені з платини. Електрофорез розпочинали за сили струму у 15 – 25 мА і напруги 80 -120 В. Після концентрування у верхньому гелі аналізованих зразків напругу збільшували до 200-220 В.

Зразки препаратів, які аналізувались, попередньо готували на Тріс-НСІ денатуруючому буфері з 0,1 % ДДС-На , рН 6,7 і витримувались 24 год при кімнатній температурі.

Після досягнення барвником нижнього краю гелю його виймали, відділяли від пластин і поміщали на короткий час (10 – 30 хв) у 10 %-ний розчин трихлороцтової кислоти. Після цього поміщали на 5 –10 хв у 40 % етанол, а потім у фарбуючий розчин наступного складу: Кумасі брильянтовий голубий R-250 – 1,25 г; метанол – 227 мл, льодяна ацетатна кислота – 100 мл, води – до 1 л.

Час фарбування – 6 –10 годин. Потім гель відмивали від надлишку фарби 7 %-розчином ацетатної кислоти, змінюючи її декілька разів. Білки виявлялись у вигляді синіх плям на безбарвному фоні.

Вивчення вуглеводної специфічності лектинів.

Вуглеводну специфічність лектинів кори та насіння бруслини європейської визначали за допомогою реакції пригнічення гемаглютинації вуглеводами і глікопротеїнами. За допомогою ступінчастого (дворазового) розведення

вуглеводу або глікопротеїну визначали його мінімальну концентрацію, яка повністю пригнічує активність лектину, розведеного до титру 1: 4 [88].

Для цього необхідні такі реактиви:

а) розчини вуглеводів з якими досліджується взаємодія у ЗФР високої концентрації (нами використовувались 0,3 М розчини). У випадку використання полісахаридів або глікопротеїнів, молекулярна маса яких є великою або невідомою, використовували 3 % розчини останніх;

б) розчин досліджуваного лектину. У випадку чистого лектину готували 0,1 % розчин на ЗФР, а потім із нього готували робочий розчин шляхом розведення до титру 1:4. У випадку дослідження неочищеного лектину або екстракту, розчин розбавляли ЗФР до титру 1:4;

в) 2 % суспензія еритроцитів на ЗФР.

Спочатку визначали вуглевод, із яким взаємодіє лектин. З цією метою в пробірку вносили по 0,05 мл розчину вуглеводу, 0,05 мл робочого розчину лектину та залишали на 15 хв при кімнатній температурі. Потім у пробірку вносили 0,05 мл 2 % суспензії еритроцитів, залишали на 15 хв., після чого центрифугували 30 с при 500 g і спостерігали за реакцією аглютинації еритроцитів. Обов'язковою є проведення контрольної проби, в яку замість вуглеводу додавали ЗФР.

У контрольній пробірці і в пробірках з вуглеводами, що не взаємодіяли із лектином, спостерігалась аглютинація еритроцитів. Відсутність аглютинації у пробірках засвідчує про блокування активного центру лектину вуглеводом, тобто про взаємодію цього лектину з вуглеводом. Коли концентрація вуглеводу реакційної суміші в першій пробірці становить 0,1 М, то можна вважати це достатнім для виявлення навіть слабо взаємодіючих вуглеводів із лектином.

Після виявлення вуглеводів, які взаємодіють із лектином, визначали їхню мінімальну концентрацію, що пригнічує реакцію гемаглютинації. З цією метою готували серію послідовних розведень активного вуглеводу. У пробірки вносили по 0,05 мл ЗФР: у першу вносили 0,05 мл 0,6 М розчину вуглеводу і після цього переносили у наступні пробірки по 0,05 мл розчину. У кожную пробірку додавали

по 0,05 мл робочого розчину лектину і залишали на 15 хв. Центрифугували 30 с при 500 g і фіксували результати реакції гемаглютинації. На початку ряду пробірок гемаглютинація є відсутньою внаслідок блокування лектину вуглеводом, а потім у міру зниження концентрації вуглеводу з'являється аглютинація.

Відмічали останню пробірку, в якій ще відсутня аглютинація і розраховували концентрацію вуглеводу у цій пробірці, виходячи з того, що концентрація вуглеводу в першій пробірці є 0,1 М, а коефіцієнт розведення в ряді дорівнює 2. Таким способом визначали мінімальну пригнічуючу концентрацію для всіх вуглеводів, що взаємодіють з лектином [89].

Для характеристики вуглеводної специфічності лектину використовували: D-глюкозу, D-галактозу, лактозу ("Союзхімреактив"), α - і β -метил-D-галактозид, L-рамнозу ("Chemapol", Чехія), N-ацетил D-глюкозамін ("Fluka", Швейцарія), N-ацетил-D-галактозамін ("Chemapol", Чеська Республіка), D-маноза (виробництва Братиславського хімічного інституту, Словаччина), 4-нітрофеніл- β -D-глюко- і галактозид, 4-нітрофеніл- β -D-глюкозамін ("Serva", Німеччина), L-фукоза ("Koch Light", Великобританія), α -феніл-N-ацетил-D-глюкозамінопіранозид, 4-нітрофеніл- β -D-глюкопіранозид, 4-нітрофеніл- α - D-манопіранозид ("Serva", США).

Для визначення взаємодії з глікопротеїнами і полісахаридами використовували крохмаль водорозчинний, овомукоїд і овальбумин тричі перекристалізований, інουλін, дріжджовий манан, тиреоглобулін бика("Biolar", Олайне, Латвія), гуміарабік ("Loba Feinchemie", Австрія), лужна фосфатаза з кишечника теляти ("Serva", Німеччина). Групоспецифічні речовини Н, А і В були отримані з кістозної рідини, взятої після операцій на яєчниках у пацієнток з відповідними групами крові. Очищення їх здійснювали за методом, описаним раніше [89].

Одержання конюгату лектину з пероксидазою хрому

Мічення для потреб світлової мікроскопії здійснювали за методикою Nakane і Kawaoi, принцип якої полягає в окисненні вуглеводного компонента пероксидази перйодатом з наступним приєднанням білку ковалентно за допомогою утворення зв'язків між альдегідними групами окислених вуглеводів і аміногрупами білку, що приєднується (основи Шиффа) за вдосконаленою методикою [71, 85].

Для одержання кон'югатів використовували високоочищену пероксидазу із значенням $RZ = 3,0$.

Методика є наступною. 50 мг пероксидази коренів хрону розчиняли в 8 мл 1 % р-ну NaHCO_3 , після чого додавали 0,3 мл 2 % метанольного розчину 2,4-динітрофторбензолу, старанно перемішували і залишали в темному місці протягом 50-60 хв. Після цього до розчину додавали 170 мг NaIO_4 , розчиненого в 1-1,5 мл дистильованої води, перемішували (при цьому, розчин набував зеленуватого відтінку) і залишали на 30 хв при кімнатній температурі. Після цього реакцію зупиняли додаванням до розчину 0,5 мл етиленгліколю. Через 10-30 хв розчин ставили на діаліз проти 1-2 літрів 1 % розчину карбонату натрію, рН якого доводили до 9,5-9,8. На другий день до розчину пероксидази додавали ліофільно висушений лектин, який брали в еквімолярних співвідношеннях. Через 2 години реакцію кон'югації зупиняли, додаючи 10 мг/мл боргідриду натрію.

Використання лектинів в гістохімічних дослідженнях.

Порівняльне гістохімічне дослідження зв'язування лектинів кори та насіння бруслини європейської з глікокон'югатами тканин ссавців було здійснене на кафедрі гістології, цитології та ембріології Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького за допомогою мічених пероксидазою хрону лектинів, виготовлених за раніше описаною методикою [85], на ендометрії щурів – самок лінії Wistar у дієстральній фазі статевого циклу. Фіксація гістологічного матеріалу здійснювалась у 4% нейтральному формаліні з наступною заливкою у парафін для виготовлення зрізів товщиною 5-7 мкм. Візуалізація рецепторів лектинів проводилась 3,3'-діамінобензидином тетрагідрохлоридом в присутності пероксиду водню.

2.3 Дослідження жирної олії насіння

Жирну олію одержували екстракцією петролейним ефіром в процесі знежирення рослинної сировини для одержання лектину. Екстракт очищали центрифугуванням (10 хв при 2500 g) і після фільтрування петролейний ефір відганяли на водяній бані, а залишок досушували в фарфоровій чашці при $+60^\circ\text{C}$ в

сушильний шафі протягом 12 год. Після цього одержану олію зважували і проводили визначення числових показників за методиками ДФУ [119-125].

Кислотне число

Кислотним числом I_A називають кількість калію гідроксиду, у міліграмах, яка необхідна для нейтралізації вільних кислот, що містяться в 1 г випробовуваної речовини.

Близько 1, 000 г наважки речовини (г) розчиняють у 50 мл суміші рівних об'ємів спирту і ефіру, попередньо нейтралізованої 0. 1 М розчином калію гідроксиду, використовуючи як індикатор 0.5 мл розчину фенолфталеїну. Після розчинення випробовуваної речовини одержаний розчин титрують 0,1 М розчином калію гідроксиду до появи рожевого забарвлення, яке не зникає протягом 15 с.

Кислотне число (I_A) обчислюють за формулою:
$$I_A = \frac{5.610n}{m}$$

де:

n- кількість 0. 1 М розчину калію гідроксиду, витрачена на титрування, у мілілітрах;

5.610 - кількість калію гідроксиду. що відповідає 1 мл 0.1 М розчину калію гідроксиду, у міліграмах

m- маса наважки речовини, у грамах.

Число омилення

Числом омилення I_s , називають кількість калію гідроксиду у міліграмах, необхідну для нейтралізації вільних кислот і омилення складних ефірів, що містяться в 1 г випробовуваної речовини.

Наважку речовини поміщають у колбу з боросилікатного скла місткістю 250 мл , споряджену зворотним холодильником додають 25,0 мл 0,5 М розчину калію гідроксиду спиртового і декілька скляних кульок. До колби приєднують зворотний холодильник і нагрівають на киплячій водяній бані протягом 30 хв, додають 1 мл розчину фенолфталеїну і гарячий розчин відразу титрують 0,5 М розчином кислоти хлористоводневої. Паралельно проводять контрольний дослід.

Число омилення (I_s) обчислюють за формулою:

$$I_s = \frac{28.05(n_2 - n_1)}{m}$$

n_1 -об'єм 0.5 М розчину кислоти хлористоводневої, витрачений на титрування випробовуваної речовини, у мілілітрах;

n_2 -об'єм 0.5 М розчину кислоти хлористоводневої, витрачений на титрування в контрольному досліді, у мілілітрах;

m - маса наважки випробовуваної речовини, у грамах;

28 05- кількість калію гідроксиду, відповідна 1 мл 0.5 М розчину кислоти хлористоводневої, у міліграмах.

Ефірне число

Ефірним числом I_E називають кількість калію гідроксиду, у міліграмах, необхідну для омилення ефірів, що містяться в 1 г випробовуваної речовини. Ефірне число (I_E) обчислюють за формулою: $I_E = I_s - I_A$

де:

I_s - число омилення;

I_A - кислотне число.

Йодне число

Йодним числом, називають кількість галогену в перерахунку на йод, у грамах, необхідну для зв'язування 100 г випробовуваної речовини за описаних умов. Наважку речовини, поміщають у колбу з притертою пробкою місткістю 250 мл, попередньо висушену або промиту кислотою оцтовою льодяною, розчиняють у 15 мл хлороформу, До одержанного розчину повільно додають 25.0 мл розчину йоду броміду.

Колбу закривають пробкою і витримують у темному місці при частому переміщуванні протягом 30 хв. Додають 10 мл розчину, що містить 100 г/л калію йодиду, 100 мл води і титрують 0.1 М розчином натрію тіосульфату при інтенсивному переміщуванні до світло-жовтого забарвлення, потім додають 5 мл розчину крохмалю і титрують 0.1 М розчином натрію тіосульфату краплями до знебарвлення. Паралельно проводять контрольний дослід.

Йодне число (I_{I}) обчислюють за формулою:
$$I_{\text{I}} = \frac{1.269(n_2 - n_1)}{m}$$

де:

n , - кількість 0.1 М розчину натрію тіосульфату, витрачена на титрування випробовуваної речовини, у мілілітрах;

n_2 - кількість 0.1 М розчину натрію тіосульфату, витрачена на титрування в контрольному досліді, у мілілітрах;

m - маса наважки речовини, у грамах.

Аналіз жирних кислот та визначення їх кількісного вмісту проводили за допомогою газової хроматографії на хроматографі Хром-5 за методикою ГОСТ 30418-96 , ДСТУ ISO 5508-2001, ДСТУ ISO 5509-2002 [126-128].

Приготування метилових ефірів жирних кислот.

Пробу досліджуваної олії добре перемішують. У скляну пробірку беруть піпеткою 2-3 краплі олії, розчиняють їх в 1,9 см³ гексану. У розчин вводять 0,1 см³ метилату натрію в метанолі концентрацією 2моль/дм³. Після інтенсивного перемішування протягом 2 хв реакційну суміш відстоюють 5 хв і фільтрують через паперовий фільтр. Розчин готовий для аналізу. Готовий розчин зберігають в холодильнику не більше 2 діб.

Умови аналізу: температура термостата колонок – 180-190°C;

Температура випаровувача 250°C

температура печі детекторів - 200°C;

швидкість потоку газу-носія (азот, аргон, гелій) - 30-40 см /хв;

об'єм проби - близько 1 мл розчину метилових ефірів кислот у гексані.

Дослідження каротиноїдів та токоферолів.

Визначення вмісту каротиноїдів та токоферолів у жирній олії здійснювали після хроматографування її на колонці силікагелю. У фракціях, де було виявлено методом ТШХ токоферолі та каротиноїди, кількісно визначали їх вміст спектрофотометричним методом.

Кількісний вміст суми каротиноїдів (C , в мг-%) в перерахунку на β -каротин розраховували за формулою:

$$C = \frac{E_{460} \times 50 \times 100 \times 10}{g \times 2500}$$

E_{460} – оптична густина досліджуваного розчину;

50 – розведення, в мл;

2500 – питомий показник поглинання 1 %-ного розчину β -каротину в кюветі 1,0 см

g – маса наважки, в г.

Аналогічно за тією ж формулою визначали кількість токоферолів, з тією різницею, що фракції, де були знайдені токоферолі розчиняли в метанолі і визначення проводили при 281 нм, і відповідно, у формулу замість 2500 підставляли значення:

1022 - питомий показник поглинання 1 % розчину токоферолу в метанолі в кюветі 1,0 см.

Визначення сквалену в олії насіння бруслини європейської методом вискоєфективної рідинної хроматографії.

При аналізі використовували сертифікований стандартний зразок сквалену Squalene analytical standard $\geq 98.0\%$, Sigma-Aldrich (CAS Number 111-02-4), acetonitrile “HPLC” grade ($\geq 99.9\%$, Sigma-Aldrich, USA), і тетрагідрофуран (for HPLC, $\geq 99.5\%$, Fluka).

Приготування розчину стандартного зразка

Стандартний розчин готували шляхом розчинення 0,10 г сертифікованого стандартного зразка сквалену тетрагідрофураном у мірній колбі об'ємом 100 мл. Далі відбирали 10 мл одержаного розчину та доводили об'єм розчину ацетонітрилом до 100 мл перемішували та фільтрували крізь мембранний фільтр із порами діаметром 0,2-0,5 мкм. У хроматографічну систему вводили 50 мкл розчину стандартного зразку.

Підготовка та аналіз досліджуваної проби

Досліджувану пробу готували шляхом розчинення 2,5 мл олії бруслини європейської у тетрагідрофурані у мірній колбі місткістю 250 мл. Далі відбирали 10 мл одержаного розчину поміщали у мірну колбу місткістю 100 мл та доводили

об'єм ацетонітрилом до позначки. Одержаний розчин перемішували і фільтрували крізь мембранний фільтр із діаметром пор 0,2-0,5 мкм.

Основою слугував метод ВЕРХ, методика якого описана у публікації Lu HT et al. [149]. Проте, для нашої хроматографічної системи застосовували іншу довжину колонки і виробника та комбіновану мобільну фазу ацетонітрил-тетрагідрофуран, що дало можливість досягнути високої селективності та ефективності методики.

Хроматографічний система. Ідентифікацію та кількісне визначення проводили на рідинному хроматографі Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 UHPLC.

Хроматографічне розділення аналізовної проби проводили на колонці із зворотною фазою Luna® Omega 5 мкм Polar C18 100 Å 250 мм × 4,6 мм × 5 мкм, при 30 ° С. Склад ацетонітрилу рухомої фази: тетрагідрофуран (90:10 об / об), УФ = 205 нм, витрата - 1,0 мл / хв.

Фільтрацію рухомої фази проводили за допомогою мембранних фільтрів PTFE діаметром 25 мм та розміром пор 0,45 мкм.

Результати були оброблені за допомогою програмного забезпечення Chromeleon® Chromatography Data System (Версія 7.2 SR4).

2.4 Виявлення серцевих глікозидів у рамках комплексної схеми одержання

Виявлення серцевих глікозидів здійснювали за допомогою наступних хімічних реакцій [131].

- Реакція Лібермана-Бурхарда (на стероїдне ядро):

Сухий залишок розчиняють в 1 мл оцтового ангідриду, переносять в суху пробірку і обережно по стінках додають 2-3 краплі кислоти сірчаної концентрованої. Через деякий час на межі двох шарів з'являється рожеве забарвлення, яке переходить в зелене та синє.

- Реакція Легаля з натрій нітропрусидом (на 5-членне лактонне кільце):

Сухий залишок розчиняють в 1 мл 5% розчину натрію нітропрусиду, переносять у пробірку та по стінках додають 2-3 краплі 10% розчину натрію гідроксиду. На межі поділу шарів з'являється червоне забарвлення.

- Реакція Келлера-Кіліані (на наявність дезоксицукрів):

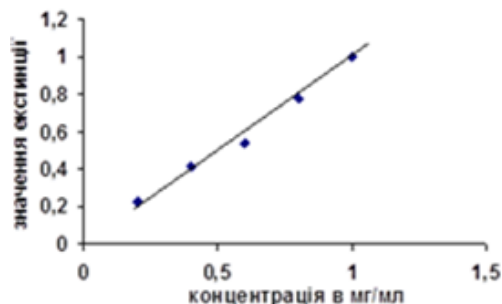


Рис. 2.1 Калібрувальний графік

Сухий залишок розчиняють в 1 мл кислоти оцтової з заліза сульфатом (III), обережно по стінках додають 1 мл кислоти сірчаної концентрованої. На межі шарів з'являється буре або коричневе кільце, а верхній шар

поступово забарвлюється в блакитний або синій колір.

2.5 Визначення кількісного вмісту вуглеводів

Реакція з антроном (кількісне визначення)

Реакцію з антроном можна застосовувати для кількісного визначення гексоз [165]. 2 мл 2%-ого свіжоприготованого розчину антрону в 100 мл концентрованої сульфатної кислоти охолоджують у водяній бані при температурі 10-15°C. 1 мл розчину гексоз з різними концентраціями в діапазоні 100 - 1000 мкг/мл для побудови калібрувального графіку або 1 мл досліджуваної проби, яка містила вуглеводи в цьому діапазоні концентрацій, обережно змішували з розчином антрону в сульфатній кислоті. Суміш охолоджували, струшували, доводили до кімнатної температури, потім нагрівали 16 хв на киплячій водяній бані і знову охолоджували до кімнатної температури. Синє забарвлення з максимумом поглинання при 625 нм вимірювали на спектрофотометрі СФ-16 після 10 хв охолодження. Калібрувальний графік, побудований за глюкозою, представлений на рис. 2.1.

Реакція є достатньо специфічною для гексоз. Синє забарвлення з максимумом поглинання при 625 нм дають не тільки гексози, але і 6-дезоксигексози. Пентози в цих умовах дають жовте забарвлення, а коефіцієнт екстинкції для пентоз при 625 нм дорівнює всього кільком відсоткам коефіцієнта екстинкції для гексоз. Гексуранові кислоти при порівняльних концентраціях не впливають на результат,

якщо спектрофотометричні вимірювання проводять безпосередньо після завершення реакції.

Реакція з резорцином і хлоридною кислотою [165].

Реакція з резорцином і хлоридною кислотою може бути використана для кількісного визначення кетоз.

До 1 мл розчину, з різними концентраціями фруктози в діапазоні 10-150 мкг/мл, для побудови калібрувального графіка, або досліджуваного розчину, додають 4 мл суміші з 7 частин 30%-ної хлоридної кислоти (5 частин концентрованої хлоридної кислоти на 1 частину води) і 1 частини реактиву, приготованого розчиненням 0,1 г резорцину і 0,25 г тіосечовини в 100 мл льодяної оцтової кислоти. Реакційну суміш нагрівають 10 хв на водяній бані при 80 ° з

частим струшуванням і потім охолоджують водопровідною водою. З'являється фіолетове забарвлення. Спектр поглинання кетогексоз має максимум при 515 нм. Альдогексози цієї реакції не дають. Кетогептози дають майже ідентичне забарвлення, а кетопентози - жовте і зелене забарвлення значної інтенсивності. Калібрувальний графік, побудований по фруктозі, представлений на рис. 2.2

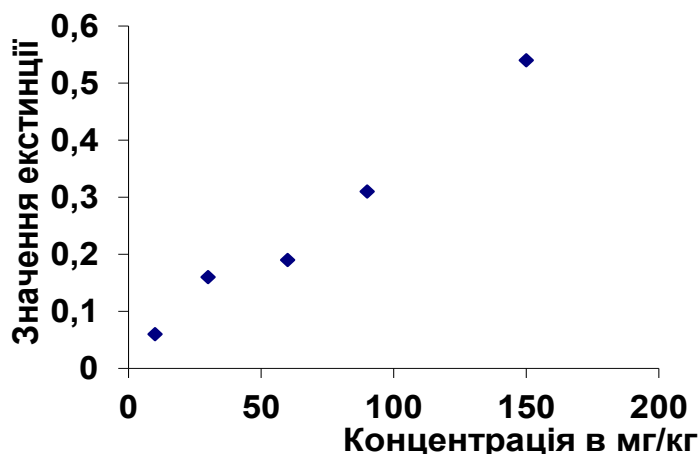


Рис 2.2. Калібрувальний графік для визначення кетоз

2.6 Дослідження фармакологічної дії олії на моделі неалергічного контактного дерматиту

Для визначення гострої токсичності використовували загальновідому методику [166,169-170].

Після встановлення нетоксичності олії при пероральному введенні провели дослідження її протизапальної дії на моделі неалергічного контактного дерматиту на білих безпородних щурах масою 180-200 г на моделі неалергічного контактного дерматиту [167], який викликали нанесенням живичного скипидару за відомою методикою, препаратом порівняння було використано обліпихову олію. Оцінювали ефективність олії візуальним спостереженням за тваринами та контролем гематологічних показників. Визначення ШОЕ проводили з використанням методу Вестергрена [136]. Для цього пробу венозної крові змішували з 5 % розчином натрію цитрату в співвідношенні 4:1, після чого поміщали отриманий зразок в стандартний капіляр Вестергрена (шкляні капіляри довжиною 300 мм $\pm$ 1,5 мм (робоча довжина капіляра - 200 мм), діаметром - 2,55 мм $\pm$ 0,15 мм). Величину ШОЕ оцінювали за висотою шару плазми в мм, який утворився за 1 годину.

Для оцінки морфології лейкоцитів (лейкограма) готували мазки крові на предметному шклі, які згодом фарбували за Романовським - Гімзе та досліджували мікроскопічно.

Визначення біохімічних показників плазми крові проводили на напівавтоматичному біохімічному аналізаторі BS3000M (SINNOWA, КНР), з використанням стандартних тест-систем виробництва CORMAY (Польща).

Вивчення антибактеріальної дії настоек кори, насіння та листя бруслини європейської проводили методом дифузії в агар на м'ясо-пептонному агарі (МПА) та середовищі Сабуро. Плісняві гриби засівали газоном, струшуючи спори. Настойки готували методом мацерації у співвідношенні 1:10, використовуючи як екстрагент 40% етанол.

2.7 Морфолого-анатомічне дослідження сировинних органів бруслини європейської

Об'єктами дослідження було обрано кору, насіння та листя бруслини європейської, як найбільш перспективні джерела БАР. Мікроскопічне дослідження проводили методом світлової мікроскопії. використовували

мікроскоп Olympus bx51 (Olympus, Японія), оснащений високоапартурними об'єктивами 1,5x, 5x, 10x, 40x та камерою LUMC-B11/Sony (Labtron, ВБ).

У дослідженні використовували висушену та свіжу сировину, зібрану на околицях м. Львова відповідно до рекомендованих термінів заготівлі. Для розм'якшення та освітлення висушеної сировини для мікропрепаратів листя кип'ятили із 3% розчином КОН 3-5хв - та 5% КОН 15-20 хв кору, насіння пом'якшували кип'ятінням у воді [131].

Препарати із поверхні та поперечні зрізи виготовляли за допомогою леза. Фіксували їх у желатин-гліцериновому розчині (желатин-гліцерин-вода -1:7:6), який готували за наступною методикою.

До 1 г чистого желатину додають 50 мл води для набухання. Надлишок води відціджують, додають 6 мл води очищеної, нагрівають до розчинення желатину. Далі додають чистий гліцерин у кількості 7 г та перемішують. Для консервації додають 1-2 кристали фенолу. Суміш нагрівають доки вона не стане прозорою, фільтрують на гарячій лійці через фільтрувальний папір. Для фіксування препарату на тепле предметне скло за допомогою скляної палички наносять краплю розплавленого желатин- гліцеринового реактиву. У краплю відразу вкладають розм'якшений об'єкт або зріз та швидко накривають покривним склом, уникаючи утворення пухирців повітря [131].

РОЗДІЛ 3. ДОСЛІДЖЕННЯ ЯКІСНОГО СКЛАДУ І КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН БРУСЛИНИ ЄВРОПЕЙСЬКОЇ (*EUONYMUS EUROPAEAL.*). РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Фракціонування різних груп БАР за допомогою екстракції розчинниками

В літературі дискутується питання про роль лектинів в рослинах. Функція лектинів у рослинах достовірно не відома. Виходячи з їх здатності селективно зв'язувати вуглеводи вони можуть бути залучені до різноманітних процесів розпізнавання: між клітинами або клітинами та різними молекулами, що містять вуглеводи. Досліджена участь лектинів у симбіозі азот-фіксуючих бактерій та корінням бобових рослин. Симбіоз специфічний тим, що певний вид корневих бактерій може асоціюватися лише з певним видом бобових рослин. Специфічне розпізнавання вуглеводних залишків є вирішальним у захисті рослин від різноманітних фітопатогенів. Амінокислотна послідовність лектину бруслини показує високу гомологію до стрес-залежних білків, одержаних з рису, тому було висловлено припущення, що цей лектин може утворюватися при дії посухи, підвищенім вмісті солі, пораненнях та обробці деякими рослинними гормонами [70,75-77].

Відомий спосіб одержання лектину з ариллуса насіння бруслини європейської афінною хроматографією на іммобілізованому на сефарозі 4 В овомукоїді [75]. Відповідно до цього способу лектин одержують шляхом обробки подрібнених ариллусів етанолом, наступною екстракцією сировини 20мМ 1,3-діамінопропаном, іонообмінною хроматографією очищеного фільтрату на колонці Q Fast Flow та гель-хроматографією на сефакрилі 100. Остаточне очищення лектину здійснюють афінною хроматографією на іммобілізованому на сефарозі 4 В овомукоїді. Використання в якості сировини кори рослини замість арилусів насіння дозволяє розширити терміни заготівлі сировини та зменшити кількість стадій очищення лектину бруслини європейської. Крім того, слід зауважити, що сировинна база для кори рослини є значно більшою, ніж для

насіння. Нами для очистки також використано поперечно-зшитий овомукоїд. Цей сорбент одержувати простіше, як імобілізований на сефарозі овомукоїд. Крім того, він має вищу сорбційну ємність. Слід відмітити, що нами спочатку була застосована іонообмінна хроматографія на DEAE-Tojopearl, а потім афінна хроматографія як остання стадія очистки лектину. Така послідовність обумовлена тим, що кора бруслини європейської містить ще два хітин-зв'язуючі моновалентні лектини [64,68], які можуть взаємодіяти із залишками N-ацетил-D-глюкозаміну овомукоїда. У запропонованому нами режимі очистки хітин-зв'язуючі лектини не забруднюють цільового продукту лектину.

У зв'язку з тим, що лектини нами розглядались як одні з основних об'єктів нашого дослідження, першою стадією їх виділення є екстракція 1 % розчином NaCl при кімнатній температурі. Цей розчинник здатен екстрагувати високомолекулярні речовини (білки і полісахариди), а також ряд низькомолекулярних речовин, таких як вуглеводи та глікозиди, органічні та амінокислоти, тощо. Основна маса ліпофільних речовин в таких умовах не екстрагується і залишається в рослинній сировині. В той же час наявність високого вмісту жирної олії в насінні різко знижує вихід лектину при екстракції його із незнежиреної сировини. Тому при екстракції лектину з насіння стадія знежирення значно підвищує вихід лектину. Обробка петролейним ефіром та 96° етанолом не знижує вміст лектину в сировині при екстракції за кімнатної температури. В той же час, отримана при цьому, жирна олія з насіння бруслини європейської може представляти інтерес для досліджень.

Також після висушування шроту, одержаного після екстракції лектину можна різними розчинниками екстрагувати інші цінні в фармакологічному відношенні речовини. Тому нами була розроблена схема фракціонування деяких груп БАР (рис.3.1). Після знежирення рослинної сировини петролейним ефіром і екстракцією лектинів розчином NaCl в якості розчинника було використано етанол, який здатний екстрагувати серцеві глікозиди, стероїдні сполуки, флавоноїди, моно- і олігосахариди, органічні кислоти. Через наявність літературних даних про присутність серцевих глікозидів у насінні подальшу

очистку їх здійснювали за схемою, описаною в літературі [37,39], яка включає звільнення від смолистих речовин за допомогою вуглецю тетрахлориду. Потім нерозчинний залишок обробляли хлороформом. Нерозчинний у хлороформі залишок містив водорозчинні речовини, які були піддані дослідженню.

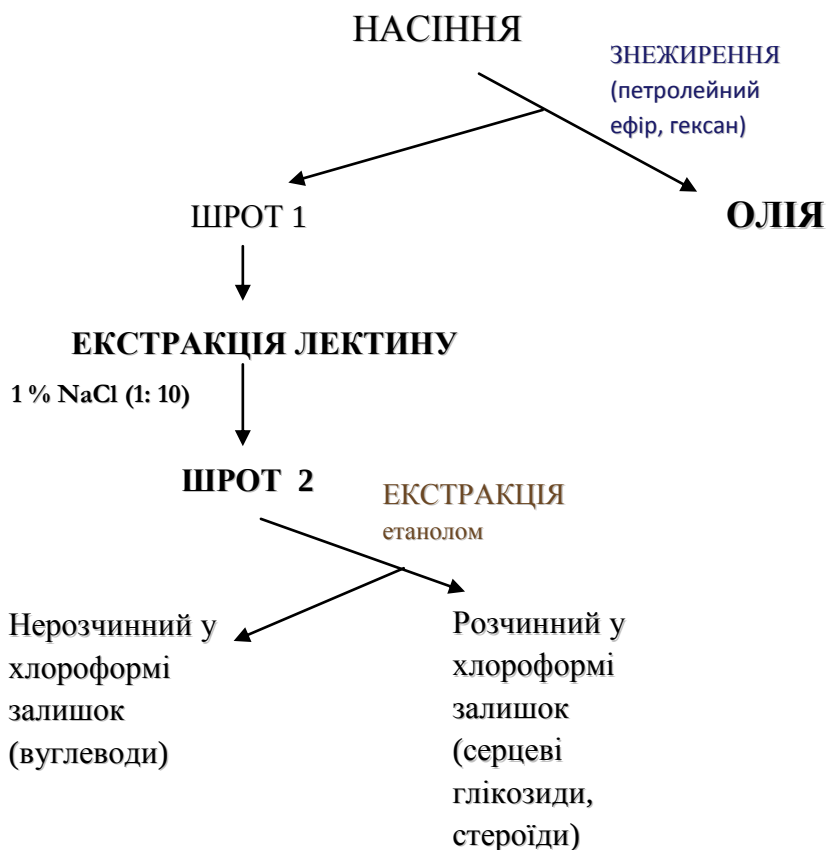


Рис. 3.1 Схема розділення основних груп БАР насіння бруслини європейської

3.2 Дослідження лектинів бруслини європейської

3.2.1 Дослідження впливу різних факторів на активність лектинів насіння та кори рослини

Кору, стебла, листки та насіння бруслини європейської збирали протягом річного циклу вегетації з однієї і тієї ж рослини на околицях м. Львова з інтервалом 10 діб, а в період швидких змін активності лектинів — через 3—5 діб, враховуючи можливі добові коливання зразки відбирали між 15-ою та 17-ою годинами. Висушену при кімнатній температурі сировину подрібнювали й екстрагували 0,9 %-ним розчином хлориду натрію в співвідношенні 1 : 5 (для кори та насіння) та 1 : 2 (для листків) протягом 3 год при кімнатній температурі.

Гемаглютинуючу активність (титр гемаглютинації) отриманих екстрактів визначали за методикою, наведеною у розділі 2.2, результати наведені на рис. 11.

Протягом життєвого циклу рослини, як видно із результатів, наведених на рис.11, гемаглютинуюча активність лектинів змінювалась в доволі значному діапазоні, що найчіткіше простежувалось в корі бруслини європейської. Титр гемаглютинації екстрактів з кори різко збільшувався під час весняного сокоруху, досягаючи найвищого рівня в момент розкриття бруньок. З початком розвитку листків він поступово знижувався і був мінімальним до їх повного розкриття. На початку дозрівання насіння активність лектинів у корі знову підвищувалася до максимального рівня, а в подальшому знижувалася і залишалася такою, як у період спокою, аж до початку сокоруху.

В міру росту плодів активність лектинів підвищувалася, досягаючи максимуму при дозріванні насінин.

У листках максимальна активність лектинів виявлялась у бруньках, в міру розпускання листків вона знижувалася до величини, яка вже не визначалася, а з початком повноцінного функціонування листків швидко зростала до певного рівня і залишалася постійною протягом усього періоду вегетації (рис 3.2).

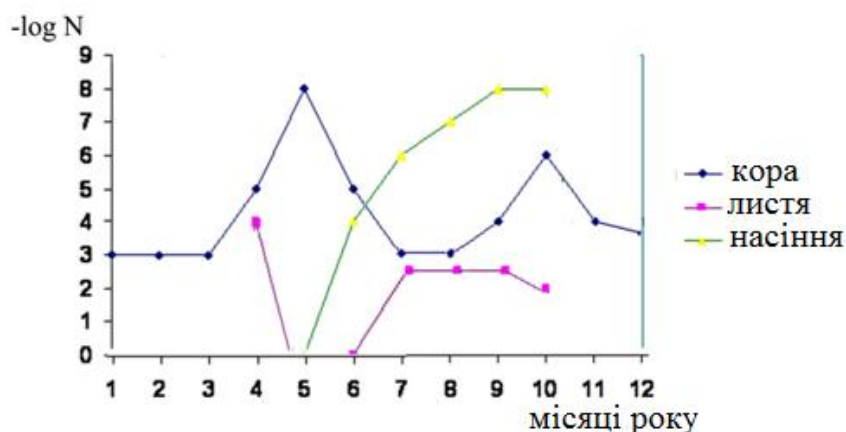


Рис.3.2 Графіки дослідження активності лектину протягом року. (Титр гемаглютинації екстрактів з сировинних органів протягом річного циклу вегетації).

Примітка. Титр гемаглютинації позначено числом N на осі ординат, яке відповідає номеру пробірки і розведенню екстракту в 2^{-N} рази, при якому ще

спостерігається гемаглютинація. Кольоровими лініями позначено титри гемаглютинації еритроцитів групи I(0) людини екстрактів відповідно з кори, листків та плодів бруслини європейської.

На титр гемаглютинації екстрактів впливали також погодні умови та екологічні фактори. Нами встановлено, що рослини з добре освітлених місць мали вищу активність лектинів у листках і насінні, ніж ті, що росли в затінку. Результати дослідження екстрактів кори, насіння та оплоднів наведено у таблиці 3.1.

Табл. 3.1

Результати дослідження взаємодії екстрактів сировинних органів бруслини європейської з еритроцитами

Сировина	Титри аглютинації			
	Еритроцити людини			Еритроцити корови
	O (I)	A (II)	B (III)	
Кора	1:8	—	1:16	1:4
Насіння	1:8	—	1:16	1:4
Оплодні	1:2	—	1:2	—

Таким чином, одержані результати засвідчують, що найбільш перспективним джерелом одержання лектину з бруслини європейської є кора рослини. Це пояснюється можливістю її заготовляти в різні фази розвитку, зокрема, восени, в фенофазу дозрівання насіння та весною під час сокоруху.

В зв'язку з тим, що екстракти кори та насіння виявляли приблизно однакові рівні титру гемаглютинації, ми вирішили зробити паралельне виділення лектинів з цієї сировини. Крім того, в літературі відсутні дані щодо одержання лектину кори рослини та основні характеристики цього лектину. Відомо, що в окремих випадках лектини кори та насіння однієї рослини відрізняються за специфічністю до вуглеводів та деякими фізико-хімічними характеристиками. Наприклад, лектин кори золотого дощу звичайного (*Laburnum anagyroides* Medik.) відрізняється за вуглеводною специфічністю від лектину насіння [88].

3.2.2 Одержання та дослідження лектину кори бруслини європейської

На першому етапі експериментів з очистки лектину ми досліджували чутливість лектину кори та насіння в екстрактах до змін температури (рис. 3.3), рН середовища (рис. 3.4), та ефективність осадження органічними розчинниками та нейтральними солями (табл. 3.2).

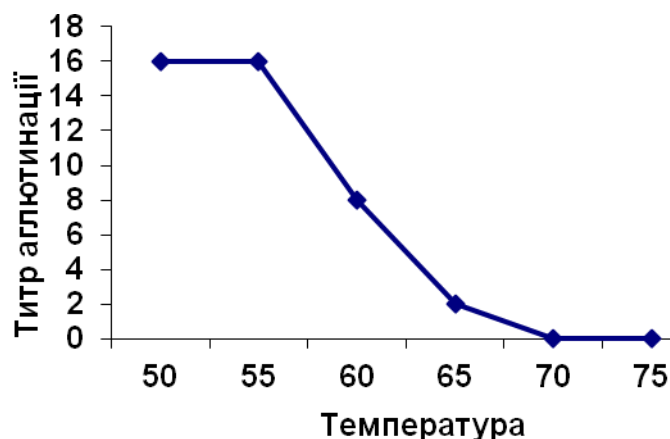


Рис. 3.3 Зміни гемаглютинуючої активності при різних значеннях температури

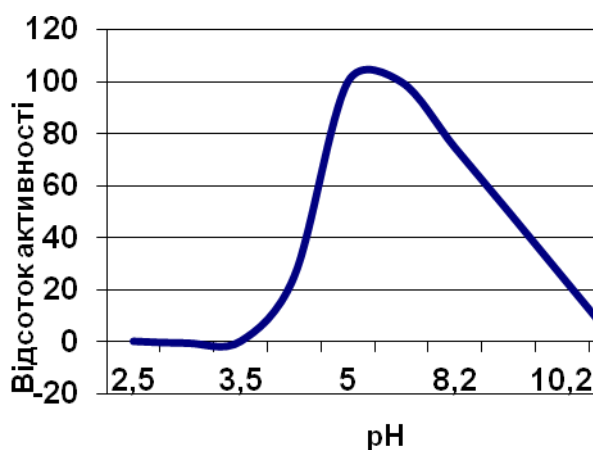


Рис. 3.4 Залежність гемаглютинуючої активності від значення рН

Із даних, наведених на рисунках № 12 і № 13, видно, що лектини в екстрактах чутливі до змін рН середовища та температури. Максимальне значення температури, при якій ще повністю зберігалась гемаглютинуюча активність становила +55°C. При 10-ти хвилинній експозиції екстракту за температури +60° С залишалось лише 50 % рівня початкової активності. При підкисленні екстрактів

до рН 5,0 спостерігалось лише 25 % рівня початкової активності. Менш чутливими виявились лектини до лужних значень рН. При рН 10,2 зберігалось 50 % активності.

На перших стадіях одержання лектинів концентрування та очистку їх здійснюють за допомогою осадження нейтральними солями (найчастіше сульфатом амонію) та органічними розчинниками (етанол, ацетон), а іноді при достатній стійкості лектинів і іншими методами. Тому ми вирішили вивчити можливість і ефективність застосування з цією метою сульфату амонію, хлориду натрію та етанолу. Результати порівняльного дослідження ефективності осадження лектину кори хлоридом натрію та сульфатом амонію представлені в таблиці 3.2.

Табл.3.2

Порівняння ефективності осадження хлоридом натрію та сульфатом амонію

№	Метод	V поч	C поч	T поч ..	V кін	C кін	T кін.	% по актив ності	% по білку	Ефектив ність очистки
1.	Осадження NaCl	8	1.8	1:8	4	0.52	1:16	100	14.4	6.9
2.	Осадження (NH ₄) ₂ SO ₄	8	1.8	1:8	4	1.6	1:16	100	44.4	2.27

У випадку використання етанолу, встановлено, що лектинова активність зникає при осадженні двома об'ємами етанолу навіть при охолодженні останнього до -18°C.

Як видно з табл. 5, при осадженні сульфатом амонію при 90 %-ному насиченні останнього осаджується 44,4 % початкового рівня білку при повному відновленні гемаглютинуючої активності. В той же час, при висолюванні хлоридом натрію осаджується лише 14,4 % білкових речовин при повному поверненні гемаглютинуючої активності. Таким чином, меншій кількості білку відповідає така ж аглютинуюча активність, що свідчить про кращу очистку лектину .

Отже, нами встановлено, що концентрування лектину з екстракту найкраще здійснювати за допомогою хлориду натрію, а осадження сульфатом амонію

осаджує більшу кількість баластних речовин. Лектин виявився нестійким до дії етанолу, тому його при одержанні лектину застосовувати не доцільно.

3.2.3 Очистка лектину кори рослини

Зібрану кору бруслини європейської (200 г) подрібнювали до розмірів частинок діаметром менше 0,5 мм, потім поміщали у посудину з пристроєм для перемішування, заливали 0,9 – 1 % розчином хлориду натрію або 0,1 -0, 5 M буферним розчином з рН 5,0 – 8,0 і перемішували не менше 60 хв у співвідношенні сировина : екстрагент 1: 8 - 10. Одержаний екстракт освітлювали центрифугуванням 10 хв при 2000 – 5000 g. Лектин з екстракту концентрували шляхом осадження хлоридом натрію при майже повному насиченні солі (300 г/л). Осад, що містить лектин, збирали шляхом центрифугування 20 хв при 8000 g або фільтрування. Далі осад розчиняли у воді і піддавали діалізу проти водопровідної води. Утворений незначний осад видаляли, розчин фільтрували і наносили на колонку ДЕАЕ-Tojopearl, урівноважену 0,05 M фосфатним буфером з рН 7,0. Колонку промивали цим же буферним розчином, а далі збільшували іонну силу розчину до 0,2 M.

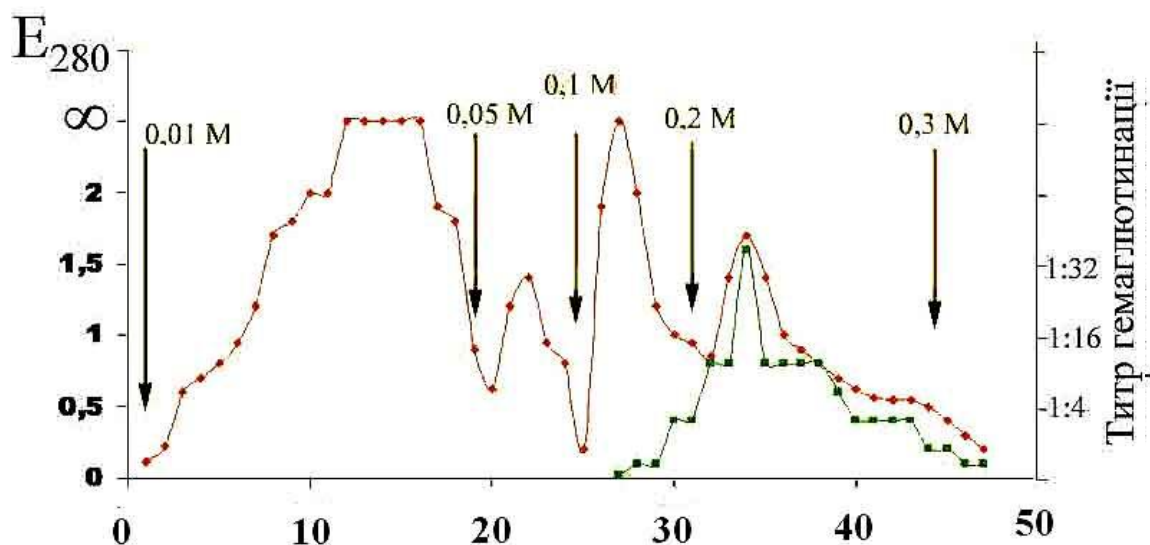


Рис.3.5 Графік очищення лектину кори бруслини європейської з використанням іонообмінною хроматографії

Примітки: стрілками позначено місце внесення фосфатного буферного розчину, рН 7,0; молярність розчину вказана цифрами. Червоним кольором позначено вихід білка, зеленим – титр гемаглютинації лектину.

Вихід лектину з колонки контролювали за допомогою реакції гемаглютинації еритроцитів людини групи В(III) або О (I). Лектин виходить з колонки в діапазоні 0,2 – 0,3 М фосфатного буферного розчину з рН 7,0. Фракції, що виявили значну гемаглютинуючу активність, об'єднували, і очищений лектин висолювали розчином (300 г/л) хлориду натрію. Графік очистки лектину наведений на рисунку 3.5.

Після чого, утворений осад центрифугували, розчиняли в невеликому об'ємі води і після короткочасного діалізу (2-3 год) проти дистильованої води наносили на промиту 1 М розчином хлориду натрію колонку, заповнену афінним сорбентом. В якості афінного сорбенту використовували поперечно-зшитий овомуцин, виготовлений за відомим способом [86]. Після входження розчину лектину в гель останній промивали від баластних білків 1 М розчином хлориду натрію. Сорбований на колонці лектин знімали за допомогою 0,1М боратного буферного розчину з рН 9,0 –9,8, підігрітого до температури 30 - 55°C. Графік цього етапу очистки наведено на рис.3.6.

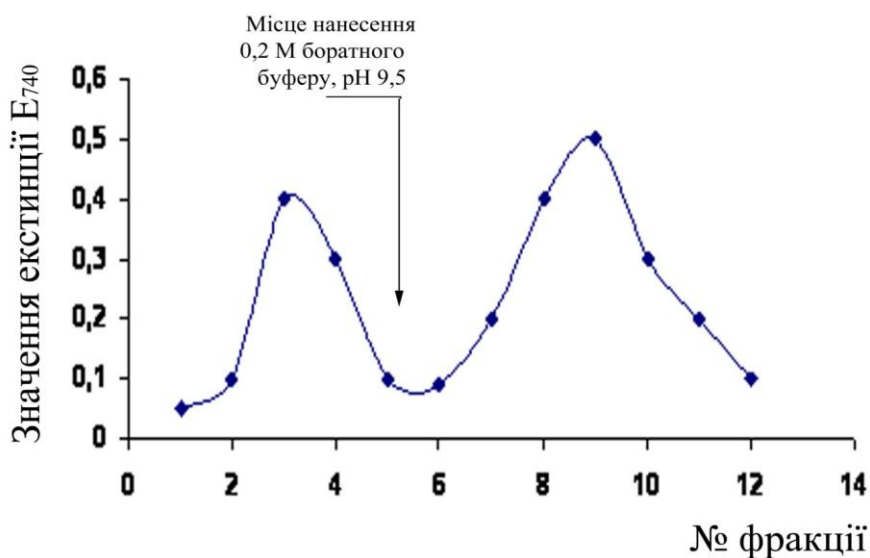


Рис.3.6 Графік очистки лектину кори з використанням афінної хроматографії

Необхідність застосування підігрітого буферного розчину з рН 9,0 –9,8 обумовлена сильною сорбцією лектину на афінному сорбенті. При нагріванні буферного розчину забезпечується більш швидка і концентрована елюція лектину з афінного сорбенту.

У таблиці 3.3 наведено розрахунок ефективності очистки лектину кори за розробленим способом.

Табл. 3.3

Розрахунок ефективності очищення лектину кори бруслини європейської

N	Стадія очистки	V (ml)	C (mg/ml)	T	V x T	C x V = m (mg)	Білок, (%)	Активність, (%)	Ефективність очистки
1	Початковий екстракт	1540	1.8	2 ⁻³	12320	2772	100	100	1
2	Осадження NaCl (після діалізу)	80	0.42	2 ⁻⁷	10240	33.6	1.2	83.1	69.25
3	Очистка DEAE-Toyopearl	3.6	0.75	2 ⁻¹¹	7373	2.7	0.097	59.8	616
4	Афінна хроматографія	2.6	0.72	2 ⁻¹¹	5308	1.87	0.068	43.1	634

Примітка. Для виділення і очистки лектину було взято 150 г кори, висушеної до повітряно-сухого стану; активність (%) – частка від ділення VxT наступної стадії до VxT початкової стадії: $10240 : 12320 \times 100 \% = 83,1$; ефективність очистки визначали як частку від відсотку виходу за активністю на відсоток виходу за білком; ефективність очистки початкового екстракту приймалась за 1.

Вихід лектину з колонки контролювали за вмістом білку методом Лоурі або на спектрофотометрі при 280 нм. Фракції, що містять білок, об'єднували, лектин висолювали хлоридом натрію або сульфатом амонію. Одержаний лектин зберігали у висоложеному стані або після вичерпного діалізу проти дистильованої води ліофільно висушували.

Результати проведених досліджень щодо виділення та очистки лектину кори рослини використані при розробці «Лабораторного регламенту одержання лектину з кори бруслини європейської (*Euonymus europaeus* L.)», який впроваджено у виробничий процес НВК «Лектинотест» (м. Львів).

3.2.4 Одержання лектину насіння бруслини європейської

Для порівняльного дослідження лектинів, одержаних з різних видів сировини рослини, нами проведено виділення також лектину з насіння. Через велику кількість жирної олії подрібнена сировина злипається і погано подрібнюється. Крім того, вихід лектину з насіння без знежирення знижується через втрати при центрифугуванні та фільтруванні. Тому ми поділяли рослинну сировину на дві частини по 50 г кожна і одну порцію заливали 200 мл 96° етанолу, як рекомендовано в роботі [89], а другу частину заливали гексаном ($t_{\text{кип}} = 40 - 70^{\circ}\text{C}$). Після 30-ти хвилинного перемішування нерозчинений залишок відділяли від екстракту, висушували при кімнатній температурі і зважували. Встановлено, що при екстракції етанолом сухий залишок становив 36 г, а при екстракції петролейним ефіром – 30 г. Це свідчить, що петролейний ефір більш повно екстрагує жири із сировини рослини. Знежирену сировину повторно подрібнювали на електромлинку і використовували для екстракції лектину.

3.2.5. Результати порівняльного аналізу лектинів

Чистоту білкових препаратів, якими є лектини, прийнято оцінювати за допомогою електрофорезу. Загальноприйнятим є оцінка чистоти одержаного препарату після проведення електрофорезу в поліактриламідному гелі в денатуруючих умовах (в присутності 0,1 % додецилсульфату натрію) та у відсутності детергента в лужних та кислих умовах.

Результати електрофорезу очищеного препарату лектину кори бруслини європейської, одержаного за описаним вище способом, представлені на рис.3.7 лектину насіння рослини на рис. 3.8.

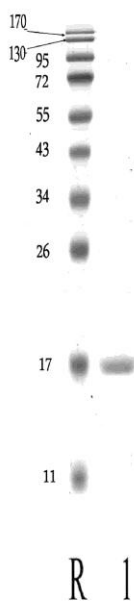


Рис.3.7 Електрофореграма лектину кори

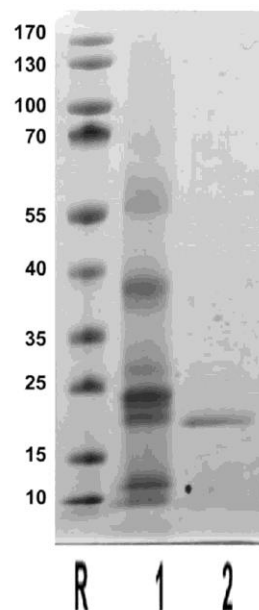


Рис.3.8 Електрофореграма лектину насіння

В обох випадках використано 15 %-ний ПААГ, тріс-НСІ буферний розчин, рН 8,6 за присутності 0,1 % ДДС-натрію. R – розміщення стандартної суміші білків-маркерів відомої молекулярної маси. Положення субодиноць очищеного лектину кори (лінія 1 на Рис.3.7) та лектину насіння (лінія 2 на Рис.3.8) вказує, що їх молекулярна маса є однаковою і рівною 17 к Да.

Наступним етапом порівняльного аналізу було визначення взаємодії лектинів кори і насіння рослини з еритроцитами, результати цього наведені у таблиці 3.4, та дослідження їх вуглеводної специфічності, яке проводилося за методикою [90] (таблиця 3.5).

Табл. 3.4

Дослідження взаємодії лектинів кори та насіння бруслини європейської з еритроцитами людини та тварин

№ п/п	Тип еритроцитів	Джерело одержання лектину	
		кора	насіння
1	Людина, I(0)	2^{-11}	2^{-11}
2	Людина, II (A)	2^{-8}	2^{-8}
3	Людина III (B)	2^{-11}	2^{-11}
4	Кролик	2^{-15}	2^{-15}
5	Миша	—	—

6	Щур	2^{-8}	2^{-8}
7	Морська свинка	2^{-3}	2^{-3}
8	Короп	—	—
9	Качка	—	—
10	Курка	—	—
11	Собака	2^{-13}	2^{-13}

Примітка: титр гемаглютинації (найбільше розведення, при якому спостерігається аглютинація) в таблиці представлений у вигляді показника ступеня, наприклад, $2^{-8} = 1: 256$.

Табл. 3.5

Вуглеводна специфічність лектинів кори та насіння бруслини європейської

№ п/п	Вуглевод	Мінімальна конц. вуглеводу (в мМ) або глікопротеїну, що пригнічує активність 4 гемаглютинуючих одиниць лектину	
		Лектин кори	Лектин насіння
1	D-глюкоза	-	-
2	D-галактоза	-	-
3	Мальтоза	-	-
4	Лактоза	50	50
5	Сахароза	-	-
6	α -метил-D-галактопіранозид	-	-
7	β -метил-D-галактопіранозид	-	-
8	α -метил-D-манопіранозид	-	-
9	Групоспецифічна речовина Н крові людини	0,03 %	0,03 %
10	Групоспецифічна речовина А крові людини	0,125 %	0,125 %
11	Групоспецифічна речовина В крові людини	0,004 %	0,004 %
12	α -феніл-N-ацетил-D- глюкозамін	-	-
13	L-рамноза	-	-
14	Муцин підщелепної залози бика	1 %	1 %
15	N-ацетил-D-галактозамін	-	-
16	N-ацетил-D-глюкозамін	-	-
17	Трансферин 1 %	-	-

18	Тиреоглобулін бика.	1 %	1 %
19	IgG людини	1 %	1 %
20	Дріжджевий манан	-	-
21	L-фукоза	-	-
22	L-арабіноза	-	-
23	Ристоміцин	1 %	1 %
24	4-нітрофеніл- β -D-глюкопіранозид	40 мМ	40 мМ
25	4-нітрофеніл- α -D-манопіранозид	-	-
26	α -феніл-N-ацетил-D-глюкопіранозид	-	-
27	Целобіоза	-	-
28	Глікоген печінки свині	-	-
29	Овомукоїд	1 %	1 %

Результати дослідження взаємодії з еритроцитами та вуглеводної специфічності отриманих лектинів із різних видів сировини, вказують на їх ідентичність.

Достатньо важливим практичним напрямком застосування лектинів в медицині є їх використання з аналітико-діагностичними цілями в гістохімічних дослідженнях. Тому завершальним етапом порівняльного аналізу отриманих лектинів кори і насіння бруслини європейської було гістохімічне дослідження щодо зв'язування їх з глюкостатинами тканин ссавців, проведене на кафедрі гістології ЛНМУ ім. Д. Галицького за допомогою мічених пероксидазою хрому лектинів на ендометрії щурів (методика описана в розділі 2.2). Результати аналізу наведені на рис.3.9.

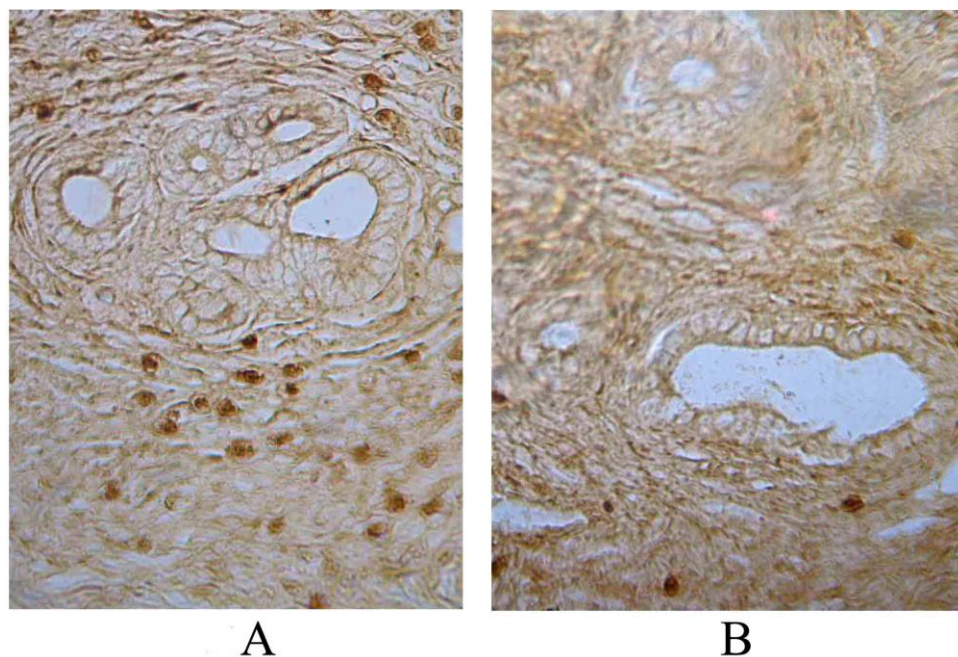


Рис. 3.9 Порівняння гістологічних зрізів при застосуванні лектинів кори (А) та насіння (В)

Для обох виділених лектинів (кори та насіння бруслини європейської), помічених пероксидазою у гістологічних зрізах ендометрію, спостерігалось зв'язування лектинів у наступних структурах: поверхневому епітелії та епітелії залоз (апикальна частина клітин), лейкоцитах, розташованих у власній пластинці слизової оболонки, волокнистих структурах, особливо периферійних ділянок ендометрія, а також у цитоплазмі децидуальних клітин. Лейкоцити і волокнисті структури давали більш інтенсивну позитивну реакцію, порівняно із поверхневим епітелієм, епітелієм залоз, а також децидуальними клітинами (рис.3.9).

Одержані результати свідчать, що лектин кори бруслини європейської у гістохімічних дослідженнях може замінити лектин арилусів насіння рослини. За вуглеводною специфічністю ці лектини є практично ідентичними. Перевагою лектину кори є можливість заготівлі рослинної сировини у будь-яку пору року. Однак найкращим часом заготівлі кори, як сировини для отримання лектину є фенофаза сокоруху, коли активність лектинів в екстрактах кори зростає у декілька разів. Як видно з рис. 3.2 тоді активність лектину в корі рослини у 32 рази вища, ніж у зимовий період спокою рослини. З сировини, зібраної у цей період, можна одержати таку ж кількість лектину, як і з арилусів насіння. Перевагою одержання

лектину з кори є також відсутність необхідності проведення знежирення сировини, що зменшує кількість стадій при очистці лектину.

В той же час досліджений нами характер змін активності лектинів в корі, плодах та листках рослини на протязі річного вегетаційного циклу вказує на їх можливу транспортну функцію. Суттєве зростання активності лектину в екстрактах кори в фенофазу сокоруху, зниження цієї активності в літній період після припинення росту листків та повторне зростання активності восени до моменту повного дозрівання плодів свідчить про можливий транспорт необхідних для таких процесів вуглеводовмісних речовин (вуглеводів та глікопептидів).

3.2.6 Комплексне одержання лектину кори рослини та хітинзв'язуючих білків кори

Хітинзв'язуючі білки кори бруслини європейської одержували як етап отримання лектину із цієї сировини, а також за окремою методикою.

У роботі бельгійських вчених [65] хітинзв'язуючий білок бруслини європейської отримували шляхом екстрагування свіжозібраної ліофільно висушеної сировини 0,2 М розчином NaCl, очищення проводили на колонці хітину. Колонку промивали 0,2 М розчином NaCl, після чого пептид елюювали 20 мМ оцтовою кислотою.

Саме ця методика була взята нами за основу. Кору бруслини в дослідженні використовували як свіжозібрану, так і висушену при 55°C, екстракцію здійснювали як 1 % розчином NaCl, так і розчинами H₂SO₄ різної концентрації (0,09% – 2 %) з додаванням 0,1 – 1 М розчину NaCl з метою дослідження ефективності режиму екстракції.

Одержаний екстракт (екстрагент 0,2 М NaCl) підкисляли до pH 4,0 і осад, що утворювався, видаляли центрифугуванням. Після цього pH доводили до 7,5 і невеликий утворений осад знову видаляли. Освітлений екстракт наносили на колонку з порошкового хітину, попередньо промитого і врівноваженого 1 М розчином NaCl. Після пропускання екстракту кори бруслини колонку промивали 1 М розчином NaCl до зниження екстинції при довжині хвилі 280 нм в елюаті до

0,1 і після цього хітин-зв'язуючі білки, адсорбовані на колонці, елюювали 2 % розчином ацетатної кислоти.

У випадку отримання хітинзв'язуючих білків кори рослини за окремою схемою, було встановлено, що для самостійного одержання хітинзв'язуючих пептидів кору бруслини можна сушити при температурі 55°C, а екстракцію краще здійснювати 0,9 % розчином сульфатної кислоти (pH 2,9). Екстракт слід концентрувати шляхом упарювання при 55°C в сушильній шафі до незначного об'єму.

Одержаний екстракт кори бруслини європейської освітляли шляхом центрифугування, доводили до pH 6,0 – 7,5 та після фільтрування наносили на колонку з порошкового хітину, попередньо промитого і врівноваженого 1 М розчином NaCl. Після нанесення екстракту кори бруслини колонку промивали 1 М розчином NaCl до зниження екстинції при довжині хвилі 280 нм в елюаті до 0,1. Хітинзв'язуючі білки, адсорбовані на колонці, елюювали буфером, що містив 0,5 М NaCl і 6 мл 36 % розчину HCl (на 1 л) з pH 2,8.

Елюат концентрували і хітинзв'язуючі білки розділяли з використанням гель-хроматографії на сефадексі G-25. В результаті було одержано дві фракції хітинзв'язуючих білків з молекулярною масою ≈ 49 кДа і ≈ 5 кДа. Графік розділення хітинзв'язуючих білків представлено на рис.3.10. Вони не аглютинували еритроцити крові людини і кролика. Хітинзв'язуючий лектин з молекулярною масою 5 кДа не осаджувався сульфатом амонію, але осаджувався 3 об'ємами ацетону.

Фракції, що мали значну екстинцію при довжині хвилі 280 нм, об'єднували, з додаванням лугу доводили до pH 5,6, підсушували у сушильній шафі при 60°C і для видалення солі ставили на ніч для проведення діалізу проти води. На другий день осад видаляли фільтруванням. Білки із розчину осаджували 2 об'ємами ацетону, а утворений осад розчиняли у 1 % розчині ацетатної кислоти. Осад, що не розчинився видаляли. Концентрацію суми двох білків визначали за екстинцією при довжині хвилі 280 нм. З метою контролю процесу проводили повторну

афінну хроматографію на колонці хітину. Результати виділення хітинзв'язуючих білків кори рослини наведені в таблиці 3.6.

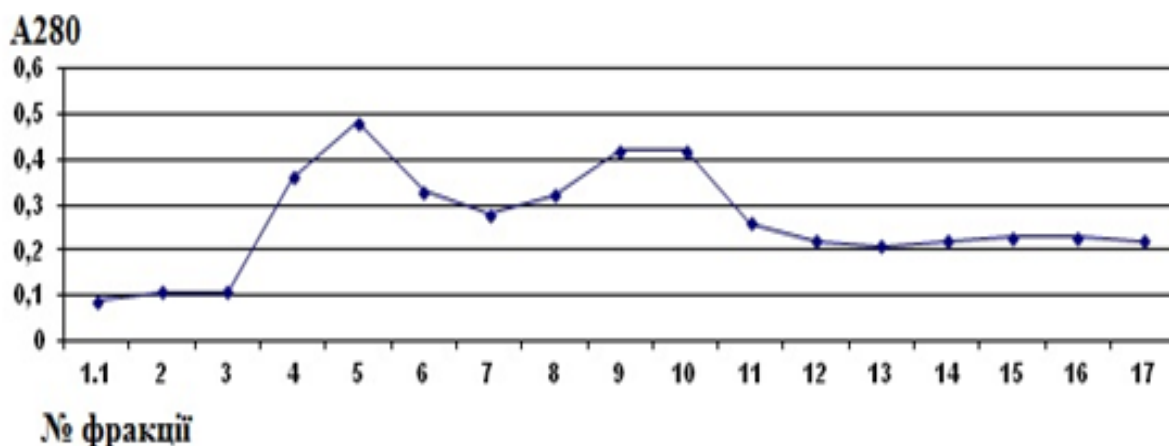


Рис.3.10 Розділення хітинзв'язуючих білків бруслини європейської з використанням гелі-хромаграфії (сефадекс G-25)

Відповідно до результатів наведених у таблиці 3.6, видно, що хітинзв'язуючі білки з кори бруслини європейської можна одержувати як із свіжозібраної, так і висушеної сировини. Вони є достатньо стійкими до дії кислот і при екстракції рослинної сировини розчином сульфатної кислоти вихід їх з сировини підвищується, можливо, через зниження впливу гідролітичних ферментів.

Табл. 3.6

Вихід суми хітинзв'язуючих пептидів з кори бруслини європейської в залежності від сировини та способу екстракції

№ дос-ліду	Вид сировини та екстрагент	Аналізовані зразки			Вихід хітинзв'язуючих пептидів з сировини (мг/кг)
		V _{проби} (мл)	C, (мг/мл)	Маса пептидів (мг)	
1.	Свіжа кора (440 г), екстрагована 6% р-ном NaCl	5,0	1,0	5,0	11,4

2.	Свіжа кора (400 г), екстрагована 0,09% р- ном H_2SO_4	4,5	1,2	5,4	13,5
3.	Суша кора (200 г), екстрагована 0,9% р-ном H_2SO_4	6,5	2,3	14,95	74,75

Одержані хітинзв'язуючі пептиди також досить стійкі до дії температури, нами не спостерігалось їх денатурації при кип'ятінні розчинів пептидів протягом 5 хвилин. У зв'язку з описаною в літературі антимікробною та протигрибковою активністю хітинзв'язуючих пептидів бруслини європейської, вони можуть бути перспективними для досліджень в якості протимікробних лікарських засобів.

3.3 Дослідження жирної олії насіння бруслини європейської

Олію з насіння одержували методом екстракції гексаном як етап проведення знежирення насіння рослини при одержанні лектину із даного виду сировини. Отримана жирна олія бруслини європейської розчинна в хлороводнях (хлороформ, метиленхлорид), ацетоні, спиртах, вуглеводнях (гексан, петролейний ефір). Хімічний склад олії, екстрагованої різними розчинниками, відрізняється. Зокрема, хлороводні та спирти можуть екстрагувати кардіоглікозиди, які є токсичними і наявність яких в олії є небажаною.

Як описано вище, при знежиренні насіння бруслини європейської використовували етанол та петролейний ефір. Одержані екстракти суттєво відрізнялися за зовнішнім виглядом та хімічним складом. Результати порівняння двох екстрактів наведено у таблиці 3.7.

Основні числові показники жирної олії, одержаної різними розчинниками

Екстрагент	Показники	
	вихід з сировини, %	Густина (при 20°C) , г/см ³
Етанол	17%±2 %	0,988
Петролейний ефір	24%±2%	0,939

Для встановлення хімічного складу жирної олії бруслини європейської, отриманої шляхом екстракції етанолом та петролейним ефіром, дослідження проводили за допомогою ТШХ. На першому етапі для розділення її компонентів було випробувано ряд систем органічних розчинників.

Петролейний ефір, метанол, ацетон та хлороформ у чистому вигляді не підходять для хроматографування, тому було випробувано також суміші цих розчинників, а саме – хлороформ : метанол, хлороформ : петролейний ефір: метанол у різних співвідношеннях, а також ці розчинники з додаванням диметилформаміду, метиламіну та ацетатної кислоти. Хроматографування проводили також в системі метиленхлорид:ацетатна льодяна кислота: ацетон (20:40:50) з проявленням фосфорно-молібденовим реактивом. Проте найкращі результати були отримані при додаванні до системи розчинників льодяної оцтової кислоти. В результаті нами була обрана оптимальна система хлороформ : льодяна ацетатна кислота (100:1), яку використовували як для тонкошарової хроматографії, так і для колонкової хроматографії. Хроматографування здійснювали на пластинках силуфолу. Хроматограми проявляли розчином судану IV (для виявлення ефірів вищих жирних кислот), фосфорно- молібденовою кислотою та парами йоду.

За результатами ТШХ встановлено, що жирна олія рослини містить щонайменше 3 ефіри вищих жирних кислот. Найбільшу частку серед жирних

кислот мають ненасичені, зокрема олеїнова кислота. На хроматограмі, проявленій парами йоду, було виявлено поряд з ефірами і ряд інших речовин.

Для дослідження хімічного складу жирної олії було проведено їх фракціонування за допомогою органічних розчинників, змінюючи їх полярність.

Жирну олію з насіння бруслини європейської екстрагували петролейним ефіром або гексаном. Після відгонки екстрагенту та висушування екстракту проводили фракціонування олії за допомогою розчинників різної полярності. Спершу одержану олію екстрагували метанолом. Нерозчинний у метанолі залишок після висушування екстрагували ацетоном. Нерозчинний у ацетоні залишок повністю розчинився у хлороформі. Метанольний екстракт становив близько 17% , залишок після екстракції метанолом висушували і проводили екстракцію за допомогою ацетону. Ацетоновий екстракт становив близько 74%. Після випаровування ацетону залишок олії повністю розчинився у хлороформі. Вміст хлороформної фракції 5%. Ацетоновий та хлороформний залишок додатково розділяли методом колонкової хроматографії на силікагелі.

Колонку промивали сумішшю хлороформ-оцтова кислота (100:1) , далі додавали до суміші хлороформ-оцтова кислота-метанол, частку якого поступово збільшували.

Для встановлення компонентного складу олії проводили аналіз проб за допомогою ГХ-мас-спектрометрії. Дані ГХ-мас-спектрометрії при дослідженні етанольного екстракту насіння бруслини європейської наведені у таблиці 3.8.

Табл.3.8

Хімічний склад етанольного екстракту насіння бруслини європейської

№	Назва речовини	% вміст	% достовірності (співпадання мас-спектру з еталонним зразком)
1.	Метиловий ефір пальмітинової к-ти	3,48	97

2.	Етиловий ефір пальмітинової к-ти	1,46	96
3.	7-ізопропіл-1,1,4а-октагідрофенантрен (абієтатрієн)	6,31	87
4.	Метиловий ефір ліноленової к-ти	8,45	99
5.	Метиловий ефір октадеканової к-ти	20,71	99
6.	Етиловий ефір ліноленової к-ти	2,81	99
7.	Етиловий ефір олеїнової к-ти	4,46	99
8.	Гіберилін	2,9	43

Примітка. У таблиці наведені дані лише тих сполук, які було виявлено із високою ймовірністю.

Метанольна та ацетонова фракції були схожими за складом. Виявлено із високою ймовірністю такі речовини абієтатрієн, каур-16-єн, гібереліни, лінолеву та пальмітинову кислоти, похідні фуранону (бутенолід). У ацетоновій фракції виявлено сквален, велика кількість проміжних продуктів синтезу, похідних індолу, аміноциклогексану, ароматичних кетонів.

Хлороформна фракція жирної олії нами додатково розділена методом колонкової хроматографії на силікагелі.

В результаті отримали 27 фракцій, зокрема 5-7 фракції мали жовтий колір (каротиноїди). Відібрали 3 найбільші за масою фракції та провели вивчення їх хімічного складу.

Фракція 9. Ідентифіковано такі речовини як ерукамід, вітамін Е, похідні акридину та не ідентифікована речовина, яка ймовірно є алкалоїдом похідним ізохіноліну.

Фракції 16-17. В основному містила жирні кислоти пальмітинова, олеїнова та ліноленова, вуглеводні гексатрикозан, пентатрикозан, октадекан, гамаситостерол, олеоамід, або ерукамід,

Фракція 21. Виявлені тетракозагексаен (ациклічний похідний тритерпенів), похідна сполука спіро [2Н-інден-ізохінолін], 10-диметилсквален та жирні кислоти: стеаринова, пальмітинова, олеїнова.

Оскільки екстракція етанолом є менш ефективною, а отже не повністю забезпечує знежирення, а також можливе екстрагування кардіоглікозидів, які можуть обмежувати подальше застосування екстракту, наступні дослідження проводилися лише з гексановим або петролейно ефірним екстрактом.

Одержана олія - в'язка рідина яскраво-помаранчевого кольору із специфічним запахом. Вихід олії становить 20-28% від маси насіння. З використанням фармакопейних методів аналізу встановлено основні числові показники жирної олії насіння бруслини європейської, які представлені в таблиці 3.0.

Табл. 3.9

Числові показники жирної олії насіння бруслини європейської

Екстагент	Числові показники						
	вихід з сировини, %	Густина (при 20°C) г/см ³	Показник заломлення	Кислотне число	Число омилення	Ефірне число	Йодне число
Гексан	24 ±4	0,939	1,475	4,04	149,9	145,86	120

Таким чином, одержана олія є легша за воду і має показник заломлення близький до обліпихової олії (1,478). Основні числові показники характерні для напіввисихаючих жирних олій, що містять у своєму складі високий вміст мононенасичених жирних кислот. Про це свідчить елаїдинова проба та реакція з бромною водою, які дали позитивний результат.

3.3.1 Дослідження жирних кислот олії насіння методом газової хроматографії

Якісний склад та кількісний вміст жирних кислот олії бруслини європейської були досліджені з використанням методу газової хроматографії на хроматографі Хром-5. Графік розділення представлений на рис.20, а результати - представлені в таблиці 3.10.

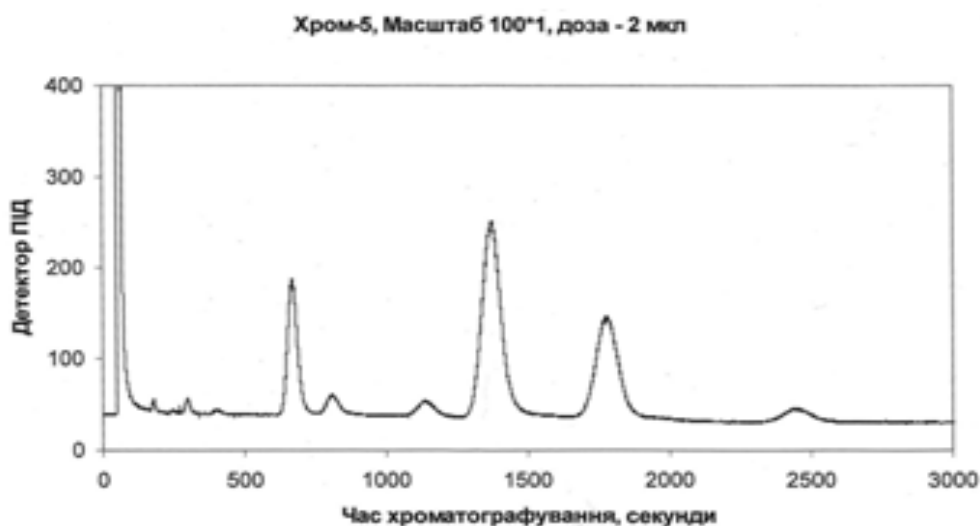


Рис. 3.11 Газова хроматограма жирних кислот олії насіння бруслини європейської

Табл. 3.10

Жирнокислотний склад олії бруслини європейської

	Кислота	Час виходу, (сек.)	Висота піку	Поправочний коефіцієнт	Площа піку	Вміст, %
1	С 10:0 (капринова кислота)	177,6	12,0660	0,10	1,21	0,13
2	С 12:0 (лауринова кислота)	298,0	15,0095	0,18	2,70	0,29
3	С 14:0 (міристинова кислота)	403,0	3,8985	0,31	1,21	0,13

4	C 16:0 (пальмітинова кислота)	668,1	46,7572	0,60	88,06	9,46
5	C 16:1 (пальмітоолеїнова кислота)	808,4	20,31	0,87	17,68	1,90
6	C 18:0 (стеаринова кислота)	1138,6	13,9319	1,47	20,48	2,20
7	C 18:1 (олеїнова кислота)	1372,2	209,9759	2,09	438,84	47,15
8	C 18:2 (лінолева кислота)	1779,6	108,0784	2,79	301,54	32,40
9	C 18:3 (ліноленова кислота)	2445,9	13,8875	4,25	59,03	6,34

Як вказують результати дослідження, наведені у таблиці 13, виявлено 9 жирних кислот, серед яких 4 є ненасиченими (олеїнова, пальмітоолеїнова, лінолева та ліноленова), що в сумі складає 87,79 % усіх жирних кислот олії бруслини європейської.

Лінолева та ліноленові кислоти є незамінними кислотами і їх відсутність випадання волосся і погане загоєння ран, а лінолева кислота необхідна в біосинтезі арахідонової кислоти, а також деяких простогландинів, лейкотрієнів та тромбоксану [191-193].

3.3.2 Дослідження вмісту каротиноїдів та токоферолів жирної олії

Фармакологічна дія багатьох жирних олій, а також олії обліпихи в значній мірі пояснюється наявністю високого вмісту вітамінів, перед усім каротиноїдів та токоферолів. Тому нами було досліджено (якісно та кількісно) ці два найважливіші вітаміни у жирній олії бруслини європейської. З цією метою

речовини жирної олії розділяли з використанням колонкової хроматографії (силікагель) і одержані фракції аналізували за допомогою ТШХ.

Для цього наважку жирної олії (0,870 г), розчиняли в 5,0 мл хлороформу і наносили на колонку силікагелю ($h = 25$ см, $d = 1,2$ см), попередньо промиту сумішшю хлороформ : ацетатна к-та (100 : 1). Фракції збирали по 1,5 мл у зважені з точністю до 0,001 г пробірки. Після отримання 22-ох фракцій колонку промивали сумішшю хлороформ-ацетатна к-та- метанол а(100 : 1 : 4) (наступні 23 фракції), а після цього елюювання здійснювали сумішшю хлороформ- ацетатна к-та- метанол (100 : 1 : 150) (наступні 23 фракції). Після промивання колонки розчинник випаровували в сушильній шафі при температурі 60°C , одержані фракції зважували і будували графік залежності маси фракцій від їх номера (рис. 3.12).

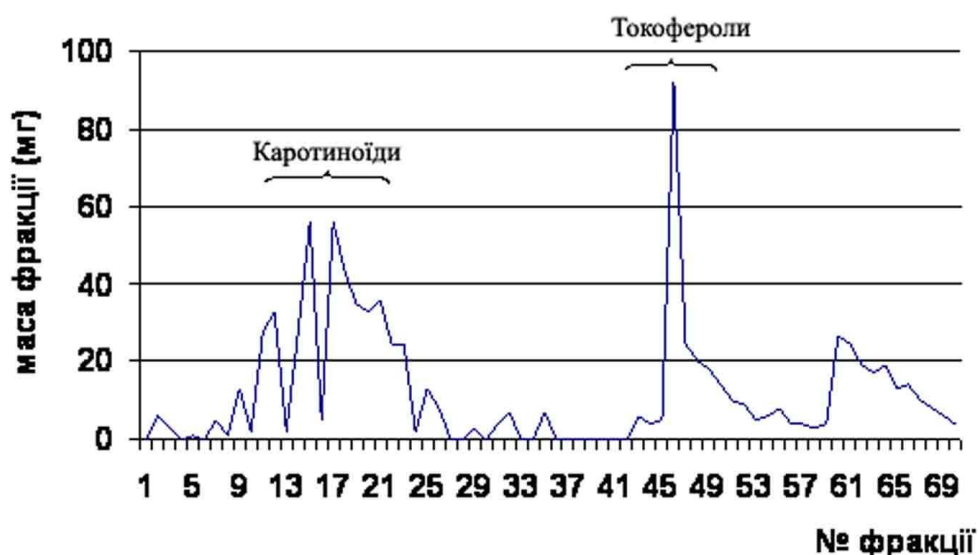


Рис. 3.12 Графік фракціонування жирної олії методом колонкової хроматографії

Одержані фракції аналізували методом ТШХ на наявність каротиноїдів та токоферолів. Виявлення каротиноїдів здійснювали за допомогою реакції з 2 % розчином п-амінобензальдегіду в суміші етанолу та хлоридної к-ти з наступним витримуванням хроматограм в сушильній шафі при температурі 90°C . Каротиноїди на хроматограмах забарвлюються в рожево-фіолетовий колір.

Виявлення токоферолів здійснювали після оприскування хроматограм 56 % розчином азотної кислоти з наступним витримуванням хроматограм в сушильній

шафі при температурі 80⁰С. При наявності токоферолів плями забарвлюються в оранжево-червоний колір, на відміну від каротиноїдів та стероїдних речовин, які такого забарвлення не дають.

Кількісне визначення каротиноїдів здійснювали у відповідно об'єднаних фракціях, шляхом вимірювання екстинції хлороформного розчину при довжині хвилі 460 нм на спектрофотометрі СФ-46 у кюветі з товщиною шару 10 мм. З цією метою фракції 9 – 26 розчиняли в 50 мл хлороформу.

Хроматографічне дослідження на пластинках «силуфол» різних фракцій, одержаних шляхом колонкової хроматографії, показало наявність каротиноїдів у 9 – 25 фракціях і їх відсутність у інших фракціях. Токофероли були виявлені у 45-53 фракціях. Всі фракції (9-64) крім 65-69 фракцій, давали позитивну реакцію з розчином фосфорно-молібденової кислоти. Розчини фракцій 9, 10, 12, 20, 21 у ізоаміловому спирті давали характерні спектри для каротиноїдів (максимум в області 450-460 нм), однак, між собою вони трохи відрізнялись, що може свідчити про відмінності у їх складі. Для прикладу на рис. 3.13 наведені УФ-спектри фракцій №9 та № 20, виміряні на спектрофотометрі NanoDrop 1000

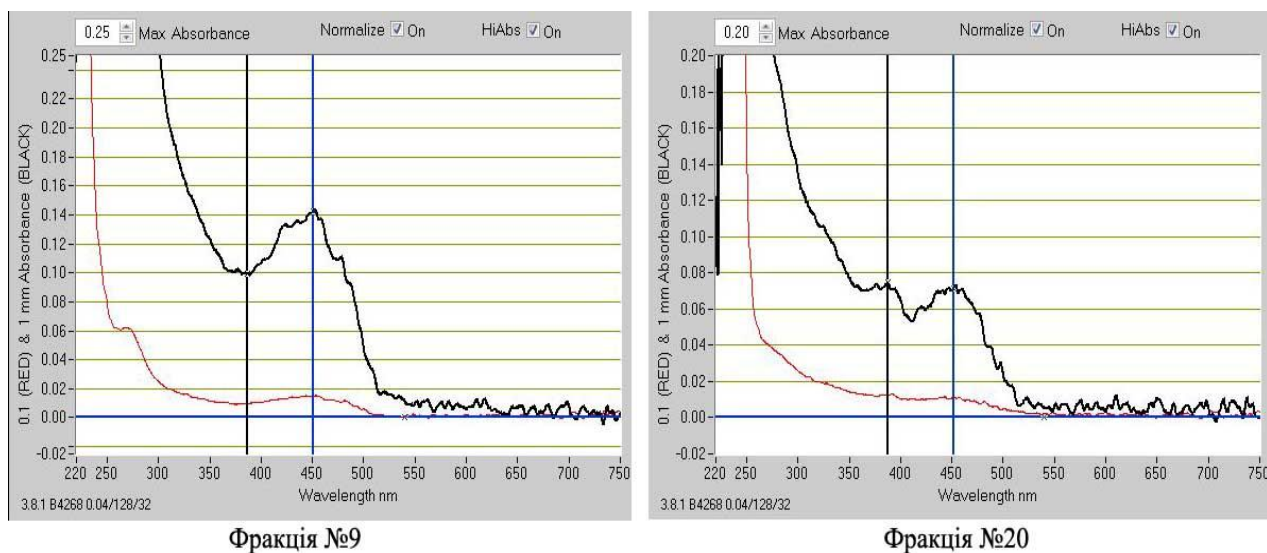


Рис. 3.13 УФ-спектри фракцій №9 та № 20 жирної олії бруслини європейської

Слід відмітити, що усі ці фракції містили також жирні кислоти, які складали їх основну масу, тому для кількісного визначення каротиноїдів та токоферолів використали не ваговий, а спектрофотометричний метод визначення.

У результаті проведеного дослідження було встановлено, що жирна олія насіння бруслини європейської містить 26 ± 5 мг% суми каротиноїдів в перерахунку на β -каротин та 40 ± 5 мг% суми токоферолів в перерахунку на α -токоферол. Це менше, ніж в обліпиховій олії, але значно більше, ніж у більшості досліджених жирних олій.

3.3.3 Ідентифікація та кількісне визначення сквалену в жирній олії бруслини європейської

Для дослідження вмісту сквалену нами проведена оптимізація умов його визначення. Одним із найважливіших компонентів жирних олій рослинного походження ж тритерпен сквален, зокрема амарантова і оливкова олії є основними джерелами його отримання. Сквален відіграє важливу фізіологічну роль, є потужним імуностимулятором, у складі косметичних засобів як ранозагоюючий чинник, також захищає шкіру від вільно радикального ушкодження та запобігає її старінню [151]. Враховуючи цей фактор, нами було проведено якісне та кількісне визначення сквалену у жирній олії бруслини європейської. Відповідно до оптимізованих умов методу високоефективної рідинної хроматографії з оберненою фазовою (RP-HPLC) для кількісного визначення сквалену у екстрактах насіння бруслини європейської у ізократичному режимі час виходу сквалену становив 9 хв за довжини хвилі 205 нм. (рис 3.14 і 3.15).

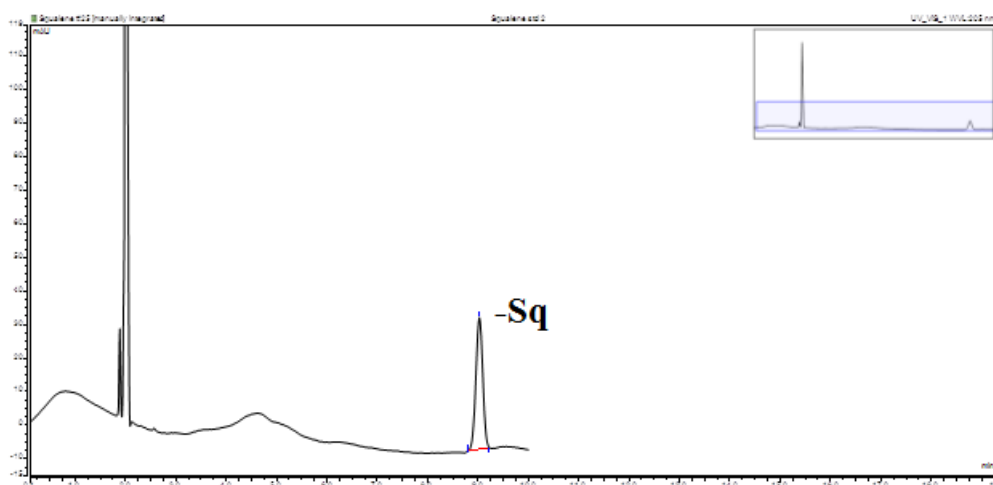


Рис. 3.14 Хроматограма стандартного розчину сквалену 0,1 мг/мл

Як видно з рисунку 3.14, методика характеризується повним хроматографічним розділенням піку сквалену від піків інших компонентів олії, що є необхідною вимогою для специфічності методики. Час утримування піку сквалену на хроматограмі олії бруслини європейської співпадає з часом утримування піку на хроматограмі розчину стандартного зразка сквалену (рис.3.14). За підібраних хроматографічних умов фактор симетрії отриманих піків сквалену наближається до одиниці, час утримування становить 9 хв.

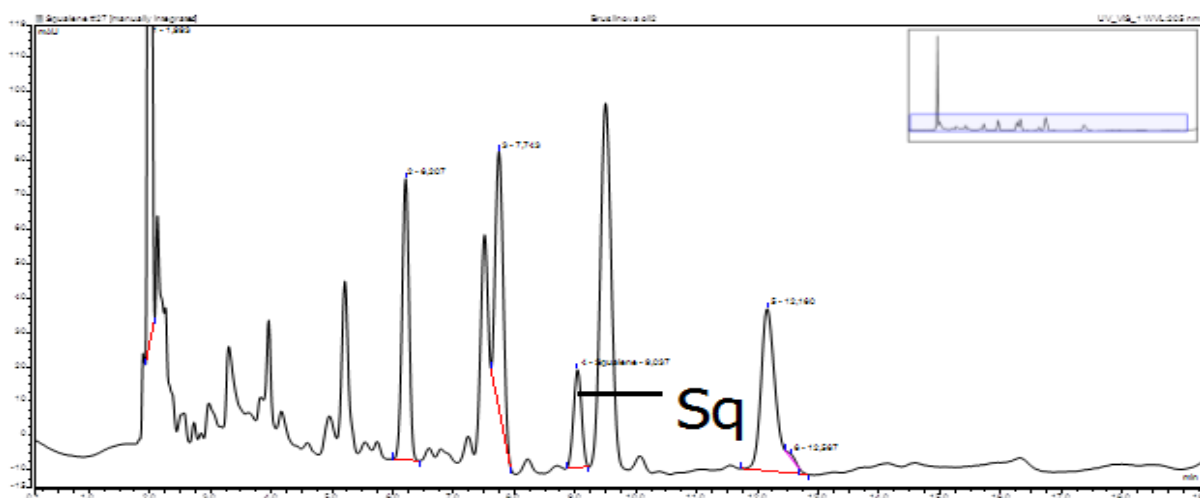


Рис. 3.15 Хроматограма розчину олії насіння бруслини європейської

Побудову калібрувального графіку для кількісного визначення сполуки проводили з використанням стандартного зразку сквалену здійснювали шляхом отримання хроматограм в діапазоні концентрацій 1 – 100 мкг/мл, при яких зберігається лінійність графіку. Різниця в часі виходу не перевищувала відносного стандартного відхилення, розрахованого для розчину стандартного зразка з п'яти послідовних хроматограм.

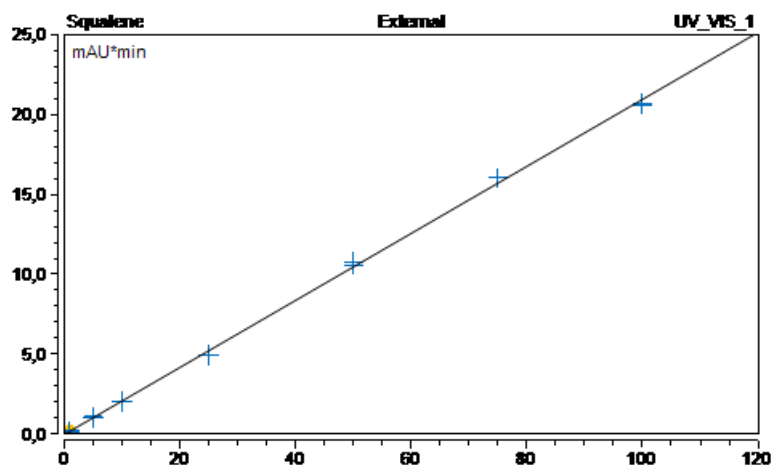


Рис. 3.16 Калібрувальна крива розчину сквалену, залежність сигналу від концентрації сквалену (1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 мкг/мл), коефіцієнт кореляції $R^2 = 0,9992$

Для встановлення діапазону застосування методики ми отримували по чергово по п'ять хроматограм для розчинів стандартного зразку кожної точки калібрувального графіка (рисунок 3.16). Обробку експериментальних даних виконували за методом найменших квадратів для прямої з двома параметрами. За результатами статистичної обробки калібрувальної кривої із рівнянням $y = a + bx$, розраховано межу виявлення, та межу кількісного визначення, які становлять 0,29 та 0,88 мкг/мл відповідно. Обчислене стандартне відхилення значення відтинку a калібрувального графіка рівне 0,01855, суттєво менше від нижньої границі діапазону концентрації, що не впливатиме на точність аналізу та вказує на коректність методики за параметром лінійності.

Вміст сквалену у олії насіння бруслини європейської визначали за калібрувальним графіком отриманим за хроматограмами стандартного зразка різної концентрації. Оптимізація умов методики визначення сквалену методом RP-HPLC, наведених в розділі 2, дала можливість виявити та кількісного визначити сквален у олії, екстрагованої гексаном з насіння бруслини європейської. Гексан, як розчинник, використовували для збільшення виходу сквалену та запобігання потрапляння в олію токсичних речовин, зокрема карденолідів.

У результаті дослідження нами було ідентифіковано сквален у олії з насіння даної рослини та визначено його кількісний вміст, який становив 1,84 мг/мл. Відповідно до літературних даних у більшості харчових олій (соєва, арахісова, соняшникова, кукурудзяна) вміст сквалену є нижчим. Вищий вміст сквалену виявлено у амарантовій та оливковій оліях .

Доволі високий вміст сквалену у суміші із каротиноїдами, токоферолами та ненасиченими жирними кислотами пояснює ефективність олії бруслини при лікуванні дерматологічних захворювань [151,152,154].

3.4 Дослідження ліпофільних екстрактів сировинних органів бруслини європейської

За розробленою нами методикою одержання лектинів із кори та насіння бруслини європейської, після екстракції лектинів 1%-им водним розчином NaCl, у сировині залишається велика кількість сполук, перш за все ліпофільної природи.

З метою раціонального використання рослинної сировини нами проведено дослідження якісного складу та кількісного вмісту біологічно активних речовин ліпофільного характеру.

3.4.1 Дослідження ліпофільних екстрактів методом тонкошарової хроматографії

Одним із найбільш вживаних методів хроматографічного аналізу сполу рослинного походження є хроматографія в тонкому шарі сорбенту. Незважаючи, що основи цього методу аналізу були закладені ще 1938 р., в даний час ТШХ все ще залишається достатньо простим, надійним і ефективним методом аналізу лікарських субстанцій, зокрема рослинного походження [51,58].

Для дослідження ліпофільних фракцій ми використовували методики ТШХ на пластинках «силуфол»; використовували хлороформні та метанольні екстракти кори, насіння та листя бруслини європейської. Для одержання екстрактів висушені сировинні органи подрібнювали та екстрагували метанолом та хлороформом у співвідношенні 1:5 (насіння та листя) , та у співвідношенні 1:10 (кора).

Були застосовані наступні системи розчинників:

- I- 3-хлоретилен-ацетатна кислота (100:1),
- II- толуол-метанол-ацетатна к-та (9,4:1:5),
- III- хлороформ-метанол-ацетатна к-та (9:1:1),
- IV- хлороформ-метанол-ацетатна к-та-гексан (9:1:1:5).

Після висушування хроматограми проявляли за флуоресценцією в УФ-світлі, з використанням парів йоду, фосфорно-молібденового реактиву, розчинів сульфатної та хлорної кислот.

Результати розділення екстрактів, отриманими різними розчинниками наведені на рисунках 3.17-3.22.

На усіх хроматограмах зразки нанесені наступним чином (зліва направо) метанольні екстракти листя -1, насіння-2, кори- 3, далі хлороформні екстракти кори - 4, насіння- 5, листя-6.

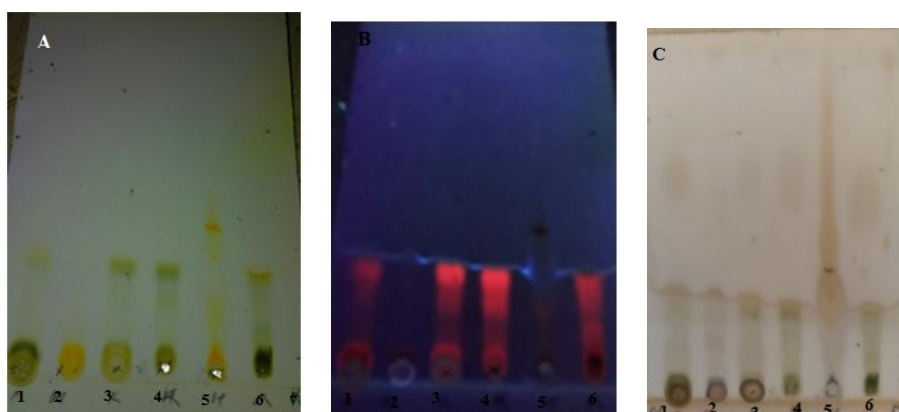


Рис. 3.17 Результати хроматографічного розділення ліпофільних екстрактів досліджуваних органів бруслини європейської, використовуючи систему розчинників I у видимому світлі, при перегляді в УФ світлі (B) та хроматограма проявлена парами йоду (C)

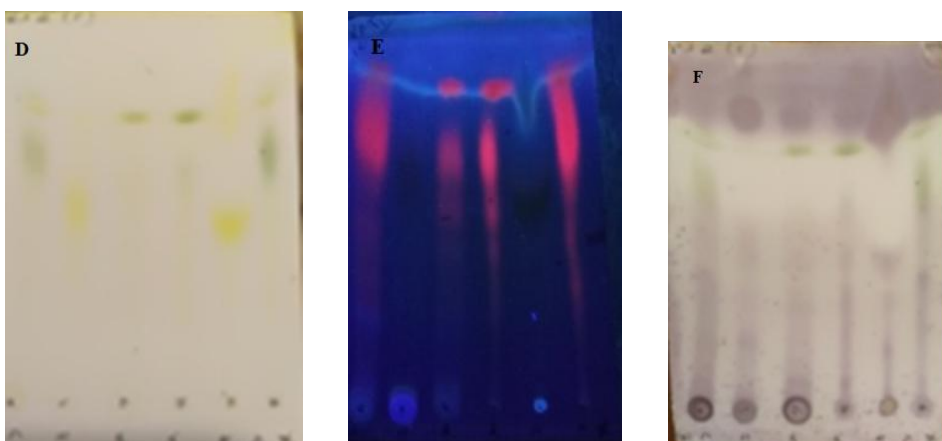


Рис. 3.18 Результати хроматографічного розділення ліпофільних екстрактів досліджуваних органів бруслини європейської при використанні системи розчинників III у видимому світлі, при перегляді в УФ світлі (E) та хроматограма проявлена парами йоду (F)

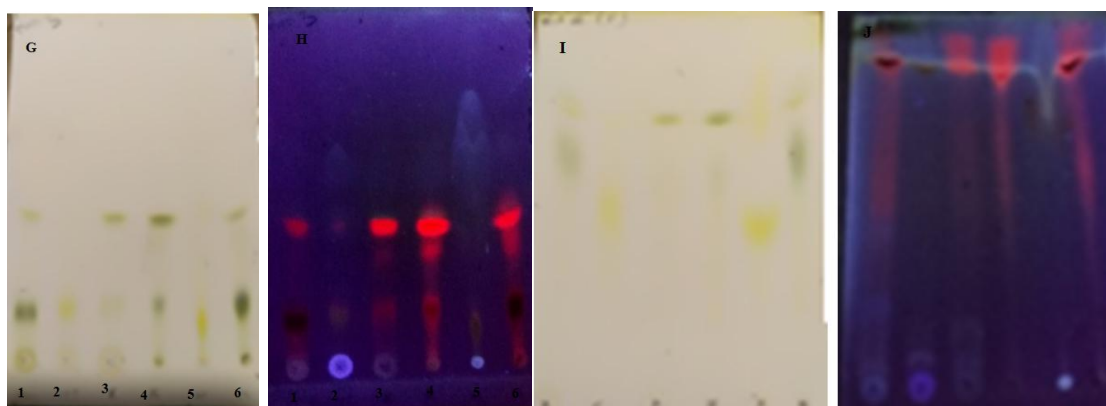


Рис. 3.19 Результати хроматографічного розділення ліпофільних екстрактів досліджуваних органів бруслини європейської при використанні системи розчинників II (G,H); та IV (I,J) у видимому та УФ-світлі

Система розчинників (толуол-метанол-ацетатна к-та (9,4:1:5)) була вибрана як найбільш оптимальна для розділення та ідентифікації.

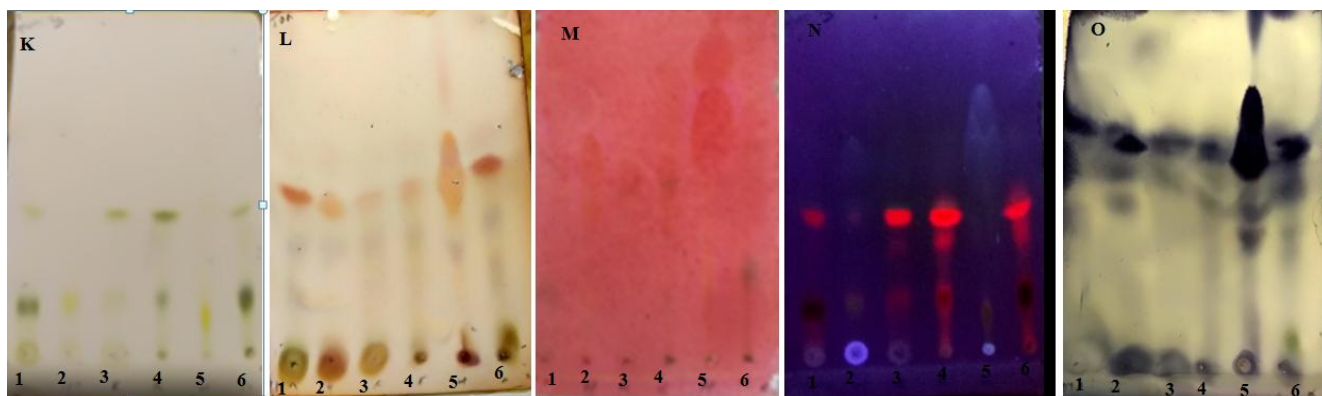


Рис. 3.20 Результати хроматографічного розділення ліпофільних екстрактів досліджуваних органів бруслини європейської при використанні системи розчинників II, обробка парами йоду (L), суданом IV (M), при перегляді в УФ-світлі (N), обробка фосфорно-молібденовим реактивом (O)

Аналізуючи одержані хроматограми помітним є факт, що профілі метанольних та хлороформних екстрактів кори (плями 3 і 4 на хроматограмах) та листя (плями

1,6) практично не відрізняються. Яскраво-малинова флуоресценція при аналізі хроматограм в УФ-світлі наймовірніше відповідає хлорофілу.

В той же час хроматограми метанольного та хлороформного екстрактів насіння (2,5) відрізняються більшою мірою, що свідчить про вичерпнішу екстракцію ліпофільних БАР у випадку використання як екстрагента хлороформу.

Хроматограми оброблені концентрованою сірчаною кислотою (О) (система хлороформ-метанол-ацетатна кислота (9:1:1) (зліва), система 3-хлоретилен-ацетатна кислота 100:1(справа).

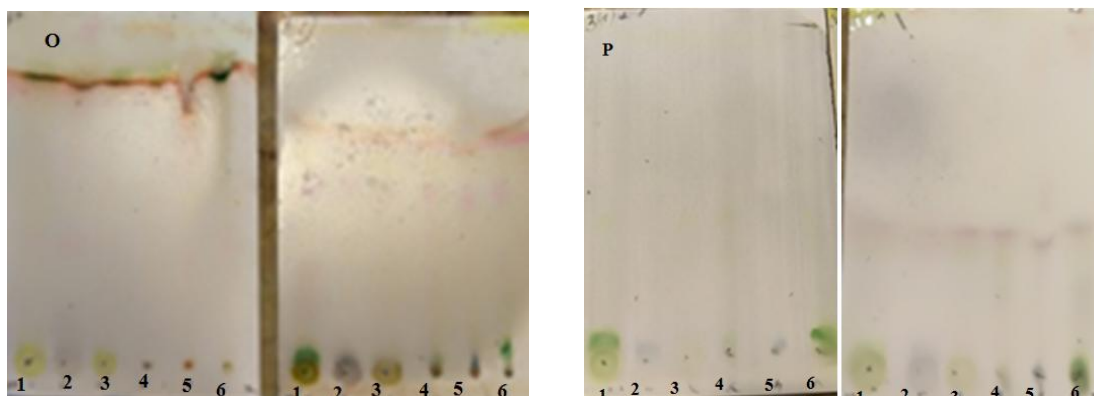


Рис. 3.21 Результати хроматографічного розділення, проявлення сірчаною кислотою (О), та рис.3.22 стибію хлоридом (Р)

Синю флуоресценцію спостерігаємо у місці нанесення екстрактів насіння, що може бути пов'язано із наявністю стероїдів як у метанольному так і у хлороформному екстрактах.

Для виявлення стероїдних сполук як реактив для хроматографії використовували розчин 20 % стибію хлориду в ізопропанолі. Синій колір, який появляється після нагрівання оброблених реактивом хроматограм при 5-10 хв при температурі 100⁰С, відповідає сполукам із стероїдним ядром, ймовірніше всього кардіоглікозидам.

У зв'язку із перспективністю застосування ліпофільних речовин у медицині ми продовжили аналіз даної групи БАР у екстрактах сировинних органів бруслини європейської з метою встановлення їх хімічного складу.

3.4.2 Дослідження ліпофільних фракцій методом газової хроматографії-мас спектроскопії

3.4.2.1 Дослідження ліпофільних речовин кори

У зв'язку із тим, що при екстракції лектинів 1% водним розчином NaCl у корі рослини залишається велика кількість речовин, перш за все ліпофільної природи, які не екстрагуються за цих умов, але які можуть представляти практичний інтерес, нами проведено вивчення їх складу за допомогою газової хроматографії-мас-спектрометрії (ГХ-МС).

Повітряно-суху кору, подрібнену до часточок 0,5 мм, екстрагували 1 % розчином NaCl, і цей екстракт використовували для одержання лектинів. Після відділення водного розчину, отримані вичавки (№1), висушували і екстрагували 95 % етанолом у співвідношенні 1:10. Етанол відганяли і залишок упарювали до густої мазеподібної маси. Етанольний розчин після упарювання розчинника було позначено як залишок №1а. Його нерозчинну частину обробили метанолом, і цей розчин після упарення позначили як залишок №1б.

Кору після екстракції етанолом висушували (вичавки №2) і після цього екстрагували хлороформом в апараті Соксклета. Хлороформ відганяли і після упарювання в сушильній шафі при 52°C, одержали темно-зеленого кольору мазеподібну масу, яку позначили як залишок №2 (рис 3.23).

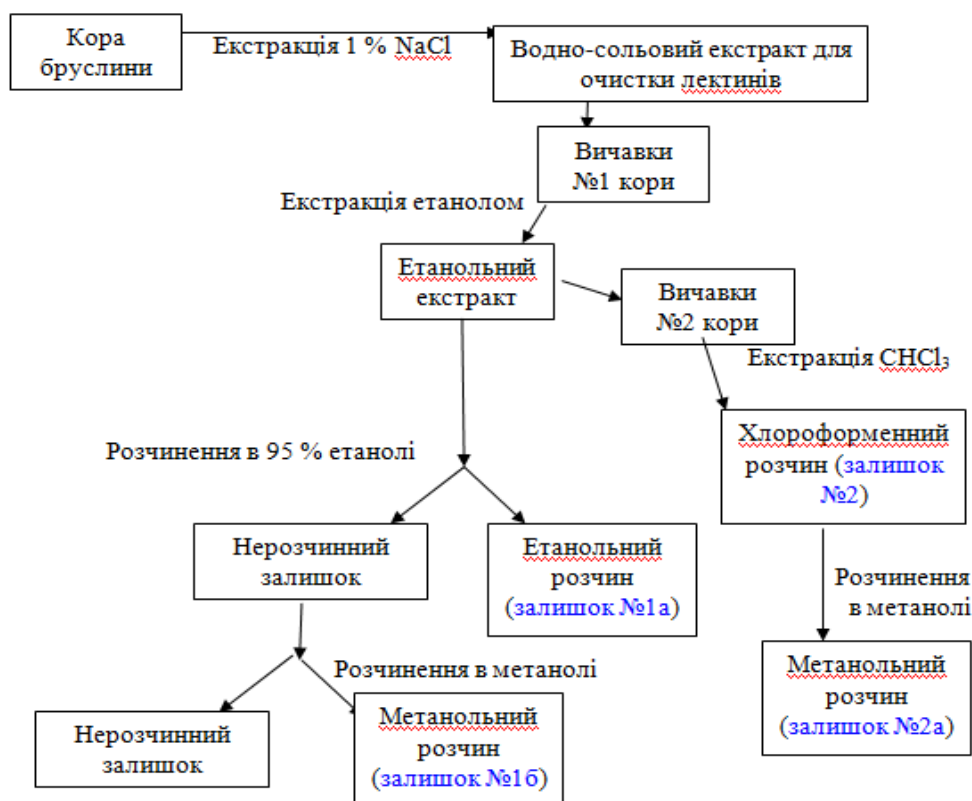


Рис 3.23. Схема комплексного дослідження кори бруслини європейської

З 50,0 г повітряно-сухої кори (після екстракції 1 %-ним водним розчином NaCl), і наступної екстракції етанолом було одержано 1,432 г екстрактивних речовин, що складає 2,86 % від маси кори. В той же час, при екстракції кори 96 %-ним етанолом без попередньої екстракції 1 %-ним водним розчином NaCl було одержано 2,06 г екстрактивних речовин, що складає 4,12 % від маси кори. Отже, частина речовин ($\approx 30,6$ %) переходить у водний розчин і втрачається при одержанні лектинів. Такими речовинами є, перш за все, вуглеводи. Так, визначення сумарної кількості гексоз антроновим методом [8] у етанольному екстракті кори без попередньої екстракції 1 %-ним водним розчином NaCl дало 32,3 % гексоз, тоді, як після екстракції лектинів у вичавках кори було цим методом знайдено 11,2 % кетоз. Таким чином, після екстракції лектинів 1 %-ним водним розчином NaCl етанольний екстракт збіднюється, в основному, на вуглеводи і збагачується на ліпофільні речовини.

В таблиці 3.11 представлені маси залишків, одержаних шляхом екстракції 50,0 г кори бруслини європейської органічними розчинниками.

Табл. 3.11

Вихід екстрактів, одержаних із кори бруслини європейської

Стадія розділення	Назва залишку	Маса, г	% (від маси кори)
I	Етанольний екстракт №1 вичавок кори	1,432	2,86
	Етанольний розчин (після упарювання етанолу) Залишок №1а	0,950	1,90
	Нерозчинний в етанолі залишок (після упарювання етанолу)	0,482	0,96
II	Метанолорозчинна частина (залишок №1б)	0,416	0,83
III	Речовини, розчинні в хлороформі (залишок №2)	1,418	2,84

За допомогою ГХ-МС був проаналізований хімічний склад одержаних екстрактів, а результати є представлені в таблицях 3.11-3.15.

У залишку №1 (таблиця 3.12) було виявлено 29 речовин. Однак, частина із них є у дуже незначних кількостях, тому наведені лише ті речовини, кількісний вміст яких складає більше 1%.

Табл. 3.12

Хімічний склад етанольного екстракту кори бруслини європейської (залишок №1а)

№	Назва речовини	Вміст, %
1.	Метиловий ефір ліноленової кислоти	8,21
2.	Стеаринова к-та	3,91
3.	Пальмітинова к-та	6,04
4.	Лінолева к-та	2,7
	Інші ефіри вищих жирних кислот	1,75
	Всього жирних кислот та їх ефірів	22,61
5.	Ді-п-октил фталат	7,52
6.	Вітамін Е	1,36
	Стероїдні та терпенові сполуки	
7.	Сквален	2,37
8.	γ-ситостерол	5,62
9.	Арістолон	4,32
10.	α-амірин	7,44
11.	Фріделін	10,09
	Всього стероїдних та терпенових сполук	29,84
12.	8-(1,1,2-триметил-2-пропеніл)-8Н-циклопента нафталін [b]	21,74
	Речовини, ступінь достовірної ідентифікації нижче 50 %	
	Етилакридин	2,79
	Гіберелін А3	0,82
	Інші неідентифіковані речовини	13,32
	Сума речовин, наведених в таблиці	100,00

Таким чином, після екстракції кори бруслини розчином NaCl (виділення лектинів) до етанольного екстракту переходять жирні кислоти та їх ефіри, які в сумі становлять 22,61 %, а також стероїдні та тритерпенові сполуки 28,84%. Етанольний екстракт, на нашу думку представляє практичний інтерес, так як вміщує багато цінних біологічно активних речовин.

Нерозчинна в 95 % етанолі, але розчинна в метанолі частина (залишок № 1б) за даними ГХ-МС містила 18 речовин, однак, 5 із них знаходились в незначних кількостях, і тому в таблиці 3.12 не представлені.

Табл. 3.13

Хімічний склад етанольного екстракту кори бруслини європейської (залишок №1б)

№ п/п	Назва речовини	Вміст %
1.	4Н-піран-4-он	3,81
2.	D-гліцеро-D-ідогептоза*	11,13
3.	2,3-дигідрокси-пропаналь	3,7
4.	ізосорбіт динітрат*	6,2
5.	Циклопропанон	8,02
6.	D-маноза*	12,31
7.	Дульцитол	18,27
8.	Сорбітол*	8,39
9.	Пальмітинова кислота	2,99
10.	Біцикло[4,3,1]дек-1(9)-ен	3,12
11.	Стеаринова кислота	1,87
12.	Гексаметил циклотрисилоксан*	3,59
13.	Нафто[2,1-b]фуран*	8,80
14.	Сквален*	1,85
	Сума вмісту речовин, наведених в таблиці	94,05

Примітка: * - речовини, ступінь достовірності ідентифікації яких за даними бази даних становила нижче 50 %

Як видно із даних, представлених у таблиці 3.12, залишок містить значну кількість цукрів (D-гліцери-D-ідогептоза, ізосорбіт динітрат, D-маноза, дульцитол, сорбітом), які в сумі становлять понад 56 %. Однак для цих речовин ступінь достовірності ідентифікації за даними ГХ-МС становив менше 50 % і тому для остаточних висновків про їх ідентичність необхідні додаткові дослідження. Зазначені сполуки, а також інші, що містяться в цьому залишку, в переважній більшості не застосовуються в медичній практиці, тому цей залишок навряд чи зможе представляти великого інтересу для подальших досліджень.

Дослідження залишку, екстрагованому хлороформом (№ 2), за допомогою ГХ-МС, виявили 63 речовини, вміст основних з них представлено в таблиці 3.14.

Табл. 3.14

Хімічний склад хлороформного екстракту кори бруслини європейської (залишок №2)

№	Назва речовини	Вміст (в %)
	Парафінові вуглеводні	
	Ейкозан	17,87
	Нонакозан	6,30
	Гексакозан	3,37
	Пентакозан	3,15
	Тетракозан	3,11
	Трикозан	1,35
	Інші насичені вуглеводні	0,79
	Всього парафінових вуглеводнів	36,95
	Похідні вуглеводнів	
	7,9-ді-ерт-бутил-1-оксаспіро[4,5]дека-6,9-діен-2,8-діон	1,64
	2-гептакозанон	1,22
	Інші сполуки вуглеводнів	0,79
	Всього похідних вуглеводнів	3,65
	Тритерпенові сполуки	

	3-кето-урс-12-ен	1,91
	Бета-амірин	3,25
	Альфа-амірин	3,88
	Фріделін	10,9
	Тараксерол*	2,00
	γ-ситостерол*	2,38
	Всього тритерпенових сполук	24,32
	Фталати	
	Дибутил фталат	5,83
	Біс(етилгексилфталат)	0,74
	Всього фталатів	6,57
	Жирні кислоти	
	Пальмітинова кислота	3,41
	Інші жирні кислоти та їх ефіри в сумі	2,23
	Всього жирних кислот та їх ефірів	5,64
	Діетиловий ефір саліцилової кислоти	1,3
	Речовини, ступінь достовірності яких нижче 50 %	
	N-ціано-N',N',N'',N''-тетраметил-1,3,5-тріазинтріамін*	2,93
	3-хінолінкарбоксилова кислота*	1,11
	Гіберелін А3 *	4,65
	Бензо[b]циклопропафлуренон	4,00
	8-(1,2-триметил-2-пропеніл)-8Н-циклогептанафталін	4,65
	N-етил-1.1,3-дитіоізоіндол	1,01
	Інших речовин з низьким ступенем достовірності	3,22
	Всього речовин з низьким ступенем достовірності	21,57
	Сума речовин, наведених в таблиці	100,00

Як видно з даних таблиці 3.13, у цьому екстракті багато парафінових вуглеводнів, сумарний вміст яких перевищує 36 %. Майже половину з них представляє ейкозан. Однак, згідно даних комп'ютерної програми, цей вуглеводень вийшов з хроматографічної колонки 9-ма піками, причому рівень достовірності ідентифікації в усіх випадках перевищував 90 %. Можливим

поясненням цього може бути надзвичайно велика можлива кількість ізомерів у цього вуглеводню. Кількома піками з хроматографічної колонки вийшли також тетракозан та пентакозан. Іншу речовину, яка вийшла багатьма (6-ма піками), комп'ютерна програма ідентифікувала як гіберелін А3. Однак у цьому випадку ступінь достовірності ідентифікації становив лише 30 – 49 %. Інтервали у часі утримання між цією речовиною та наступними і попередніми є достатньо великі, щоб передбачати погане розділення речовин. Можливою причиною може бути відсутність подібних речовин у комп'ютерній базі даних і тому про достовірну їх ідентифікацію робити висновок передчасно.

Найбільш цінними з нашої точки зору у хлороформному екстракті є стероїдні сполуки (фріделін, α та β -амірини, γ -ситостерол), які становлять приблизно його четверту частину. Відомо, що ці сполуки володіють різноманітною фізіологічною активністю: протисклеротична, кортикотропна, адаптогенна, седативна, проти виразкова.

Для фракціонування цього залишку хлороформ відганяли, його слідові кількості видаляли в сушильній шафі при 52° С, а залишок розчиняли в метанолі. Метанольний розчин позначили як залишок №2а. За допомогою ГХ-МС у ньому виявлено 8 речовин: метилових ефірів вищих жирних кислот, фталатів, стероїдних та тритерпенових речовин (таблиця 3.15).

Табл. 3.15

Хімічний склад розчинного в метанолі залишку хлороформного екстракту кори бруслини європейської (залишок №2а)

№ п/п	Назва речовини	Вміст (в %)
1	Метилпальмітат	19,06
2	Метиловий ефір 9,15-октадекадієнної кислоти	13,73
3	Метиловий ефір 9,12,15-октадекатрієнної кислоти	29,05
4	Метилстеарат	3,08
5	Диізооктилфталат	4,67
6	γ -ситостерол*	5,85
7	4Н-1-бензопіран-4-он	8,64
8	Фріделін	15,93
	Сума речовин, наведених в таблиці	100,01

Порівнюючи результати дослідження, наведені у таблицях 3.14 і 3.15, можна зробити висновок, що у залишку, нерозчинному в метанолі, повинні залишитись парафінові вуглеводні та їх похідні і частина тритерпенових сполук. Останні представляють інтерес для медицини, однак повністю відділити їх від малоцінних парафінових вуглеводнів таким способом не вдалося. Можливо прогнозувати, що більш ефективним розділенням цих речовин з хлороформного екстракту буде хроматографія на колонці силікагелю при застосуванні в якості елюантів сумішей хлороформу зі спиртами у різних співвідношеннях.

3.4.2.2 Дослідження ліпофільних фракцій листя та квіток рослини

Ліпофільні речовини листя та квіток бруслини європейської майже не досліджені. В той же час біосинтез більшості вторинних метаболітів відбувається саме в листі і квітках, звідти потрапляють в кору, корені та насіння рослин.

Крім цього достатньо цінною речовиною бруслини європейської є гутаперча, яка є високомолекулярним вуглеводнем і при біосинтезі якої утворюється велика кількість похідних ліпофільної природи, дослідження ліпофільних екстрактів листя та квітів рослини, як потенційного джерела біологічно активних речовин є важливим.

Квітки і листя рослини висушували в сушильній шафі при температурі 52°C, після чого повітряно-суху сировину, подрібнену до часточок 0,5 мм екстрагували петролейним ефіром ($t_{\text{кип}} = 40 - 70^{\circ}\text{C}$) у співвідношенні 1:5 при постійному перемішуванні суміші протягом 30 хв. Екстрагент відганяли, залишок досушували в сушильній шафі при 52°C, зважували, частину його розчиняли в хлороформі і розчин аналізували за допомогою газової-хроматографії-мас-спектрометрії (ГХ-МС).

З 29,4 г висушених квіток рослини було одержано 0,245 г екстрактивних речовин, що складає 0,83 % від взятої маси. Відповідно з 22,6 г висушеного листя було одержано 0,139 г екстрактивних речовин, що складає 0,62 % від маси листя. Це менше, ніж екстрагується хлороформом з кори рослини (2,84 %).

Ідентифікацію речовин у фракціях здійснювали за допомогою мас-спектрометра 6C/MSAgilent Technologies 6890 N/5975 B. Схему хроматограм

ліпофільних речовин листя та квітів бруслини європейської подано на рис. 3.24 і рис. 3.25.

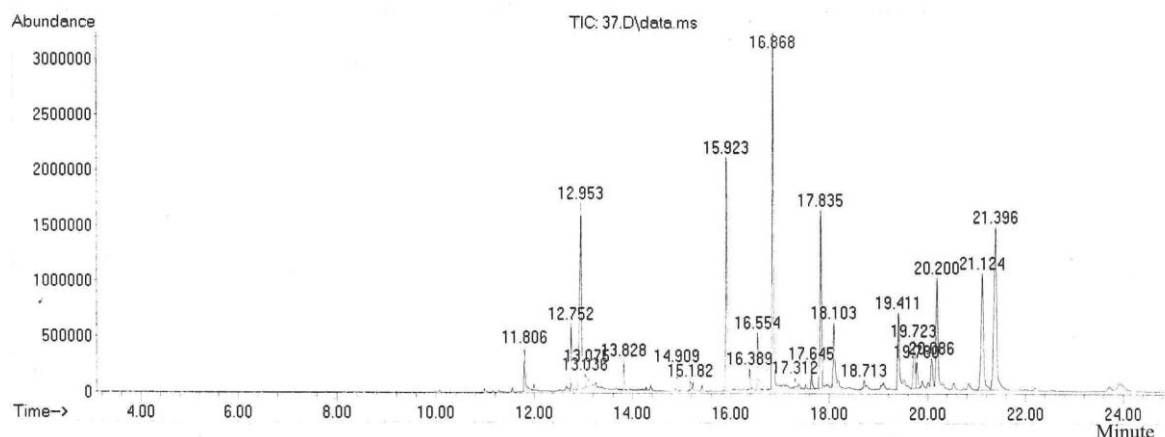


Рис. 3.24 Газова хроматограма ліпофільних речовин листків бруслини європейської

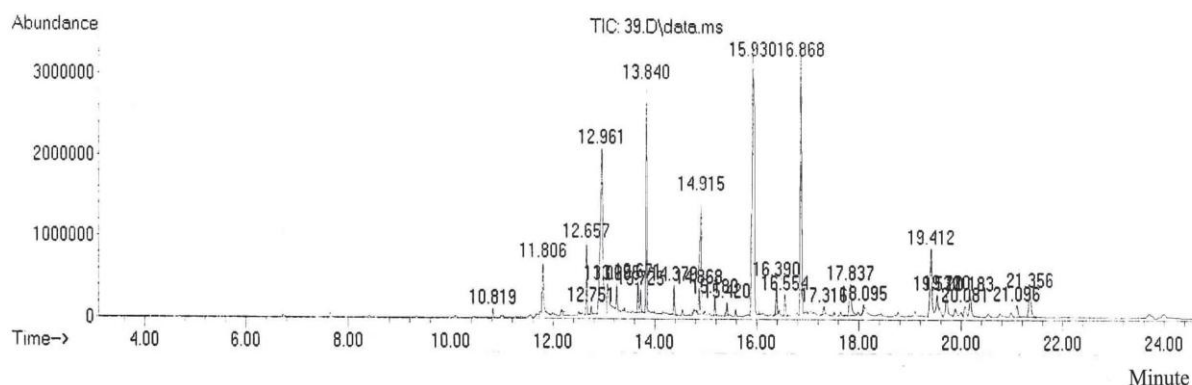


Рис. 3.25 Газова хроматограма ліпофільних речовин квіток бруслини європейської

Як видно із результатів дослідження, представлених на рисунках 3.24 і 3.25, хроматографічні профілі екстрактів обох видів сировини достатньо схожі. За допомогою мас-спектрометра більшість сполук була ідентифікована. Для ідентифікації компонентів використовували бібліотеку мас-спектрів NIST05 і WILEY 2007 з загальною кількістю спектрів більш ніж 470 000 в поєднанні з комп'ютерними програмами для ідентифікації AMDIS. Відносна похибка визначення вищенаведених компонентів не перевищує 10% при довірчій ймовірності 0,95. Результати вивчення хімічного складу наведені у таблиці 3.16. Для порівняння також наведені дані, які стосуються якісного складу та кількісного вмісту ліпофільних речовин кори бруслини. У результаті досліджень

хімічного складу одержаних екстрактів за допомогою ГХ-МС в квітках виявлено 28 сполук, а в листі – 19.

Табл. 3.16

Хімічний склад ліпофільного залишку кори, квіток та листя бруслини європейської

№ п/п	Назва речовини	Вміст ,%		
		Квітки	Листя	Кора
Парафінові вуглеводні				
1	Декан (C ₁₀ H ₂₂)	0,4	-	-
2	Ейкозан (C ₂₀ H ₄₂)	5,78	1.03	17,87
3	Генейкозан (C ₂₁ H ₄₄)	2,41	-	0,15
4	Докозан (C ₂₂ H ₄₆)	1,3	-	0,64
5	Трикозан (C ₂₃ H ₄₈)	9,15	0,8	1,35
6	Тетракозан (C ₂₄ H ₅₀)	1,08	-	3,11
7	Пентакозан (C ₂₅ H ₅₂)	-		3,15
8	Гексакозан (C ₂₆ H ₅₄)	-	-	3,37
9	Гептакозан (C ₂₇ H ₅₆)	15,14	8,71	-
11	Октакозан (C ₂₈ H ₅₈)	-	0,67	-
12	Нонакозан (C ₂₉ H ₆₀)	14,68	14,31	6,30
13	Гентриаконтан (C ₃₁ H ₆₄)	-	9,15	-
14	Гексатриаконтан (C ₃₆ H ₇₄)	0,6	-	-
	Всього по розділу:	50,54	34,67	35,94
Похідні вуглеводнів				
1	Гексадеканаль	0,33	-	-
2	9-трикозен	2,17	-	-
3	1-докозанол	0,94	-	-
4	1-ейкозанол	3,25	-	-
5	9,17-октадекадієналь	-	0,49	-

6	Інші сполуки вуглеводнів	-	-	3,65
	Всього по розділу:	6,69	0,49	3,65
<i>Жирні кислоти та їх ефіри</i>				
1	Олеїнова к-та	18,11	12,64	-
2	Пальмітинова к-та	3,32	2,1	3,41
3	Стеаринова кислота	-	-	0,87
	Метилловий естер 9-октадеканової к-ти	3,16	-	-
	Інші жирні кислоти та їх ефіри в сумі	-	-	2,23
	Всього по розділу:	24,59	14,74	6,51
<i>Стероїдні та терпенові сполуки</i>				
1	Сквален	1,1	2,06	-
2	Гама-ситостерол	5,51	4,38	2,38
	Альфа-амірин	-	-	3,88
3	Бета-амірин	2,17	2,83	3,25
4	Бета-амірин	1,99	-	-
5	Лупеол	0,89*	1,77	
6	Фріделін	2,53	14,88	10,90
7	Фріедоолеанан-3-ол	1,08	-	-
8	D:В-фріедо-В:А-неограмацер-5-ен3-он	1,76	-	-
9	Фітол	0,3	1,92	-
10	Тараксерол*	-	-	2,00
11	3-кето-урс-12-ен	-	-	1,91
	Всього по розділу:	17,33	27,84	24,32
<i>Інші сполуки</i>				

1	Дибутіл фталат	-	-	5,83
2	Біс(2-етилгексил)фталат	0,69	0,25	0,74
3	Альфа-токоферол	0,16	2,67	-
4	Гама-токоферол	-	0,99	-
5	Квініндолін	-	6,36	-
6	1,1,6,6-тетраметил- спіро[4,4]нонан	-	9,24*	-
7	9,17-октадекадієналь	-	1,3	-
8	Діетилсаліцилат	-	-	1,3
9	Ацифілен	-	1,45*	-
	Всього речовин з низьким ступенем достовірності	-	-	21,57
	Всього по розділу:	0,85	22,26	29,44
	Всього:	100	100	99,86

Примітки: * ступінь достовірної ідентифікації ліпофільних компонентів квітів та листя був нижчим за 80 %.

Аналізуючи одержані результати, подані в таблиці 3.15, можна відмітити, що кора, квітки і листя бруслини європейської містять високий вміст парафінових вуглеводів (від $C_{20}H_{42}$ до $C_{31}H_{64}$). Їх вміст як за асортиментом, так і за кількістю у квітів є найвищим. Вважається, що парафінові вуглеводні в чистому вигляді не мають якоїсь вираженої специфічної дії і їх використовують лише зовнішньо, наприклад, для лікування теплом при різного роду невралгіях (парафін, озокерит) та в якості мазевих основ, але вони можуть посилювати проникнення інших речовин через шкірні покриви або оболонки клітин. Крім того, як показали дослідження, вуглеводні можуть проявляти протимікробну та протигрибкову дію [152].

Жирні кислоти у цих органах рослини представлені олеїною та пальмітиною кислотами. В той же час вміст стероїдних і терпенових сполук є вищим в листках рослини. Можна відмітити високий вміст фріделіну в листках та корі рослини, а також високий вміст сквалену в листках, який складає понад 2% від маси петролейно-ефірного екстракту. Тритерпенові сапоніни (фріделін, β -амірин, лупеол) які становлять значну частину петролейно-ефірного екстракту листків володіють різноманітною фізіологічною активністю. Цікавим є доволі високий вміст в листках рослини квініндоліну – гетероциклічної азотовмісної сполуки, яка не була виявлена в квітах та корі рослини. Відомо, що квініндолін та його похідні володіють високою антимикробною протівірусною активністю [42].

Квітки бруслини європейської – дрібні жовто-зелені, невеликі і непоказні, майже без запаху і містять невелику кількість ліпофільних речовин, серед яких є значно менше цікавих в фармакологічному відношенні речовин, ніж в листках і корі рослини. Тому, на наш погляд, з точки зору вмісту ліпофільних речовин, практичне використання листя та кори бруслини європейської є більш перспективним, ніж квітів.

3.5 Виявлення кардіоглікозидів та вуглеводів бруслини європейської

У літературі описані випадки отруєння сировинними органами бруслини європейської свійських тварин (коней, кіз і овець), що, на думку авторів зумовлене наявністю у листках і стеблах серцевих глікозидів та алкалоїдів [22,43].

Відповідно до даних літератури кардіоглікозиди містяться у насінні. Даних щодо локалізації у інших органах рослини немає, проте ми перевірили досліджувані екстракти на предмет вмісту карденолідів. При проведенні аналізу одержували екстракти насіння та кори рослини. Як контроль для порівняння використовували стандартні зразки відомих серцевих глікозидів. Наявність серцевих глікозидів встановлювали за допомогою загальноприйнятих методик.

Негативні результати реакції Лібермана-Бурхарда та Легаля у водному екстракті насіння при екстракції лектину 1 % розчином NaCl, можливо пояснюються або дуже низьким їх вмістом у сировині і відповідно, потім у

екстракті, або проведенням екстракції при низькій температурі ($+10^{\circ}$ - $+25^{\circ}\text{C}$), що не сприяє переходу серцевих глікозидів у водний екстракт.

Проведені якісні реакції на стероїдне ядро, 5-членне лактонне кільце і дезоксицукри із концентрованим хлороформним екстрактом насіння були позитивними, що свідчить про наявність у ньому серцевих глікозидів. Водночас це є свідченням того, що у водний екстракт частина серцевих глікозидів не переходить.

В той же час, аналогічно виготовлена витяжка з кори рослини давала позитивну реакцію лише на наявність стероїдного ядра. Нами проведено хроматографічне розділення екстракту на колонці силікагелю, промиваючи сумішшю хлороформ:метанол у різних співвідношеннях, поступово збільшуючи частку останнього. В результаті одержали 3 фракції, які давали позитивну реакцію на наявність стероїдного ядра, що може відповідати ситостеролу, а також одержали три фракції зеленого кольору, які ймовірно відповідають хлорофілу.

Після одержання серцевих глікозидів з насіння рослини залишається нерозчинна у хлороформі субстанція, яка виявилась добре розчинною у воді. Її розчиняли у воді до 1 % концентрації і провели якісні реакції з гідроксидом барію, плюмбум ацетатом, хлоридом заліза, які були негативними. Це свідчить про відсутність у ній органічних кислот та фенольних сполук. Негативний результат дали також нінгідринова та ціанідинові проби, що свідчить про відсутність у ній амінокислот та флавоноїдів.

Реакції на виявлення вуглеводів з 5% розчином фенолу та сульфатною кислотою, антроном та реактивом Фелінга дали позитивний результат.

З наведених вище результатів було зроблено висновок, що у даній фракції містяться вуглеводи і, очевидно, у великій кількості. Для визначення кількісного вмісту вуглеводів користувалися загальноприйнятими методиками. (розділ 2).

Коли проведено визначення гексоз антроновим методом, а також визначення кетоз за допомогою реакції резорцин-соляна кислота. Виходячи з одержаних результатів у водорозчинному залишку містяться гексози у кількості $59,9 \pm 1,1$ %.

Кількість кетоз у водорозчинному залишку становила $20,7\% \pm 1,0\%$. Відповідно альдоз у одержаному залишку є близько $59,9 - 20,7 = 39,2\%$. Вільної глюкози у одержаному залишку не виявлено, що було підтверджено ферментативним (глюкозооксидазним) методом.

3.6 Дослідження елементного складу бруслини європейської

Оскільки бруслина європейська часто проростає на узліссі та при дорогах, то важливим завданням було також встановити як певні органи рослини накопичують токсикологічно важливі мікроелементи. Метою було визначення елементного складу листків та кори бруслини європейської вмісту плумбуму та кадмію, як показників екологічної чистоти сировини.

Мікроелементи у досліджуваних зразках рослинної сировини (листя та кора) кількісно визначали методом атомно-абсорбційної спектromетрії з електротермічною атомізацією (AAC/EA) після повної мікрохвильової мінералізації зразків у системі «Milestone Start D». Розчин зразків аналізували на атомно-абсорбційному спектрометрі AA 240 Z (Zeeman Atomic Absorption Spectrometer) VARIAN, обладнаного електротермічним атомізатором з графітовою кюветою (GTA 120 Graphitetube Atomizer) і автосамплером (PSD 120 Programable Sample Dispenser) (розділ 2).

Дані щодо кількісного вмісту деяких мікроелементів у досліджуваних надземних органах представлено у таблиці 3.17.

Табл. 3.17

Вміст основних мікроелементів у сировинних органах бруслини європейської

Сировина та час заготівлі	Мікроелементи						
	Mn, мг/кг	Cu, мг/кг	Se, мг/кг	Pb, мг/кг	Cd, мг/кг	Zn, мг/кг	Co, мг/кг
листя (квітень 2018)	60,0	10,3	0,19	0,26	0,16	64,5	0,09

листя (вересень 2018)	31,3	10,0	0,24	0,53	0,035	29,4	0,1
кора (березень 2019)	60,1	9,7	0,42	0,91	0,29	57	0,09

За вмістом плумбуму та кадмію аналізована рослинна сировина відповідає вимогам, що регламентуються директивами ВООЗ: не більше 10 мг/кг та 0,3 мг/кг відповідно.

Висновки до розділу 3

1. В результаті проведених досліджень у корі бруслини європейської встановлено наявність та проведено виділення лектину, який за вуглеводною специфічністю не відрізняється від попередньо отриманого лектину насіння рослини. У лектину кори досліджена електрофоретична чистота та проведено порівняльне дослідження імунохімічних властивостей лектинів кори та насіння бруслини європейської. Гістохімічне дослідження зв'язування лектинів кори та насіння з глікокон'югатами тканин ссавців показало, що обидва лектини зв'язуються з одними і тими ж гістологічними структурами, що підтвердило їх ідентичність.

2. З використанням біохімічних методів досліджена динаміка змін гемаглютинуючої активності лектинів в сировинних органах бруслини європейської протягом річного вегетаційного циклу розвитку рослини, визначено оптимальні календарні терміни заготівлі сировини для отримання цих субстанцій.

3. Методом рідинної екстракції, хроматографією на колонках силікагелю, газової хроматографії проведено отримання жирної олії насіння бруслини європейської, досліджено вміст жирних кислот, каротиноїдів та токоферолів у олії рослини, одержаної шляхом екстракції гексаном. Встановлено, що з 9-ти виявлених жирних кислот, 4 є ненасичені (олеїнова, пальмітоолеїнова, лінолева та

ліноленова), в сумі вони складають 87,79 % усіх жирних кислот олії бруслини європейської. Встановлено, що жирна олія насіння рослини містить 26 ± 5 % каротиноїдів та 40 ± 5 % токоферолів.

4. З використанням методу ВЕРХ з УФ-детекцією вперше виявлено сквален у жирній олії бруслини європейської, вміст якого у досліджуваному зразку становив 1,84 мг/мл.

5. Розроблено схему комплексного одержання біологічно активних речовин кори бруслини європейської, що передбачає отримання ліпофільних фракцій шляхом екстракції метанолом та хлороформом після виділення лектину, що актуально для раціонального використання цієї сировини.

6. За допомогою ГХ - МС здійснено аналіз ліпофільних речовин, екстрагованих петролейним ефіром з кори, листків та квіток бруслини європейської. Визначено хімічний склад одержаних фракцій, де переважали вуглеводні, жирні олії, стероїди та тритерпенові сполуки. Встановлено, що кора і листя є перспективнішими сировинними джерелами, ніж квітки. Вперше проведено визначення основних мікроелементів у листках і корі бруслини європейської, вміст токсичних елементів і важких металів не перевищував нормативів ВООЗ і ДФУ 2.0

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. The lectin of the bark of European spindle (*Euonymus europaeus* L.): purification, physico-chemical characteristics and application in histochemical studies/Vrubel O. R., Sogomonian E. A., Antonyuk V. O. *Biopolymers and Cell*. -2020.- Vol. 36. N 1. P 3–13.
2. Vrubel O., Korobova O., Humenyuk S., Antonyuk V. Identification and quantification of squalene in Europaeen spindle seed oil (*Euonymus europaeus* L.) by optimized high performance liquid chromatography (HPLC) procedure .*Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, - 2019,- Vol.8, N.5, P. 1722-1726.

3. Комплексне використання кори бруслини європейської (*Euonymus europaea* L.). Дослідження ліпофільних речовин / О. Р. Врубель, А. Р. Зинь, В. О. Антонюк .*Фармацевтичний журнал*. - 2016. - № 6. - С. 79-87.
4. Дослідження ліпофільних речовин листків та квітів бруслини європейської (*Euonymus europaea* L.)/ О. Р. Врубель, А. Р. Зинь, В. О. Антонюк *Фармацевтичний журнал*. - 2019. - № 2. - С. 73-79.
5. Пат. на корисну модель України № 59331 МПК (2011.01) А61К 36/00 С07К 1/00 Спосіб одержання лектину бруслини європейської (*Euonymus europaea* L.)/ Кушак О. Р., Согомоян Є.А., Антонюк В.О., Заяв. № u 201012857 від 29 жовтня 2010 року , опубл. Бюлл. №9, 2011 р., від 10.05.2011 р.
6. Визначення вмісту каротиноїдів та токоферолів в олії насіння бруслини європейської (*Euonymus europaea* L.)/ Врубель О.Р, Антонюк В.О. *Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження: тези I Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції* 5.04.2018, м. Харків 2018, С. 30
7. Спосіб одержання хітизв'язуючих білків кори бруслини європейської (*Euonymus europaeus* L.)/ Р. Дармограй, В. Антонюк, О. Врубель. *Проблеми та перспективи розвитку сучасної науки в країнах Європи та Азії: матеріали XXVI Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції* 30.04.2020 Переяслав- Хмельницький, 2020, С.23-28
8. Obtaining and researching the effectiveness of spindle tree (*Euonymus europaea* L.) oil on non-allergic contact dermatitis /Olha Vrubel, Volodymyr Antonyuk. *7th International Weigl conference: theses* 26-29.09.2017, Lviv 2017, Ukraine P. 104
9. Одержання лектинів з кори бруслини європейської/ Врубель О. Р., Антонюк В.О. Тези VIII Національного з'їзду фармацевтів України 13.09-16.09 2016, Київ 2016, С.54.
10. Дослідження жирної олії насіння бруслини європейської/ Кушак О., Цивінська М., Антонюк В. *Фармакологія та лікарська токсикологія:*

матеріали IV Національного з'їзду фармакологів України.-12.10.2011, Київ-2011.-С.184.

РОЗДІЛ 4. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ЖИРНОЇ ОЛІЇ НАСІННЯ БРУСЛИНИ ЄВРОПЕЙСЬКОЇ

4.1 Результати вивчення гострої токсичності жирної олії бруслини європейської

Дослідження гострої токсичності та фармакологічної активності були проведені з допомогою старшого лаборанта кафедри фармакології Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького Нектегаєва І. О.. Дослідження проведене на білих безпородних щурах масою 180-200 г., вирощених у віварії ЛНМУ ім. Данила Галицького, які були стандартизовані за фізіологічними та біохімічними показниками і знаходились в умовах віварію, згідно з вимогами санітарно-гігієнічних норм на стандартному раціоні. Експериментальні дослідження проводились згідно вимог комісії з біоетики та «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах», що узгоджується з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» [176-178].

Важливим етапом фармакологічних досліджень потенційних лікарських засобів на основі біологічно активних субстанцій рослинного походження є встановлення безпечності їх застосування, тобто встановлення класу токсичності. При визначенні гострої токсичності керувались методикою доклінічного вивчення нешкідливості лікарських засобів. Лімітуючим показником при визначенні гострої токсичності є максимальна доза IV класу токсичності (малотоксичні речовини) з урахуванням шляху введення (при внутрішньошлунковому введенні ця доза складає 5000 мг/кг) [166].

Досліджувані субстанції вводили внутрішньошлунково. Тваринам першої групи вводили олію насіння бруслини європейської, тварини другої групи – інтактні. Ступінь токсичності субстанцій оцінювали за зміною загального стану тварин, впливом екстрактів на динаміку маси тіла тварин та споживанням їжі і води. Усіх досліджуваних тварин утримували у стандартних санітарних умовах

при температурі 20 – 24 °С, вологості 50 – 55 %, природному світловому режимі «день-ніч», які знаходились на звичайному раціоні харчування.

За результатами проведених досліджень встановлено, що загальний стан тварин та інші показники були задовільними. Жирна олія при введенні в шлунок не викликала загибелі тварин. Симптомів інтоксикації не виявлено і загальний стан тварини, особливості поведінки, характер і координація рухів, реакція на зовнішні подразники, стан шерсті та слизових оболонок не змінювався протягом 14 діб. Отже, олію бруслини європейської можна віднести до 4 класу токсичності згідно ГОСТу 12.1.005-88, та інших законодавчих документів [166, 174].

4.2 Дослідження ефективності жирної олії насіння бруслини європейської на моделі неалергічного контактного дерматиту

Визначення основних напрямків фармакологічних досліджень проводили ґрунтуючись на даних літератури, відповідно до яких жирна олія бруслини європейської використовується як засіб народної медицини при дерматитах та екземі [10,35].

Експериментальні тварини були розподілені на 3 групи по 21 тварині у кожній:

- I - інтактний контроль, тварини без лікування (ІК);
- II- тварини, яким наносили препарат порівняння (обліпихова олія);
- III- тварини, яким наносили жирну олію бруслини європейської.

Для відтворення патології тваринам на вистрижену ділянку шкіри розміром 3х3 см² протягом 10 днів наносили по 5 крапель живичного скипидару та втирали скляною паличкою. На 10-й день відтворення патології у тварин інтенсивність розвиненого неалергічного контактного дерматиту оцінювали візуально за виразністю запальної реакції шкіри за бальною системою (0 балів — відсутність видимої реакції; 1 бал — слабка еритема; 2 бали — помірно виражена еритема, злущення, крапкові крововиливи; 3 бали — чітка еритема з ущільненням та злущеннями; 4 бали — різка еритема з явищами геморагії, вираженою інфільтрацією та серозно-геморагічними кірками з виразками) [168].

Після цього протягом 10 днів наносили тваринам на ушкоджені ділянки шкіри наносили стерильним шпателем досліджувані олії та оцінювали інтенсивність зовнішніх проявів запального процесу на 14-ий, 17-ий та 20-ий дні експерименту.

Інтенсивність запального процесу в організмі тварин також оцінювали за гематологічними показниками: швидкість осідання еритроцитів (ШОЕ) та кількість лейкоцитів у крові, які, визначали на 10-й (останній) день нанесення скипидару та на 5-й день місцевого лікування дерматиту (15-й день експерименту).

Оскільки в умовах запального процесу в організмі тварин відбуваються метаболічні зміни, на 15-й день експерименту в сироватці крові проводили дослідження біохімічних показників, які характеризують вираженість запального процесу (кількість загального білка, рівень сечовини, цитолітичного ферменту АсАТ та глюकोпротеїдів) [166].

Препаратом порівняння була обрана обліпіхова олія, оскільки вона виявляє виражену ранозагоювальну дію. Олія обліпіхи застосовується переважно в нативному виді, володіє протизапальними, епітелізувальними, бактерицидними, знеболювальними властивостями [143]. Результати вивчення ефективності олії бруслини європейської на моделі неалергічного контактного дерматиту наведені у таблиці 4.1.

Табл. 4.1

Результати вивчення ефективності дії олії бруслини європейської

Терміни дослідження (доба)	Показники запальної реакції шкіри (в балах за інтенсивністю ураження)		
	Контрольна патологія	Досліджуваний препарат (олія плодів бруслини європейської)	Препарат порівняння (олія обліпіхи)
10-ий день експерименту	2,5±0,5	2,5±0,5	2,5±0,5
14-ий день експерименту	2,0±0,5	1,0±0,5	0

17-ий день експерименту	1,0±0,5	0	0
20-ий день експерименту	0	0	0

Згідно із одержаними результатами, на 10 день нанесення скипидару у всіх тварин розвинулися чіткі ознаки запалення. Після припинення нанесення скипидару у тварин контрольної групи видимі ознаки запалення почали зменшуватися, але і на 7-ий день після відміни, ще були помітні. У тварин, яким наносили обліпихову олію ознаки запалення такі, як набряк, почервоніння, крововиливи на 4-ий день лікування повністю зникли, в той час, як при лікуванні олією бруслини ці симптоми зникли пізніше, на 6-7 день лікування (16-17 дні експерименту). У тварин контрольної групи без лікування повністю симптоми дерматиту зникли на 10-ий день після відміни втирання скипидару (20-ий день експерименту). Це дає можливість зробити висновок, що жирна олія насіння бруслини має схожу дію із олією обліпихи, але діє дещо слабше, хоча також може бути використана як засіб для лікування захворювань шкіри.

На 10 день нанесення скипидару в усіх тварин запалення шкірних покривів супроводжувалося вірогідним, щодо контрольної групи, лейкоцитозом та підвищенням рівня ШОЕ. Основні гематологічні показники тварин наведені у таблиці 4.2.

Табл. 4.2

Вплив олії бруслини та обліпихи на гематологічні показники у щурів на моделі неалергічного контактного дерматиту

Терміни дослідження (доба)	Групи тварин			
	Інтактний контроль	Контрольна патологія	Олія плодів бруслини європейської	Олія обліпихи
Лейкоцити, 10^9 л				
10-ий день	11,42±1,21	18,36±1,16	18,36±1,16	18,36±1,16

15-ий день	12,14±0,94	15,36±1,06	14,76±1,09	11,75±0,98
ШОЕ, мм/с				
10-ий день	1,45±0,20	3,70±0,31	3,70±0,31	3,70±0,31
15-ий день	1,54±0,25	2,93±0,27	2,21±0,33	1,55±0,30

Таким чином, за гематологічними показниками на 5-ий день лікування обліпиховою олією гематологічні показники знаходились у нормі, тоді як при використанні олії бруслини вони ще залишались дещо завищеними, хоча були ближчими до норми, ніж у групи тварин без лікування.

Основні біохімічні показники досліджуваних тварин при проведенні експерименту наведені у таблиці 4.3.

Табл. 4.3

Вплив олії бруслини та обліпихи на деякі біохімічні показники у щурів на моделі неалергічного контактного дерматиту

Терміни дослідження (доба)	Групи тварин			
	Інтактний контроль	Контрольна патологія	Олія плодів бруслини європейської	Олія обліпихи
Загальний білок г/л				
10-ий день	75,3 ± 5,6	47,6±4,9	47,6±4,9	47,6±4,9
15-ий день	72,3 ± 5,2	58,6±5,3	61,7±4,5	70,9±5,4
Сечовина, мм/л				
10-ий день	8,72±0,63	12,65±0,87	12,65±0,87	12,65±0,87
15-ий день	8,51±0,56	10,32±0,61	9,12±0,57	8,83±0,65
Бета-Ліпопротеїди (ЛПНЦ), ммоль/л				
10-ий день	0,98±0,11	1,53±0,18	1,53±0,18	1,53±0,18
15-ий день	1,08±0,13	1,28±0,16	1,12±0,13	1,07±0,16
АСТ, Од/л				

10-ий день	0,21±0,05	0,37±0,05	0,37±0,05	0,37±0,05
15-ий день	0,22±0,05	0,30±0,06	0,28±0,04	0,23±0,06

Дослідження біохімічних показників на 15-ий день експерименту (5-ий день лікування) в порівнянні з початком відміни нанесення подразнюючого фактору (10-ий день експерименту) вказує на збільшення кількості загального білка. Це збільшення поступово досягнуло норми при застосуванні обліпихової олії і було трохи нижчим при використанні олії бруслини європейської. Рівень сечовини та бета-ліпопротеїдів, який збільшується при запальних процесах, при нанесенні олії обліпихи та бруслини достовірно зменшувався і на 5-ий день лікування досягнув норми для олії обліпихи і був близьким до цього для олії бруслини.

Оцінюючи вплив олій бруслини і олії обліпихи можна сказати, що після 5-ти днів лікування нами спостерігався виражений терапевтичний ефект, що супроводжувався зменшенням запального процесу в порівнянні з контрольними тваринами, які не були ліковані і загоєння відбувалось природнім шляхом. Однак, олія обліпихи мала більш виражений вплив, що можливо, пояснюється більш високим вмістом у ній каротиноїдів та токоферолів. В той же час нами підтверджені дані нетрадиційної медицини щодо ефективності олії бруслини європейської при лікуванні дерматитів. Одержана шляхом екстракції петролейним ефіром вона не містить токсичних речовин і може бути рекомендована для лікування шкірних захворювань у складі мазей.

4.3 Дослідження антимікробної дії олії та настоек листя, кори та квітів бруслини європейської

За даними літератури, антибактеріальна дія характерна для водних витяжок насіння ,соку з плодів бруслини європейської. Настойка листя рослини на 70% етанолі рекомендується як антибактеріальний засіб та протизапальний засіб .

При проведенні дослідження фармакологічних властивостей субстанцій бруслини європейської ми використовували настойки листя, квітів, насіння та кори, отриманих у співвідношенні 1:10 на 40% етанолі методом мацерації.

Визначення антибактеріальної активності проводили на кафедрі мікробіології Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького під керівництвом к.м.н. Немченка О.О.

Для проведення аналізу на чашки Петрі суцільним газоном засівали завись добової культури таких мікроорганізмів: *Escherichia coli* ATCC 25922 , *Candida albicans* ATCC 10231, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Penicillium natatum* ATCC 28089, *Aspergillus niger* ATCC 16404 (рис. 4.1). Як середовище використовували м'ясо-пептонний агар (МПА). Чутливість грибів визначали на середовищі Сабуро (розділ 2).

Завись цих мікроорганізмів готували за стандартом мутності 5 ОД. Кожну чашку поділяли на вісім секторів і в центр кожного сектора вносили в лунку 50 мкг розчинів субстанцій. Для порівняння інгібуючої дії використано диски із гентаміцином та ністатином. Усі посіви витримували в термостаті за температури 37 °С протягом 24 год. Дані щодо результатів дослідження наведено у таблиці 4.4.

Табл. 4.4

Результати дослідження антимікробної дії настоек та олії бруслини європейської

Штами мікроорганізмів	Діаметри зон затримки росту в мм, кількість дослідів n=3				
	Листя	Квітки	Насіння	Кора	Жирна олія насіння
<i>Penicillium natatum</i>	19,5±0,08	18± 0,06	17±0,08	19,5± 0,09	18± 0,3
<i>Aspergillus niger</i>	17,5±0,08	16±0,1	16±0,1	16±0,08	16±0,09
Контроль 1 Ністатин	8	8	8	8	8
Контроль 2 Спирт 40%	6	6	6	6	6

У результаті дослідження нами не встановлено помітної антибактеріальної дії проти досліджуваних штамів бактерій, проте спостерігалась виражена дія проти

пліснявих грибів *Penicillium natatum*, *Penicillium glaucum*, *Aspergillus niger* усіх досліджуваних екстрактів приблизно однаковою мірою.

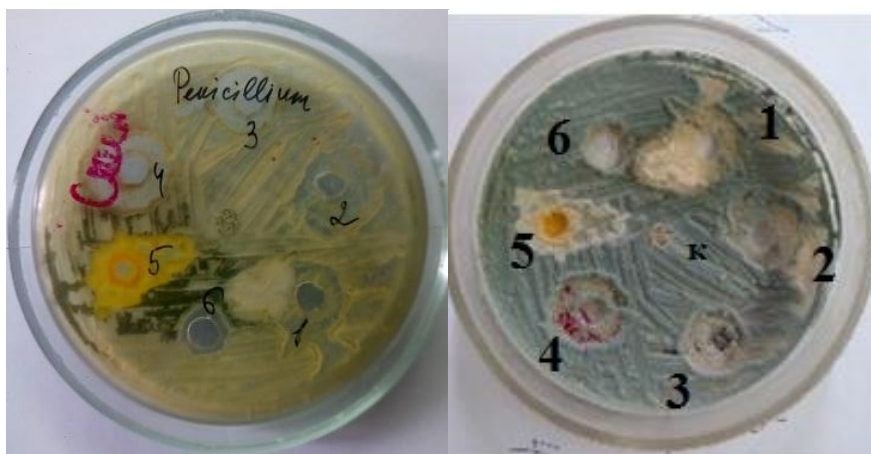


Рис 4.1. Чашки Петрі із нанесеними екстрактами листя-1, квітів -2, насіння -3, кора -4, олія- 5, етанол – 6, ністатин – к.

Висновки до розділу 4

1. При визначенні гострої токсичності встановлено, що при введенні олії бруслини європейської не спостерігається симптомів інтоксикації у щурів, досліджувана субстанція не викликала загибелі тварин, тому її можна віднести до 4 класу токсичності.
2. На моделі неалергічного контактного дерматиту виявлена протизапальна активність олії бруслини європейської в порівнянні з олією обліпихи. Зміни гематологічних та біохімічних показників у досліджуваних тварин (щурів) достовірно були кращими при застосуванні олії бруслини в порівнянні з такими у нелікованих тварин.
3. У результаті мікробіологічних досліджень встановлено наявність помірної антибактеріальної дії проти досліджуваних штамів бактерій, крім цього спостерігалась виражена дія проти пліснявих грибів *Penicillium natatum*, *Aspergillus niger*.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Investigation of the chemical composition and efficiency of seed oil of spindle tree (*Euonymus europaea* L.) on the model of non-allergic dermatitis/ Vrubel O., Nektegaev I., Antonyuk V. *EUREKA: Health Sciences*. – 2018. – N 3. – p. 45 – 54.
2. Дослідження складу олії насіння бруслини європейської (*Euonymus europaeus* L.)./ Врубель О.Р., Антонюк В.О., Дармограй Р.Є. *Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини та фармації: матеріали II Науково-практичної конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю, 15.05. 2020, м.Харків 2020*, С. 46
3. Obtaining and researching the effectiveness of spindle tree (*Euonymus europaea* L.) oil on non-allergic contact dermatitis./ Vrubel O., Antonyuk V. 7th International Weigl conference: theses 26-29 September 2017, Lviv, Ukraine. P. 104.

РОЗДІЛ 5. СТАНДАРТИЗАЦІЯ СИРОВИНИ БРУСЛИНИ ЄВРОПЕЙСЬКОЇ

5.1 Дослідження морфолого-анатомічної будови сировинних органів бруслини європейської

5.1.1 Макрокопічне дослідження бруслини європейської

Серед представників роду бруслина флори України дикорослими є бруслина європейська та бруслина бородавчаста, з якої бруслина європейська є більш розповсюдженою [2,20].

Основними морфологічними ознаками, які дають можливість диференціювати бруслину європейську від інших видів роду Бруслина, є чотиригранне стебло, клиновидна основа листкової пластинки, зеленуваті дрібні квіти із жовтими пиляками та повністю покрита при насіннику насінина. Молоді пагони, які використовували при заготівлі кори є насичено зеленого кольору із добре візуалізованими ребрами сіро-бурого кольору. Листя темно-зелене, шкірясте зверху і світліше знизу, проте не опушене. Слід зауважити, що дана рослина є досить мінливою і окремі екземпляри, які проростають не у близькій відділі одне від одного можуть суттєво відрізнятися за розміром та кольором листків, щільністю розміщення плодів, товщиною стебла. Важливу роль відіграє їх місце проростання. Сировинні органи бруслини європейської, особливо це стосується плодів, слід заготовляти на сонячних ділянках. У таблиці 5.1 представлено дані порівняльного морфологічного аналізу видів роду Бруслина, поширених на території України.

Табл.5.1

Морфологічні ознаки основних дикорослих видів роду Бруслина флори України

Орган	Бруслина європейська (<i>Euonymus europaea</i> L.)	Бруслина бородавчаста (<i>Euonymus verrucosa</i> Scop.)
Листя	Черешкове, розміщене супротивно, за формою листкова пластинка видовжена еліптична або оберненояйцеподібна, основа клиновидна, дрібнозубчастий	Супротивне, листкова пластинка найширша нижче середини, шкіряста, яйцеподібна або овальна, рідше ланцетна, зверху темно-зелена, знизу світліша, гола або трохи опушена по

	край, біля верхівки загострені. Розміром 3-11,5 см завдовжки та 1-6,5 см завширшки. Черешки жолобчасті, довжиною 2-15 мм. Шкірясте, темно-зелене, голе, лише по жилках на нижній стороні короткоопушене. Восени листя набуває жовто-зеленого або малинового кольорів.	жилках, загострена, дрібнопильчаста, короткочерешкова (1,5-6 см завдовжки, 0,7-4,5 см завширшки),
Квітки	Суцвіття —зонтик, складається з 2-7 квіток із недорозвиненою середньою квіткою. Приквітки шиловидні, приквіточки лусковидні, нерідко залишаються біля основи квітконіжки. Пелюсток чотири, вони є довгастими, тупими, із загнутим війчастим краєм. Чотири тичинки, розташовані між пелюстками і спрямовані вгору. Пиляки жовті; маточка, зелена, зав'язь-гола, тупоконічна.	Квітки сидять у пазухах листків на досить довгих квітконосах, зібрані по 3 (5-7) у напівзонтики. Квітки чотиричленні, правильні (6-11 мм у діаметрі), чашечка зеленуватожовта з округлими лопатями, пелюстки зеленуваті з фіолетовими плямами. Тичинки прикріплені до краю м'ясистого диска, з якого виходить плоска 3-5-гнізда зав'язь.
Пагони	Стовбур і старі гілки сірувато-бурі, з корковими наростами, молоді гілки-зелені, в перерізі округлі. Деревина нещільна, жовта, на відкритому повітрі біліє.	Гілки круглі, густо вкриті рудуватими або чорнобурими бородавками.
Плід	Плід —коробочка, поникла, чотиригнізда, розкривна, помітно чотирилопатева, на верхівці вдавнена, завдовжки 0,7-1,3 см, завширшки 1,5 см. Її поверхня гола і гладка, лопаті кілюваті. На початку дозрівання-зелена, у період повної стиглості - рожево-малинова по одній насініні завдовжки 0,5-1 см. Насінина	Плід — сплюснуто-куляста, рожева коробочка (5-8 мм завдовжки), коротко чотирилопатева з тупими лопатями. Насінини, круглі, чорні, блискучі, частково оточені оранжево-червоним, соковитим арилусом (принасіником).

	білого кольору, повністю вкрита помаранчевим арилусом (принасіником) . При розкритті коробочки насінини частково виступають над її поверхнею.	
--	---	--

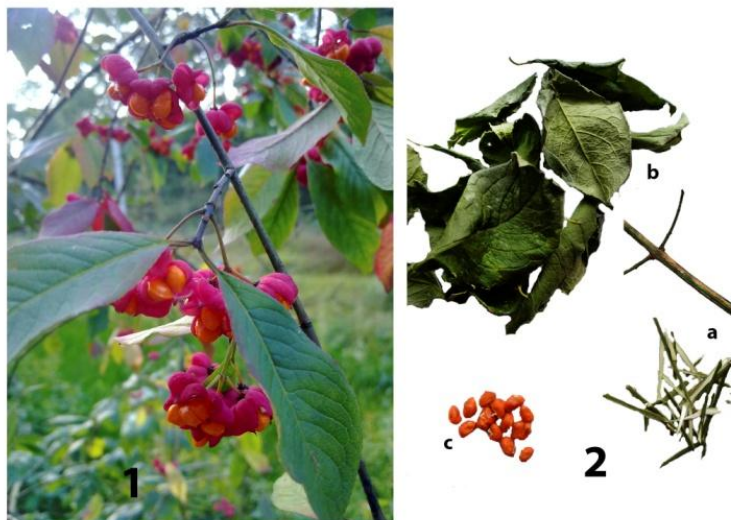


Рис. 5.2 Бруслина європейська в період плодоношення (1); сировинні органи (2): стебло, кора (а), листя (b), насіння (с)

5.1.2 Мікроскопічний аналіз сировинних органів бруслини європейської

Мікроскопічний аналіз листя

Листок бруслини європейської темного зеленого кольору зверху та світліший знизу. Особливості анатомічної будови відображено на рисунках 5.3-5.10. Клітини верхнього та нижнього епідермісів листя ізодіаметричні із прямими потовщеними стінками (рисунок 5.5).

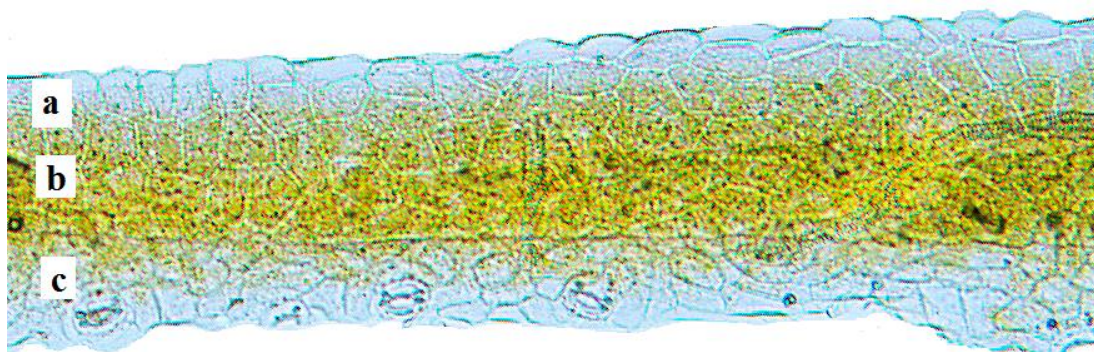


Рис. 5.3 Поперечний переріз листка (а-верхній епідерміс, b-паренхіма, с-нижній епідерміс

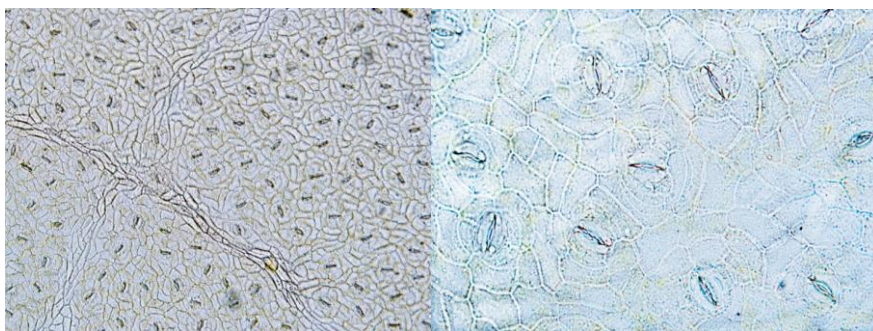


Рис. 5.4 Нижній епідерміс (подовжені клітини вздовж жилок), продихи зі сторони нижнього епідермісу

Продиховий комплекс аномоцитного типу . Продихи розміщені на нижньому епідермісі. Клітини нижнього епідермісу , що знаходяться над судинами видовжені та вузькі, без продихів. Будову нижнього епідермісу листка бруслини європейської відображено на рисунку 5.4.



Рис. 5.5 Клітини верхнього епідермісу та судини

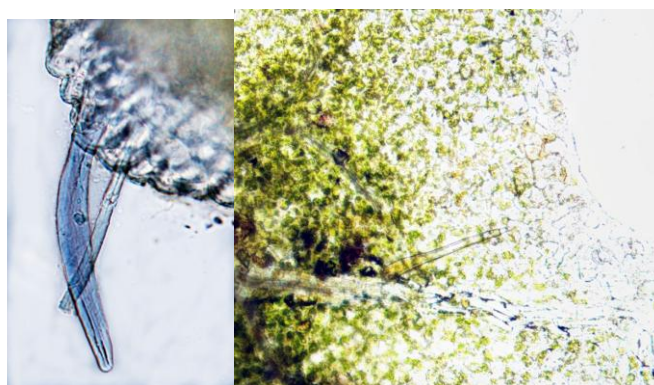


Рис. 5.6 Прості волоски

Волоски зустрічаються рідко, вони прості, локалізовані вздовж жилок. Край листкової пластинки зубчастий, кожен зубець закінчується багатоклітинним темним утвором.

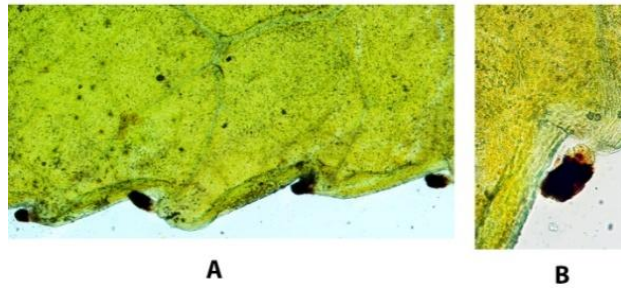


Рис. 5.7 Край листової пластинки

Друзи оксалату кальцію розміщені в більшій кількості вздовж жилок та по краю листової пластинки. Жилка виступає понад нижню епідерму, однопучкова, склеренхіма, розміщена півмісяцем.

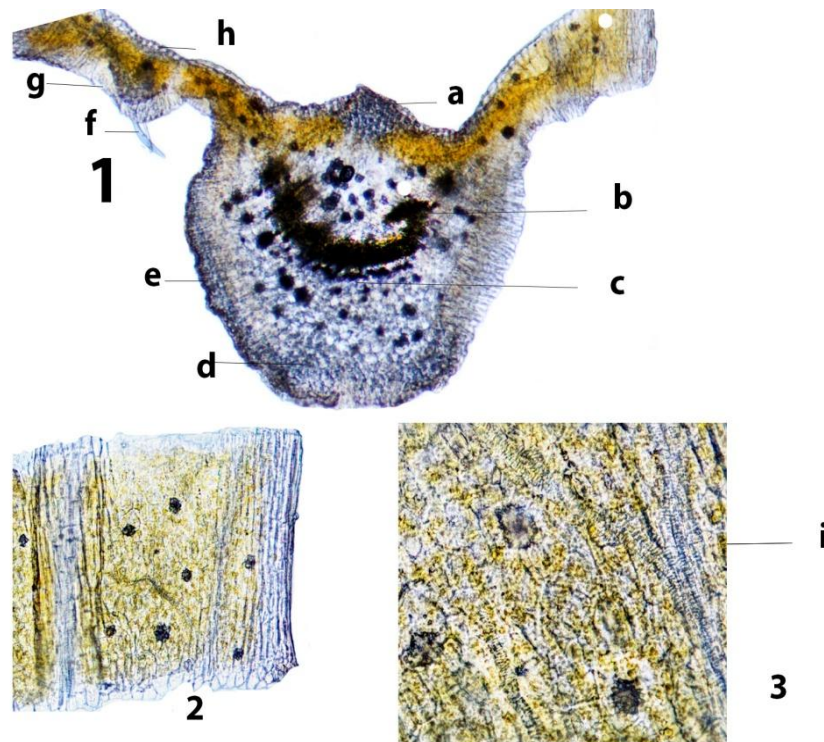


Рис. 5.8 Поперечний переріз жилки листка (1): корок, який формує горбок над жилкою (а), ксилема (b), флоема (с), верхній епідерміс (h), нижній епідерміс (g), волосок (f). Друзи оксалату кальцію (2,3).

Мікроскопічний аналіз кори

Кора яскраво зеленого кольору з буруватими опробковілими ребрами, що згодом сіріють, волокниста, специфічного запаху. Кора складається із двох-трьох шарів, під ним шар коленхіми зеленого кольору. Нижче паренхіма, в якій

розміщені групи друз оксалату кальцію та механічних волокон. У районі ребер корок потовщений, а первинна кора відсутня.

Під багатошаровою перидермою первинна кора характеризується надзвичайно великими розширеннями (дилатаціями). Ця особливість має діагностичну цінність, оскільки за даними [8] дилатації в корі бруслини бородавчастої мають інший характер. Ребра по кутах стебла покриті пробкою. Первинна кора в цій області без розширень.

Ситові трубки флоєми кутоподібні, вони супроводжуються округлими або овальними клітинами паренхіми. Волокна та склереїди відсутні, це ще одна діагностична особливість порівняно з корою бруслини бородавчастої, де вони присутні [8].

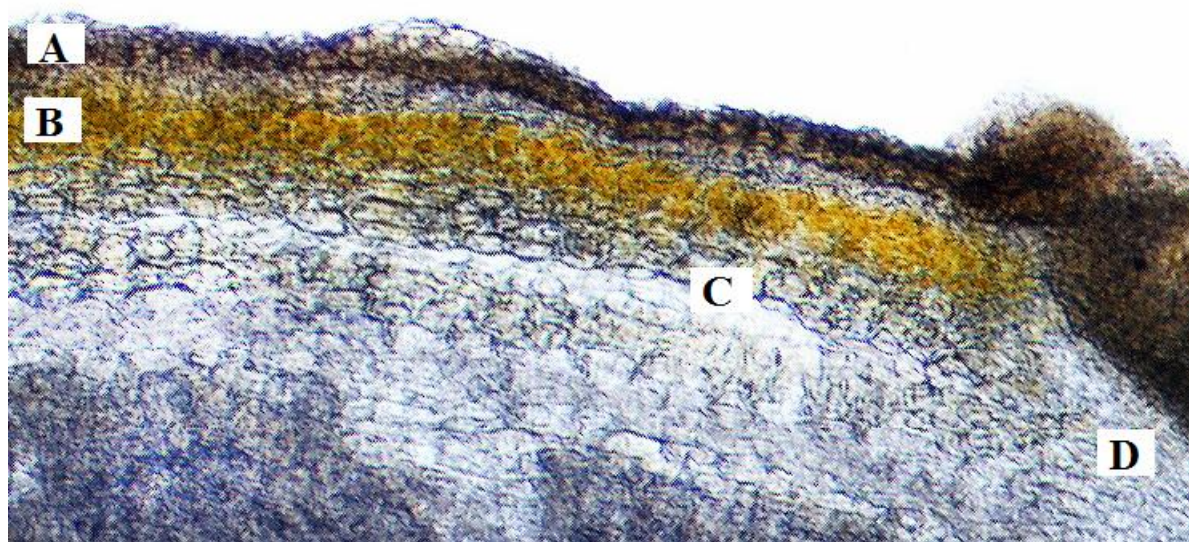


Рис. 5.9 Поперечний переріз кори бруслини європейської: корок (А), коленхіма (В), дилатації, друзи оксалату кальцію у дилатаціях (С), первинна кора у ділянці під ребрами (D).

Мікроскопічний аналіз насіння

Насіння покриті яскраво-помаранчевим принасінником (арилусом). Арилус двошаровий, шари розділені кутикулою з помаранчевими жировими включеннями різного розміру. Клітини ендосперму овальні, білого кольору.

Клітини ендосперму та сім'ядолі також містять різного розміру жирові включення.

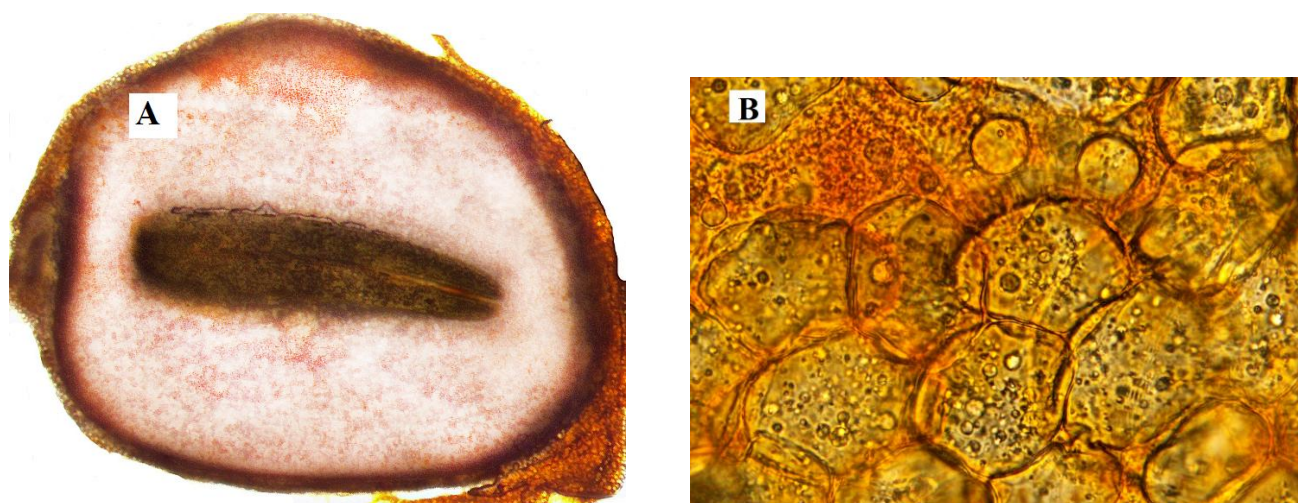


Рис. 5.10 Поперечний переріз насіння (А), клітин принасінника (арилусу) (В),

5.2 Розробка методик контролю якості насіння та жирної олії бруслини європейської

5.2.1 Розробка методів контролю якості насіння бруслини європейської

В процесі впровадження в медичну практику лікарських засобів рослинного походження, а також нових видів ЛРС, усі вони підлягають проведенню стандартизації, метою якої є гарантія їх максимальної безпеки та високої якості на усіх етапах використання. Стандартизація ЛРС передбачає обґрунтоване опрацювання основних критеріїв її доброякісності та їх числових параметрів [197].

З метою встановлення доброякісності насіння бруслини європейської проводили визначення втрати в масі при висушуванні, вмісту загальної золи, сторонніх домішок, а також кількісного вмісту жирної олії. Визначення досліджуваних параметрів проводили за фармакопейними методиками (ДФУ 2,0).

Кількісний вміст жирної олії у ЛРС, зокрема в плодах і насінні, визначають кількома методами, які мають в основному гравіметричний характер. Ці методи переважно зводяться до видалення жирної олії за допомогою обробки рослинної сировини органічними розчинниками, у якості яких як правило застосовують діетиловий та петролейний етери, хлороформ, гексан та інші низько киплячі

розчинники. Для кількісного визначення жирних олій в переважній більшості випадків використовується апарат Сокслета [131]. Після отримання екстракту розчинник повністю видаляють із колби-приймача із залишком жирної олії, висушують її до сталої маси, охолоджують і зважують на аналітичних вагах. Визначати вміст жирної олії можливо також шляхом зважування наважки ЛРС до і після екстрагування її в апараті Сокслета (метод сухого знежиреного залишку). Для визначення кількісного вмісту жирної олії у насінні бруслини нами використана фармакопейна методика (ДФУ 2.1.стор.251).

З метою опрацювання методів та критеріїв стандартизації насіння бруслини європейської нами проведено визначення числових показників основних критеріїв доброякісності на зразках насіння рослини, заготовленої в період досягання плодів у Городоцькому, Пустомитівському, Перемишлянському районах Львівської області.

За результатами проведених досліджень встановлено, що вміст жирної олії в досліджуваних зразках насіння рослини становив від 25,42% до 35,78%, втрата в масі при висушуванні – 7,09% - 10,05%, загальна зола – 8,56-9,95%, сторонні домішки – 1,5 – 2,0%.

На основі проведених досліджень нами запропоновані показники доброякісності насіння бруслини європейської, які включені до проєктів МКЯ «Бруслини європейської насіння»

БРУСЛИНИ ЄВРОПЕЙСЬКОЇ НАСІННЯ

Euonymi europaea L. semen

Висушене насіння *Euonymus europaea L.*, без оплоднів.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

А. Обернено-яйцеподібне насіння, білувате, цілком покрите помаранчевим складчастим принасіником (арилусом). Розміри насінини 0,5-1 см.

В. Принасіник складчастий, двошаровий, кожен шар вкритий кутикулою. Клітини шарів витягнуті перпендикулярно насінині. В клітинах рясні помаранчеві жирові включення двох видів: великі різних розмірів та маленькі однакові за

розміром. В клітинах ендосперму і сім'ядолей часті, дрібні помаранчеві жирові включення .

ВИПРОБОВУВАННЯ:

Втрата в масі при висушуванні -не більше 10 %.

Зола загальна -не більше 6 % .

Сторонні домішки - лікарська рослинна сировина не повинна містити цвілі, комах та інших домішок тваринного походження. Кількість інших органічних часток не має перевищувати 2,0 %.

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

5,0 г подрібненого насіння поміщають у круглодонну колбу місткістю 10 мл, додають 50 мл гексану, нагрівають зі зворотним холодильником протягом 60 хв, охолоджують і фільтрують в іншу , попередньо зважену круглодонну колбу. Залишок у першій колбі промивають 25 мл гексану, змиви фільтрують у ту саму зважену колбу, одержаний екстракт випарюють до видалення розчинника. Круглодонну колбу із жирною олією висушують у сушильній шафі до постійної маси.

Вміст жирної олії, у відсотках, у перерахунку на повітряно-суху сировину, обчислюють за формулою:

$$X = \frac{m \times 100 \times 100}{m_1 \times (100 - W)}$$

де m- маса жирної олії, г;

m₁-маса наважки випробовуваної сировини, г;

W- втрата в масі при висушуванні, %.

5.2.2 Розробка методів контролю якості жирної олії насіння бруслини європейської.

Жирну олію із насіння бруслини європейської отримували методом екстрагування гексаном. Опрацювання числових параметрів доброякісної жирної олії бруслини європейської проводили на трьох серіях цієї субстанції за фармакопейними методиками (ДФУ).

Опис. В'язка рідина яскраво-помаранчевого кольору із специфічним запахом, гіркувато-маслянистого смаку.

Розчинність. Розчинна у органічних розчинниках (гексані, хлороформі), малорозчинна у *етанолі*, нерозчинна у *воді*. (ДФУ 1.4).

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

А. Визначення числових показників за методиками (ДФУ1.2) та розділ дисертації 2.3

Кислотне число-4,04; число омилення-149,9; ефірне число-145,86; йодне число-120.

В. Тонкошарова хроматографія.

Випробовуваний розчин . Близько 20 мг (1 крапля) жирної олії розчиняють у 3 мл *гексану Р*.

Розчин порівняння. Близько 20 мг (1 крапля) кукурудзяної олії *Р* розчиняють у 3 мл *гексану Р*.

Рухома фаза метиленхлорид-оцтова льодяна кислота-ацетон (20:40:50)

Для аналізу використовують пластинку із шаром силікагелю.

Нанесення: 1 мкл

Відстань, що має пройти рухома фаза: 8 см від лінії старту.

Висушування: на повітрі.

Виявлення: обприскують розчином 100 г/л *фосфорно-молібденової кислоти Р* в *етанолі (96 %)* *Р*, нагрівають при температурі 120 °С протягом 3 хв і переглядають при денному світлі.

Результати На хроматограмах випробовуваної олії бруслини по середині пластинки візуалізуються дві насичені зони темно-синього кольору та менш насичена ближче краю пластинки, у розчині порівняння- чотири насичені зони по середині пластинки.

Верхня частина пластинки	
	
Розчин порівняння	Випробуваний розчин

ВИПРОБОВУВАННЯ

Розчинники (5.4; 2.4.24; 2.2.28) не більше 0,001 % (10ppm) залишкової кількості *гексану Р*

Мікробіологічна чистота (5.1.4; 2.6.12) В 1,0 г жирної олії допускається наявність не більше 10^3 КУО/г або КУО/мл аеробних мікроорганізмів та не більше 10^2 КУО/г або КУО/мл дріжджових та плісневих грибів

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Визначення суми каротиноїдів.

Встановлення вмісту суми каротиноїдів проводять використовуючи спектрофотометричний метод. 0,05 г (точна наважка) жирної олії розчиняють у 50 мл гексану, після перемішування вимірюють оптичну густину отриманого розчину при довжині хвилі 450 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм.

Вміст каротиноїдів (X) у перерахунку на β -каротин обчислюють за формулою:

$$x = \frac{A \times 10 \times V}{E \times m}$$

де A – оптична густина досліджуваного розчину;

E – питомий показник поглинання β -каротину в гексані при

довжині хвилі 450 нм, який дорівнює 2500;

V – об'єм розчину, мл;

10 – вміст каротину в 1 мл 1% розчину, мг;

m – маса наважки, г.

Вміст суми каротиноїдів у перерахунку на β -каротин має становити не менше $26 \pm 5\%$

Упаковка.

По 25 г у флаконах із темного скла згідно ГОСТ 17768-90. Флакон разом з інструкцією для медичного використання вкладають у картонну пачку. На пачці зазначають назву сировини українською та латинською мовами, масу сировини нетто, умови зберігання, номер партії, термін придатності. Групова і транспортна тара відповідно до ГОСТ 17768-90.

Транспортування. Відповідно до ГОСТ 17768-90.

Зберігання. Відповідно до ГОСТ 6077-80 і ГОСТ 17768-90. У сухому, захищеному від світла місці не вище $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Термін придатності. 2 роки

5.2.3 Розробка інструкцій із заготівлі та сушіння насіння та кори бруслини європейської

Важливим видом нормативно-технічної документації на ЛРС є інструкція із заготівлі та сушіння сировини. Тому нами опрацьовано основні правила заготівлі, сушіння та зберігання насіння і кори бруслини європейської, які включено в проект нормативного документу, що регламентує проведення заготівлі доброякісної сировини цієї рослини.

Важливим етапом заготівлі дикорослої лікарської сировини є ботаніко-морфологічні дослідження, які передбачають ідентифікацію лікарської рослини в природі. Достатньо актуальним є вивчення ботанічно близьких видів, встановленн основних морфологічних відмінностей між ними.

Бруслина європейська проростає по всій території України у світлих лісах, переважно дубових та соснових, зазвичай на узліссях та чагарниках, в тінистих ярах, іноді біля житла. Поряд із бруслиною європейською проростає і інший вид-

бруслина бородавчаста. Тому опрацьовані основні відмінні ознаки між ними (розділ 5.1).

Сировинними органами бруслини європейської як джерела лектинів та жирної олії є кора і насіння рослини. Насінина біла, зверху вона повністю вкрита помаранчевим арилусом (принасінником). Насіння відділене від малинового оплодня. Кора- зовнішня, розташована до периферії від камбію, частина гілок. Кора зеленого кольору із опробковілими ребрами сірого або сіро-бурого кольорів, із внутрішньої сторони – біла, волокниста.

Насіння заготовляють у період повного дозрівання плодів (вересень - жовтень), рекомендовано заготовляти із рослин, які проростають на сонячних ділянках, подалі від великих автошляхів та територій, забруднених відходами підприємств. Збирають у суху погоду, після того, як обсохне ранкова роса і до появи вечірньої. Насіння збирають вручну або обтрушуючи кущі. При первинній обробці відділяють від малинових оплоднів. Перед сушінням видаляють сторонні домішки.

Кору заготовляють у період сокоруху (лютий-березень), рекомендовано заготовляти із рослин, які проростають на сонячних ділянках, подалі від великих автошляхів та територій, забруднених відходами підприємств. Кору збирають із здорових, добре розвинутих рослин, не пошкоджених комахами та мікроорганізмами. Заготовляють кору із молодих пагонів зеленого кольору, до 1 см у діаметрі, шляхом нанесення кільцевих надрізів на відстані 20-30 см, з'єднують одним-двома поздовжніми надрізами, відділяють жолобоподібні частини. Перед сушінням видаляють сторонні домішки.

Диференціюють від близького виду бруслини бородавчастої (*Euonymus verrucosa*) за зовнішнім виглядом. У бруслини бородавчастої насінини фіолетового кольору лише частково вкрита при насінником, на відміну від насіння бруслини європейської, яке є білим, повністю вкритим принасінником. Кора бруслини європейської гладка зеленого кольору, або з сіро-бурими ребрами на відміну від кори бруслини бородавчастої, яка вкрита чорними бородавками, без ребер.

Сумарний вміст супутніх домішок не має перевищувати 2%. Домішки, концентрація яких перевищує 0,1%, мають бути ідентифіковані. Диференціювати від близького виду бруслини бородавчастої за зовнішнім виглядом. У бруслини бородавчастої насінини фіолетового кольору лише частково вкрита при насінником, на відміну від насіння бруслини європейської, яке є білим, повністю вкритим принасіником. Кора бруслини європейської гладка зеленого кольору, або з сіро-бурими ребрами на відміну від кори бруслини бородавчастої, яка вкрита чорними бородавками, без ребер.

Сушіння сировини: максимально допустима температура $\leq 50^{\circ}\text{C}$. Втрата в масі при сушінні насіння 30-50%, при сушінні кори 50-70%.

Числові показники доброякісності насіння : жирної олії не менше $24 \pm 5\%$, втрата в масі при висушуванні- не більше 10%, зола загальна- не більше 6%, органічні домішки- не більше 1%. Числові показники доброякісності кори : втрата в масі при висушуванні- не більше 10%, зола загальна- не більше 5%, органічні домішки- не більше 1%.

Пакування: готову сировину пакують у мішки по 15 кг або в тюки по 40 кг. Зберігають на стелажах в сухому, прохолодному, затемненому, добре провітрюваному приміщенні при температурі не вище $+25^{\circ}\text{C}$ і вологості 80%.

Висновки до розділу 5

1. У результаті проведеного нами морфолого-анатомічного дослідження бруслини європейської встановлені основні діагностичні ознаки. при аналізі тотожності сировини. Опрацьовано відмінні ознаки від бруслини бородавчастої, видом, який проростає сумісно на території України. Встановлено, що такими ознаками є зелений колір кори із сіруватими ребрами, розміщеними по кутах, що робить стебло чотиригранним, відсутність бородавок, які притаманні бруслині бородавчастій. Насінина бруслини європейської повинна бути повністю покрита принасіником, яскравого помаранчевого кольору, на відміну від бруслини бородавчастої, у якої

принасінник лише частково вкриває насінину, яка набуває фіолетового забарвлення у місці, де він відсутній.

2. При мікроскопічному дослідженні встановлено, що продиховий комплекс листя аномоцитного типу, продихи розміщені лише із сторони нижнього епідермісу, волоски прості, зустрічаються в основному вздовж жилок, у паренхімі наявні друзі оксалату кальцію, які локалізовані більшою мірою по краях листкової пластинки та при її основі. При дослідженні кори встановлено наявність розширень (дилатацій) у первинній корі, та відсутність склереїд. Виявлені діагностичні ознаки використані при опрацюванні критеріїв ідентифікації сировинних органів бруслини європейської.
3. Опрацьовано основні правила заготівлі, сушіння та зберігання насіння і кори бруслини європейської, як нових видів рослинної сировини.
4. За результатами проведених досліджень розроблено проекти МКЯ «Бруслини європейської насіння», «Бруслини європейської олія насіння», розроблено проекти нормативних документів «Інструкція із заготівлі і сушіння насіння бруслини європейської» і «Інструкція із заготівлі і сушіння кори бруслини європейської».

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Morphological and anatomical study of the bark, leaves and seeds of *Euonymus europaeus* L. / Vrubel O.R., Darmohray R.YE. Antonyk V.O. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. -2020- Vol. 9, N.1, P. 1297-1299.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено експериментальне вирішення наукової задачі, що виявляється у комплексному фармакогностичному дослідженні бруслини європейської (*Euonymus europaeus* L.), отриманні лектину з кори рослини та встановленні основних його характеристик, одержанні жирної олії насіння, вивченні основних її фізико-хімічних показників та фармакологічної активності, дослідженні ліпофільних фракцій кори, листя і насіння, встановленні основних ознак тотожності сировини та критеріїв її доброякісності.

1. У корі бруслини європейської встановлено наявність та проведено виділення лектину, який за вуглеводною специфічністю не відрізняється від попередньо отриманого лектину насіння рослини. У лектину кори досліджена електрофоретична чистота та проведено порівняльне дослідження імунохімічних властивостей лектинів кори та насіння бруслини європейської. Гістохімічне дослідження зв'язування лектинів кори та насіння з глікокон'югатами тканин ссавців показало, що обидва лектини зв'язуються з одними і тими ж гістологічними структурами, що підтвердило їх ідентичність.

2. Досліджено динаміку змін гемаглютинуючої активності лектинів в сировинних органах бруслини європейської протягом річного вегетаційного циклу розвитку рослини, що дозволило рекомендувати оптимальні терміни заготівлі сировини для отримання цих субстанцій.

3. Проведено отримання жирної олії насіння бруслини європейської, досліджено вміст жирних кислот, каротиноїдів та токоферолів у олії рослини, одержаної шляхом екстракції гексаном. Встановлено, що з 9-ти виявлених жирних кислот, 4 є ненасичені (олеїнова, пальмітоолеїнова, лінолева та ліноленова), в сумі вони складають 87,79 % усіх жирних кислот олії бруслини європейської. Встановлено, що жирна олія насіння рослини містить 26 ± 5 мг% каротиноїдів та 40 ± 5 мг% токоферолів. Вперше виявлено сквален у жирній олії бруслини європейської, вміст якого у досліджуваному зразку становив 1,84 мг/мл.

4. Розроблено схему комплексного одержання біологічно активних речовин кори, що передбачає екстракцію ліпофільних фракцій етанолом та хлороформом після виділення лектину для раціонального використання сировини.

5. За допомогою ГХ-МС здійснено аналіз ліпофільних речовин, екстрагованих петролейним ефіром з кори, листя та квіток бруслини європейської. Визначено хімічний склад одержаних фракцій, де переважали вуглеводні, жирні олії, стероїди та тритерпенові сполуки. Встановлено, що кора і листя є перспективнішими сировинними джерелами, ніж квітки. Вперше проведено визначення основних мікроелементів у листі і корі бруслини європейської, вміст токсичних елементів і важких металів не перевищував нормативів ВООЗ і ДФУ 2.0.

6. Встановлено, що при введенні олії бруслини європейської не спостерігається симптомів інтоксикації у щурів, досліджувана субстанція не викликала загибелі тварин, тому її можна віднести до 4 класу токсичності.

На моделі неалергічного контактного дерматиту виявлена протизапальна активність олії бруслини європейської в порівнянні з олією обліпихи. Зміни гематологічних та біохімічних показників у досліджуваних тварин (щурів) достовірно були кращими при застосуванні олії бруслини в порівнянні з такими у нелікованих тварин. Жирна олія володіє протигрибковою дією (так як і настійки кори, листя та квітів) відносно пліснявих грибів.

7. Встановлено основні діагностичні ознаки сировинних органів бруслини європейської, які використані при розробці показників тотожності і доброякісності на новий вид ЛРС (насіння рослини). За результатами проведених досліджень розроблено проекти МКЯ «Бруслини європейської насіння», «Бруслини європейської олія насіння», «Лабораторний регламент одержання лектину з кори бруслини європейської (*Euonymus europaeus* L.)», який використовується в практичній роботі НВК «Лектинотест», а також проекти Інструкцій із заготівлі і сушіння насіння та кори бруслини європейської.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Biological Flora of the British Isles: *Euonymus europaeus* L. / Thomas P.A., El-Bargh athi M., Polwart A. *Jornal of ecology*, -2011- Vol. 99 N.1, P. 345–365.
2. Родина Бруслинові *Celastraceae* Lidl./ Котов М.І. та ін. *Флора УРСР*- Т. VII- К: В-ТВО АН УРСР, 1955.- С. 192-201
3. www.iucnredlist.org
4. Poisonous plants in Britain and their effects on animals and man/ Cooper, M. R., Johnson, A. W. *Her Majesty's Stationery Office*, London, England. -1984-305 p.
5. Klucz do oznaczania roślin naczyniowych Polski niżowej/ Rutkowski L. Warszawa: Wyd. Naukowe PWN, 2006. 345p.
6. Определитель высших растений Украины/ Доброчаева Д.П., Котов М.И., Прокурин Ю.Н. изд.- Киев:Наук. Думка, 1987.-с.239-240.
7. Development of cork-wings on certain trees/ Gregory E. *Botanical Gazette*.- 1889-№14, P. 5-10.
8. Bark Anatomy of Trees and Shrubs in the Temperate Northern Hemisphere/ Schweingruber F. H., Steiger P., Börner A., Springer, -2019- P. 142-145.
9. Флора СССР / Ред-ры тома Б. К. Шишкин и Е. Г. Бобров. — Л.: Издательство Академии Наук СССР.- 1949. - Т. 14. - 790 с.
10. Растительные ресурсы СССР. Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейства Rutaceae — Elaeagnaceae Соколов П. Д. –Ленинград: Наука, - 1988. – 358 с.
11. Бересклети СССР и сопредельных стран/ Леонова Т.Г.Ленинград: Наука.- 1974.-131с.
12. Phytochemical analysis and antibacterial activity on seed and pod extracts of *Crotalaria incana*/ A.A.Mathewos,G.M. Habtamu, E.A.Milkyas *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*.-2015.-Vol 3,№4.-P.100-108
13. A revision of *Euonymus* (Celastraceae) /Ma J.S., Thaiszia J. Bot.- 2001-Vol.1 N.1. P.1–264.

14. Celastraceae. Flowering plants. Dicotyledons/ Simmons MP. In: Kubitzki K, editor. The families and genera of vascular plants. Berlin/Hildelberg/New York: Springer - 2004- P. 29–64.
15. Comparison of the structure of floral nectaries in two *Euonymus* L. species (Celastraceae)/ Konarska A. *Protoplasma* -2015-Vol. 252, N.3, P. 901–910.
16. Морфолого-анатомическое строение и жировые включения плода бересклета европейского (*Euonymus europaea* L.)/ Созонова Л., Трусов Н. *Вестник российского университета дружбы народов* - 2002.- №8, С. 31-34
17. Изучение маслянистости семян и присемянников *Euonymus europaea* L. и *Euonymus verrucosa* scop. И состава триацилглицеридов / Вандышев В.В., Трусов Н.А., Созонова Л.И., Шейченко В.И. *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия Медицина.*- 2004.-№4.- С. 279-285.
18. Низшие алкиловые эфиры жирных кислот из плодов бересклета/ Сидоров Р. Жуков А., Верецагин А. *Физиология растений.* -2012- Т.59, № 3, С.362-368
19. Alterations in allocation and composition of lipid classes in *Euonymus* fruits and seeds/ Blehová, A., Murín, M., Nemeček, P. et al. *Protoplasma* -2020- Vol.107, N.20 P.9464-9469
20. Рід *Euonymus* у природних та штучних фітоценозах/ Поліщук М. О. *Інтродукція та збереження рослинного різноманіття* - 2016- Т.1, N.34, С. 31-33.
21. Chemical constituents of plants from the genus *Euonymus*/ Jin, H.Z., Zhang, W.D. *Chem. Biodivers.*, -2012-Vol. 9, P. 1055-1076
22. Состояние химического изучения растений порядка Celastrales/ Бандюкова В.А., Сергеева Н.В. *Растительные ресурсы*- 1977- Т 13, В 3 С. 560-569.
23. Chemical Constituents of *Euonymus bockii* / Wang, KW., Wang, SW. *Chem. Nat. Compd.* -2014-Vol. 50, P.948–949.
24. Chemical constituents of *Euonymus alatus* / Yan Zh., Han Z., Hu X. et al. *Chem. Nat. Compound*- 2013- Vol.49, P.340–342 .
25. Traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology, separation and analysis technologies of *Euonymus alatus* (Thunb.) Siebold: A comprehensive review/

Fan L., Zhang C., Ai L., Wang L., et al., *Journal of Ethnopharmacology*, - 2020-Vol. 259, P.112942.

26. Celastraceae: Constituents of *Euonymus europaea* / Hargreaves K. R. *Phytochemistry*. 1971.- Vol. 10.- N 4.- P. 898—899.

27. Bioactivity-Guided Purification of Novel Herbal Antioxidant and Anti-NO Compounds from *Euonymus laxiflorus* Champ. / Nguyen V.B., Wang S.-L., Nguyen A.D., Lin Z.-H., Doan, C.T.; Tran, T.N. et al. *Molecules* -2019-Vol. 24, P. 120.

28. Potent Hypoglycemic Compounds from *Euonymus laxiflorus* Champ. and Their Effect on Reducing Plasma Glucose in an ICR Mouse Model. /Nguyen V.B., Wang S.-L., Nguyen T.H. et al. *Molecules*- 2018-, Vol. 23, P.1928.

29. Anti-inflammatory pentacyclic triterpenes from the stems of *Euonymus carnosus*/ Zhou J., Wei X-h, Chen F-y., Li C-j.,et al. *Fitoterapia*, -2017-Vol. 118, P.276-278.

30. Flavonoid constituents of *Euonymus fortunei*/ Xi-Lin Ouyang, Liu-Xin Wei, Xian-Ming Fang,Heng-Shan Wang. *Chemistry of Natural Compounds*. -2013-Vol.49, No.3.- P.428-431.

31. Chemical investigation of *Euonymus europaeus* / Pasich B., Bishay D. W., Kowalewski Z., Rompel H. *Planta Medica* – 1980. - Vol.39, No.4- P.391

32. Genus *Euonymus*: Chemical and Pharmacological Perception/ Sharma A. Sati S. et al. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*.- 2012.- Vol.9 , N.4, P. 341-351.

33. Bioactive terpenoids from *Euonymus verrucosus* var. *pauciflorus* showing NO inhibitory activities/ Yang Y., Yang X., Zhang X., Song Z., et al. *Bioorganic Chemistry*, - 2019- Vol. 87, P. 447-456.

34. Chemotaxonomic research on vascular plants: Polyphenols substances of the spindle tree (*Euonymus europaea*) / Gonnet J, F., Lebreton Ph. *Plant. med. et phytother.*- 1971.- Vol. 5, N 4. P. 255—271.

35. Отруйні рослини/ О.Ю.Коновалова, В.А.Туманов, Ф.А.Мітченко та ін..- Київ:ЧП «Блудчий М.І.», 2011.-494 с.

36. Фармакогностичне изучения представителів родини агрусові, бруслинні, ранникові і на їх основі лікарських засобів/ Кисличенко В. С.: автор-т дис.на

здобуття наук. с-туп. док. фарм. наук: спец. 15.00.02 «Фармацевтична хімія та фармакогнозія»- Харків, 1999.- 34 с.

37. Сердечные гликозиды семян *Euonymus europaea*/ Кисличенко С.Г., Макаревич И.Ф., Колесников Д.Г. *Химия природных соединений*.- 1966.-№6-С. 440

38. Эвоногенин / Кисличенко С.Г., Макаревич И.Ф., Колесников Д.Г. *Химия природных соединений*.- 1969.- №5- С. 386-389

39. Эвонолозид из семян *Euonymus europaea*/ Кисличенко С.Г., Макаревич И.Ф., Колесников Д.Г. *Химия природных соединений*- 1967.-№4.- С.241-244

40. Characterization of alkaloid D, a new alkaloid from *Euonymus europaea* as arnepavine / Bishay D. W., Kowalewski Z., Phillipson J. D. *J. Pharm. and Pharmacol.* -1971- Vol. 23 .P.233

41. Identification of peptide alkaloids from *Euonymus europaea* (Celastraceae) / Bishay D. W., Kowalewski Z., Phillipson J. D. *J. Pharm. and Pharmacol.* -1972.- Vol. 24 N 40400, P.169

42. Imidazo[4,5-a]quinindolines as highly effective antibacterial agents/ Pordel M., Ramezani S., Jajarmi M., Sokhanvar M. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2016 – Vol. 42 №1. – P. 106–110

43. Bisbenzylisoquinoline alkaloids and P-glycoprotein function: A structure activity relationship study/ Xu W., Sh. Chen, X. Wang, H. Wu, H. et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*- 2020-Vol. 28, Is. 12, P.115553

44. Effects of arnepavine against hepatic fibrosis induced by thioacetamide in rats/ Weng T-C., Shen C-C., Chiu Y-L., Huang Yi- T. *Phytother Res*- 2012.-Vol 26, N 3.- P. 344-53.

45. Insecticidal sesquiterpene pyridine alkaloids from *Euonymus* species /Jinbo Z. Mingan W. et al.*Phytochemistry*. -2002.- Vol 61, Is. 6, P. 699-704.

46. New sesquiterpenes from *Euonymus europaeus* (Celastraceae)/ Descoins C.J. Bazzocchi I.L., Ravelo A.G. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* - 2002.- Vol 50, N 2. - P. 199-202.

47. Neuroprotective Dihydro- β -agarofuran-Type Sesquiterpenes from the Seeds of *Euonymus maackii*/ Fu Y., Wang W, Gong Q., et al. *J. Nat. Prod.*- 2019-Vol.82, N.11, P.3096–3103
48. Investigations into the Chemistry and Insecticidal Activity of *Euonymus europaeus* Seed Oil and Methanol Extract/ Wannera J, Tabancab N, Zehlc M, Jirovetzd L., et al. *Current Bioactive Compounds* – 2015-Vol.11, N.1, P.13-22.
49. New sesquiterpene esters from *Euonymus europaeus* and *E. Latifolius*. / Rózsa Z., Pelczer I. *J. Shem. Soc., Perkin. Trans.* - 1989.-Vol. 1, P. 1089 – 1095.
50. Dihydro- β -agarofuran sesquiterpene pyridine alkaloids from the seeds of *Euonymus hamiltonianus*/Mudasir A. Tantry, Mohammad A. Khuroo and others. *Journal of Saudi Chemical. Society*- 2012.-Vol.16, №4.-P.1-5.
51. Plant Drug Analysis: A Thin layer chromatography Atlas/ Wagner H., Bladt S.- Berlin; Heidelberg; Springer-Verlad. -1984.- 320P. Overexpression of diacylglycerol acetyltransferase from *Euonymus europaeus* in *Yarrowia lipolytica* leads to the production of single-cell oil enriched with 3-acetyl-1,2-diacylglycerols./ Gajdos P. , Hambalko J. Certik M *Yeasts*- 2020.-, vol 37, Iss 1 pp 141-147
52. Seeds recovered from industry by-products of nine fruit species with a high potential utility as a source of unconventional oil for biodiesel and cosmetic and pharmaceutical sectors/ Gornaś P, Rudzinska M. *Industrial Crops and Products* , -2016- Vol. 83, P. 329–338.
53. Diacylglycerol Acetyltransferase Gene Isolated from *Euonymus europaeus* L. Altered Lipid Metabolism in Transgenic Plant towards the Production of Acetylated Triacylglycerols/ Mihalik D., Lancaricova A., Mrkvova M. et al. *Life* -2020-Vol. 10, N.9, P.205
54. Состав жирных масел плодов бересклетов : автореферат дис. на соиск. уч. степ. канд. биол. наук: спец.03.01.05 «Физиология и биохимия растений» Сидоров Р.А.-Москва,2013
55. Исследование химического состава жирного масла европейского бересклета/ Симонова Н.И. *Журнал прикладной химии.* - 1959. -Т.32, №7. -С.1637-1640

56. Определение моноацетил-диацилглицеролов масел семян растений семейства Celastráceae /А.В. Туртыгин , В.И. Дейнека, Л.А. Дейнека , Н.А. Трусков, М.Ю. Третьяков, *Аналитика и контроль*.- 2012.- Т. 16. № 1, P.92-95.
57. Thin Layer Chromatography in Phytochemistry/ M.Waksmundzka-Hajnos, J.Sherma, T. Kowalska *CRC Press*, - 2008 p. – P.896.
58. Chromatographic determination of siphonodin content: A rapid and simple strategy for discriminating between Hemsleya omeiensis and other sources of Xuedan /Yi Qin , *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* -2019-Vol. 18, N.4, P. 837-842
59. Butenolides in small ermine moths, Yponomeuta spp. (Lepidoptera: Yponomeutidae), and spindle-tree, Euonymus europaeus (Celastraceae)/ Fung S.Y., Herrebout W.M., Verpoorte R. et al. *J Chem Ecol* -1988- Vol.14, P.1099–1111 .
60. New butenolides with anti-inflammatory activity from *Balanophora fungosa*/ J. Zhou, Si-Yu Du, Zh.-Y. Fang , Z. Zeng *Natural Product Research*- 2019.
61. Synthesis of 4-(hydroxymethyl)-2(5H)-furanone and its effect on the biofilms of Pseudomonas aeruginosa/ Wang YZ, Ye CQ, Liu GY, Sun PH, Chen WM. *Chem Reagents*- 2010- Vol.32, P.970-972.
62. Antimicrobial peptides/ Bahar, A. A., Ren, D. *Pharmaceuticals*- 2013-Vol. 6, P.1543–1575.
63. A novel chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seed with potential for plant disease control. Gifoni, J. M., Oliveira, J. T. A., Oliveira, H. D., Batista, A. B., Pereira, M. L., Gomes, A. S., et al. *Biopolymers* – 2012- Vol. 98, P.406–415.
64. Five disulfide bridges stabilize a hevein-type antimicrobial peptide from the bark of spindle tree (Euonymus europaeus L.)/ Karolien P., B. Van den Bergh, Paul Proost, Jo Van Damme, et al. *FebsLetters*- 2002.-Vol.530., Is. 1-3, P 181-185.
65. A Chitin-binding Protein Purified from *Moringa oleifera* Seeds Presents Anticandidal Activity by Increasing Cell Membrane Permeability and Reactive Oxygen Species Production/ Neto JXS, Pereira ML, Oliveira JTA, Rocha-Bezerra LCB, et al. *Front. Microbiol.* – 2017-Vol. 8, P.980
66. Plant antimicrobial peptides: a novel approach against drug resistant microorganisms/ Samriti, Biswas R., Biswas K. *JPSR*.- 2018- Vol. 9, N. 1, P.1-15

67. Synergistic antifungal activity of two chitin-binding proteins from spindle tree (*Euonymus europaeus* L.)/ Van den Bergh K..P., Rouge P., Proost P., Coosemans J., et al. *Planta* -2004-Vol. 219, N 2.- P. 221-232.
68. Chitin-Binding Protein of *Verticillium nonalfalfae* Disguises Fungus from Plant Chitinases and Suppresses Chitin-Triggered Host Immunity/ Volk H., Martom K., Flajsman M., Radisek S. *Molecular Plant-Microbe Interactions* .-2019-Vol 32. ,No 10, P.1378-1390
69. Mechanisms of bacterial attachment to roots/ Wheatley R. M ,Poole P. S. *FEMS Microbiology Reviews*, -2018- Vol.42, P. 448–461.
70. The lectin of *Euonymus europaeus*: purification, characterization and immunochemical study of its combining site. / Petryniak I.,Pereira M.E.A., Kabat E.A. *Arch. Biochem. Biophys.*-1977.-V.178.-P.118-134.
71. Immunochemical studies on theinteraction between synthetic glucoconjugates and α -L-fucosyl-binding lectins / Petryniak I., Goldstein I.J.*Biochemistry* -1986.- Vol.25, No10.-P.2829-2838.
72. Phytohemagglutinins XXV. Isolation and characterization of hemagglutinin of the spindle tree seeds (*Evonymus europaeus*). / Pacak F., Kocourek J. *Biochim. Biophys.Acta.*-1975.-Vol.400, No 2.-P.374-386.
73. The carbohydrate-binding promiscuity of *Euonymus europaeus* lectin is predicted to involve a single binding site/ Agostino M., Velkov T., Dingjan T., Williams S.J., Yuriev E., Ramsland P. A. *Glycobiology*.-2015.-Vol. 25, N. 1, P.101–114.
74. The "Old" *Euonymus europaeus* Agglutinin Represents a Novel Family of Ubiquitous Plant Proteins / Fouquaert E., Peumans W. J., Smith D. F. , Proost P., Savvides S. N., Van Damme E. J.M. *Plant Physiology*. – 2008.-Vol. 147. – P. 1316 – 1324.
75. Promiscuity of the *Euonymus* Carbohydrate-Binding Domain/ Fouquaert E., Van Damme E.J.M.*Biomolecules*.-2012-Vol.2, N.4, P.415-434.
76. Lectin domains at the frontiers of plant defense/ Lannoo N., Van Damme EJM *Front. Plant Sci.*-2014-Vol.5, P.397.

77. Protein measurement with the Folin phenol reagent /Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. I., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*- 1951.-Vol. 193. –P. 265 – 275.
78. Lectin microarray analysis of pluripotent and multipotent stem cells/ M. Toyoda, M. Yamazaki-Inoue, Y. Itakura, A. Kuno, T. et al. *Genes to Cells*.-2011-Vol.16, P.1–11.
79. Evonymus europaeus agglutinin as a marker of endothelial cells in the human. / Roussel F, Tayot J. *Acta Anat (Basel)*.-1987.- Vol. 129, No 2.-P.92-95.
80. Euonymus europaeus lectin as an endothelial and epithelial marker in canine tissues/ Roussel F., Dalion J., Wissoca J.C. *Lab Anim*- 1992-Vol. 26, N 2. – P. 114-121.
81. Studies on Gal α 3-binding proteins: comparison of the glycosphingolipid binding specificities of Marasmius oreades lectin and Euonymus europaeus lectin. /Teneberg S, Alsen B, Angstrom J, Winter H.C, Goldstein I.J. *Glycobiology*.- 2003.- Vol.13, No 6.-P.479-486.
82. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects/ Vanderborre G., Smagghe G., Van Damme J. *Phytochemistry*. – 2011.- Vol 72, Is. 13, P. 1538-1550
83. Roles of Glycoproteins in the Diagnosis and Differential Diagnosis of Chronic and Latent Keshan Disease/ Wang S., Fan Z., Zhou B., Wang Y., Du P.et al., *Molecules*.-2017-Vol.22, N.5, P.746.
84. Endotelium originated from colorectal cancer stem cells constitute cancer blood vessels./Shangguan W., Fan C., Chen.X., Lu.R., Liu.Y., Li Y. et al. *Cancer Sci*.-2017-Vol.108, P.1357–1367.
85. Способ получения аффинного сорбента для очистки лектинов/ Антонюк В.А.- А.С. СССР № 1554961, заявка № 4377008/13/ 021680 от 8.02.88 г, зарегистр. 8.12.89 г, опубл. 7.04.1990 г Б. И. № 13.
86. Конъюгирование лектинов с пероксидазой хрена: усовершенствование методики/ Антонюк В.А., Ященко А.М. *Клиническая лабораторная диагностика* - 1996.- № 3.-С.51-52.
87. Дослідження імунохімічних властивостей лектинів кори та насіння золотого дощу звичайного / Антонюк В.О. *Фарм. журнал* – 1988.- №1.- С. 57-61.

88. Лектини та їх сировинні джерела. Антонюк В.О. – Львів: Кварт.- 2005. -554 с.
89. Методы исследования углеводной специфичности лектинов (методические рекомендации)/Луцик М.Д., Панасюк Е.Н., Антонюк В.А., Луцик А.Д., Ладная Л.Я.- Львов.-1983.-20с.
90. Lectins/ Sharon, N., Lis, H. 2nd ed., Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. – 2003. – 454 p.
91. Plant Lectins: Bioactivities and Bioapplications/ Ribeiro A., Ferreira R., Freitas R. Studies in Natural Products Chemistry/- 2018.- Vol. 58, P.1-42
92. Overview of the Structure–Function Relationships of Mannose-Specific Lectins from Plants, Algae and Fungi / Barre, A.; Bourne, Y.; Van Damme, E.J.M.; Rougé, P. *Int. J. Mol. Sci.* -2019-Vol. 20, P. 254.
93. Изучение растительных "антител" (лектинов) и практическое применение их в судебной медицине/Потапов М.И..- Автореф. на соиск. уч. степени. д-ра мед. наук. - М.-1970.- 32 с
94. Biological activity of *Euonymus europaeus* / Kumarasamy Y., P. J. Cox, M. Jaspars, L. Nahar, et al. *Fitoterapia* - 2003.- Vol. 74, N 3.- P.305-307.
95. Anticancer activity of *Euonymus europaeus* fruits extract on human melanoma cells/ B Sevastre, O Sarpataki, RL Stan, et al. *Farmacia* – 2017.- Vol.65, N.1- P. 56-62
96. Antifungals. Campoy, S., and Adrio, J. L. *Biochem. Pharmacol.*-2016- Vol. 133,P. 86–96.
97. Chemical Composition and Insecticidal Activities of the Essential Oil from Fruits of *Euonymus schensianus*/ He, S., Zhang, Y., Ma, Y. et al. *Chem Nat Compd.* - 2019, Vol. 55, P. 748–750
98. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. Chang Ji Zheng, Jung-Sung Yoo, Tae-Gyu Lee, et al. *FEBS Letters*,- 2005- Vol. 579, Is. 23, P. 5157-5162
99. Antifeedant activity of spindle tree *Euonymus europaeus* (Celastraceae) seed extract against diamond back moth *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) / Elbanna S. *Catryna Jour.*-2010.- Vol 5, Is.1 P. 73-75

100. Bioassay-guided isolation of antifungal alkaloids from *Melochia odorata*/ Emile, A., Waikedre, J., Herrenknecht, C., et al. *Phytother. Res.*, -2007-Vol.21, P. 398-400.
101. Effects on Lipid Peroxidation and Antioxidative Enzymes of *Euonymus alatus* in Cultured Rat Hepatocytes / Kim K-J, Suh S-J, et al. Nordic Pharmacological Society *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*.-2008.-Vol. 104. P 60-70
102. (3 β ,16 α)-3,16-Dihydroxypregn-5-en-20-one from the Twigs of *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. Exerts Anti-Inflammatory Effects in LPS-Stimulated RAW-264.7 Macrophages/ Lee S., Lee D., Baek S.C., Kim K. H. *Molecules* -2019-, Vol. 24, Is.21, P. 3848
103. Bioinsecticidal Compounds of Celastraceae-the Spindle Tree Family. M.A. Deepa and V. Narmatha Bai, *International Journal of Botany*-2010 –Vol.6, P. 220-227.
104. Four new triterpenoids from the bark of *Euonymus alatus* forma *ciliatodentatus*. / Yamashita H., Matzuzaki M., Kurokawa Y. et al. *Phytochemistry Letters*.-2019- Vol. 31, P. 140-146
105. Free radical scavenging and antidiabetic activities of *Euonymus laxiflorus* Champ. extract./ Nguyen, QV., Nguyen, NH., Wang, SL. et al. *Res Chem Intermed* -2017-Vol.43, P.5615–5624
106. The Biological Activity of Natural Alkaloids against Herbivores, Cancerous Cells and Pathogens/ Thawabteh A., Juma S. , Bader M. , Karaman D. , et al. *Toxins*- 2019- Vol.11, N.11,P. 656
107. The inhibitory effect of *Euonymus alatus* against mouse hepatic fibrosis induced by CCl₄ / Wan X., Guo Q., Liu X-D., Huang D.-B. *Chinese Pharmacological Bulletin* -2018-Vol.34, N.4, P.485-490
108. Anti-tumor effect of *Euonymus europaeus* on Ehrlich tumor cells in vivo. Sevastre B, Sarpataki O, Olah NK, Stan RL, Taulescu M, Marcus I, Catoi C *Farmacia* -2014-Vol.62, N.5, P.907-17
109. Anticancer activity of *Euonymus europaeus* fruit extract on transplantable mous tumor model/ Sarpataki O., Stan R. L., Hangan A. et al., *Buletin of university of agricultural sciences and veterinary medicine* .- 2016.-Vol 73, Is 1, P. 161-168.

110. Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons / Sikkema J., de Bont J. A.M., Poolman B. *Microbiological Reviews*. – 1995. – Vol. 59, N2.- P. 201 -222.
111. Medicinal plants with antioxidant properties from Banat region (Romania)/ D.Simona, *Fascicula Biologie*.- 2010.- Vol.17, №1.-P.14-22.
112. Skin external agent . Patent US5676957A //Nakamura N. Akiyama J. A continuation of U.S. patent application14 october 1997 Ser. No. 08/367.011 filed 30 Dec. 1994.
113. Протизапальний та антимікробний засіб з рослинної сировини .Пат. №96137 U Україна МПК А61К36/45./Поліщук М.О..-№2001410047;заявл. 12.09.2014; опубл.12.01.2015,Бюл.№1
114. British Herbal Pharmacopoeia. –London: Published by the British Herbal Association. – 1996. – 215 p.
115. Anti-tumor effect of evodiamine by inducing Akt-mediated apoptosis in hepatocellular carcinoma/ F. Yang, L. Shi, T. Liang, L. Ji, et al. *Biochemical and Biophysical Research Communications*-2017-Vol. 485, Is. 1, P. 54-61
116. Characterization of the *in Vitro* Metabolic Profile of Evodiamine in Human Liver Microsomes and Hepatocytes by UHPLC-Q Exactive Mass Spectrometer / Zhang Z., Fang T., Zhou H., Yuan J. , Liu Q. *Front. Pharmacol.*, -2018. – Vol.9, P.130
117. Peroxidase-labelled antibody. A new method of conjugation / Nakane P., Kawaoi A. *J. Histochem. and Cytochem.*- 1974.-Vol. 22, № 12.- P. 1084-1091.
118. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. Остерман Л. А.-М.: Наука.- 1985. –536 с
119. Державна Фармакопея України / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид., 1 допов. Х.: РІГЕР, 2004. 494 с.
120. Державна Фармакопея України / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. Харків: РІРЕГ, 2011. Доповнення 4. 536 с.
121. Державна Фармакопея України: в 3 т. / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». 2-е вид., Т. 3. Х.: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2014. 732 с.

122. Державна Фармакопея України: в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-ге вид. Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. 724 с.
123. Державна Фармакопея України: в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид., Т. 1. Х.: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. 1128 с.
124. Державна Фармакопея України: в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид., 1 допов. Х.: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2016. 360 с.
125. Межгосударственный стандарт масла растительные. Метод определения жирнокислотного состава. ГОСТ 30418-96 1998.
126. ДСТУ ISO 5508-2001 Жири та олії тваринні і рослинні .Аналізування методом газової хроматографії метилових ефірів жирних кислот
127. ДСТУ ISO 5509-2002 Жири та олії тваринні і рослинні. Приготування метилових ефірів жирних кислот
128. Теоретичне обґрунтування комплексної технології переробки лікарської рослинної сировини /С.В.Гарна, П.П.Ветров .*Фармацевтичний журнал* – 2012. – №1. – С.80-85.
129. Фармакогностичне вивчення бирючини звичайної та створення лікарських субстанцій на її основі/ Мусієнко К.С.: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. фарм. наук: спец. 15.00.02 «Фармацевтична хімія та фармакогнозія»/ Мусієнко К.С.-Харків, 2015.- 20с.
130. Практикум по фармакогнози / В.Н. Ковалев, Н.В. Попова, В.С. Кисличенко и др.- Харьков: Изд-во НФаУ; Золотые страницы, 2003. — 512
131. Дослідження жирних кислот листя поширених сортів м'яти перцевої *Mentha piperita* L. / Андріанов К. В., Федченкова Ю. А., Хворост О. П. *Фармацевтичний часопис*.- 2014.- № 2, С. 18–20.

132. Хроматографическое изучение состава жирного масла семян энотеры двулетней/ Новиков О.О., Писарев Д.И., Жиликова Е.Т., Сорокопудов В.Н., Тохтарь В.К., *Актуальные проблемы медицины*, -2010- Vol. 12-2, No. 22 (93), P.106-109.
133. An improved method for preparing dimethyl disulfide adducts for GC/MS analysis./ Shibahara, A., Yamamoto, K., Kinoshita, A., Anderson, B.L. *J. Am. Oil Chem. Soc.*- 2008.- Vol. 85, P.93-94.
134. Reference book for clinical and biochemical research and laboratory diagnostics. Kamysnikov B.C. MEDpress-inform.-2009- 920 p.
135. Validation of the Dienes Mini-Ves Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR) Analyzer Using the Westergren ESR Method in Patients With Systemic Inflammatory Conditions / Happe M. Battafano D., Dooley D. et al. *American Journal of Clinical Pathology*, -2002-Vol.118, N.1, P. 14–17.
136. Important Therapeutic Uses of Sea Buckthorn (Hippophae): A Review /A. Zeb, *Journal of Biological Sciences*- 2004- Vol.4, N. 5, P. 687-693.
137. Antioxidant, Antinociceptive, and Anti-Inflammatory Effects of Carotenoids Extracted from Dried Pepper (*Capsicum annuum* L.) Hernandez-Ortega M., Ortiz-Moreno A., Hernandez-Navarro M., Chamorro-Cevallos G., et al. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* – 2012-. P. 10
138. Каротиноїди: будова, властивості та біологічна дія / М. Сімонова. *Біологічні Студії* -2010.- Том 4, №2 - С. 159–170
139. Beta-carotene: experience and perspectives in medicine Poddubny N.P., Sampiyev A.M.: Krasnodar. -2000.- 34 p.
140. Antioxidant activity of carotenoids/ Stahl W., Sies H. *Molecular aspects of medicine*.-2003.- Vol 24, Is. 6, P. 345-351
141. Phytochemical and Pharmacological Profile of Seabuckthorn Oil: A Review/ Kumar R., Kumar G.P., Chaurasia O.P., Singh S. B. Res. *J. Med. Plant* -2011- Vol.5, P 491-499.
142. Растительные лекарственные средства /под ред. проф. Н.П. Максютиной – Киев: Здоровье. -1985. – 277 с.

143. The Effect of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Seed Oil on UV-Induced Changes in Lipid Metabolism of Human Skin Cells/ Gegotek A, Jastzab A., Karpovich I-J., et al. *Antioxidants*.- 2018.- №7, P.110.
144. Squalene and tocopherols in olive oil: importance and methods of analysis / Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention/ Tsimidou M. V. R. Preedy and R.R.Watson, Eds. - London, UK: Academic Press, Elsevier. - 2010. - P.561–567.
145. Immunomagnetic separation as a final purification step of liver endothelial cells./ Gomez D.E, Hartzler J.L, Corbitt R.H, Nason A.M, *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*-1993.- Vol. 29A, No 6.-P. 451-455
146. Squalene content in livers from deep-sea sharks caught in Canary Island waters / Hernandez-Perez M, Gallego R, Alayon P and Hernandez A. *Marine and Freshwater Research* -1997-Vol.48, N.7, P. 573-576.
147. Визначення вмісту сквалену в амарантовій олії методом високоефективної рідинної хроматографії. Методичні рекомендації призначені для спеціалістів ветер. мед., спец. лаб., для науково-дослідних лаб., що здійснюють контроль якості і безпеки лікарських засобів та продуктів харчування/О. В.Коробова та ін.; Держ. Ветеринарна та фіто санітарна служба, Держ. наук.- досл. ін.-т ветер. Кормів та біодобавок. Львів, 2015.12 с.
148. Determination of Squalene Using High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection/ Lu H-T, Jiang Y, Chen F. *Chromatographia* -2004-Vol.59, P. 367–371.
149. Rapid determination of squalene in virgin olive oils using gas-liquid chromatography/ Leonardis AD, Macciola V, Felice MD. *Italian Journal of Food Science*, -1998-Vol. 10, P.75-80.
150. Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds: Potential uses in cosmetic dermatology/ Huang Z.-R., Lin Y.-K., and Fang J.-Y. *Molecules*. - 2009.- Vol. 14, No. 1.- P.540–554
151. Methods for Obtaining and Determination of Squalene from Natural Sources /Popa O., Bsbeanu N. E., Popa I., Nit S., *BioMed Research International*. - 2015.- Vol. 2015. ID 367202. -P.16

152. Squalene from genus *Centrophorus* shark and its role on human health/ Basak K, Barat S. *NBU J. Anim. Sc.* -2017.-Vol. 11, P. 27-34.
153. Review on some potential plant squalene resources/ Bi L, Zhao Z, Han L, Li D. *Chemistry and Industry of Forest Products* – 2011- Vol. 31, Is.4, P. 103-108.
154. Plant Sources, Extraction Methods, and Uses of Squalene/ Lozano-Grande MA, Goristein S, Espitia-Rangel E, Davila-Ortiz G, Martinez-Ayala AL. *International Journal of Agronomy* -2018-Vol.2018, P.433-438
155. Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy / Reddy H., Couvreur P. *Advanced Drug Delivery Reviews.* – 2009. - V. 61, N 15. - P. 1412–1426.
156. Sterols and squalene in apricot (*Prunus armeniaca* L.) kernel oils: the variety as a key factor/ Rudzińska M, Gyrnaś P., Raczyk M., Soliven A. *Natural Product Research*, -2017-Vol. 31, N.1, P. 84-88.
157. Вивчення складу дифторметанового екстракту, одержаного при комплексній переробці суцвіть липи / Д.В.Дем'яненко, С.В.Бреусова, *Вісник фармації*.-2012.-Т.3,№7.-С.44
158. Terpenoids of *Aristolochia* and their biological activities /Wu Tian-Shung, Damu Amooru G. , Chung-Ren Suand Ping-Chung Kuo , *Nat. Prod. Rep.* – 2004. - V. 21.-P. 594 – 624.
159. Вторичный метаболизм у микроорганизмов, растений и животных. Лукнер М. – Москва: Мир. 1979. – 548 с.
160. Фітохімічне вивчення ліпофільної фракції з листя хмелю звичайного/ С.І. Мазурець С.В., Ковальов, А.М. Рудник . *Запорізький медичний журнал*.- 2012.-№3 -С.72
161. Clionasterol: A Potent Inhibitor of Complement Component C1 / F. Watanadilok, R. Sonchaeng ,et.al, *Planta Med.*- 2003 – Vol.69,N 2. – P 174-176.
162. Дослідження фталатів скабіози голубиної (*Scabiosa columbaria*) / Вінницька Р.Б. *Фарм. журнал.* – 2016. – Т.12 №1. – С. 59 – 63.
163. Дослідження вмісту вуглеводів у плодах маслини багатоквіткової (*Elaeagnus multiflora* L.) та маслини вузьколистої (*Elaeagnus angustifolia* L.) /

Гергель Є. М., Коновалова О. Ю., Джан Т. В., та ін. *Фармацевтичний журнал*. - 2011- № 6., С. 96-98.

164. Методы химии углеводов /под ред. Н.К. Кочеткова – М.: Мир. -1967. – 512 с.

165. Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. рек. / за ред. Стефанова О. В. Київ : Авіцена, 2001. С. 528

166. Вивчення фармакологічної дії мазі з олією аронії чорноплідної /Д.В.Семенів, *Український біофармацевтичний журнал*.-2014.-№. 2.-Р. 31

167. Вивчення ефективності нової мазі на моделі неалергічного контактного дерматиту / Л. В. Яковлєва, О. В. Ткачова , *Клінічна фармація*. - 2010. - № 4. - С.66-70.

168. Експериментальне вивчення токсичної дії потенційних лікарських засобів. Доклінічні дослідження лікарських засобів 206/ Коваленко В. М.: метод. рек. за ред. член–кор. АМН України О. В. Стефанова. Київ : Авіцена, 2001. С. 74–97.

169. Вивчення гострої та хронічної токсичності густого екстракту листя горіха волоського / Т. М. Ковальова, О. Г. Башура, Г. Л. Великоданов , *Клінічна фармація*. - 2002. - № 2. - С. 51-53.

170. ГОСТ 12.1.005-88 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

171. Наказ МОН №400 від 12.05.2010 «Про затвердження Державних санітарних норм та правил "Гігієнічні вимоги до води питної, призначеної для споживання людиною"

172. Наказ МНС № 627 від 22.03.2012 «Про затвердження Вимог до роботодавців щодо захисту працівників від шкідливого впливу хімічних речовин»

173. О классификации токсичности ядов при парентеральных способах введения. / Сидоров К. *Токсикология новых промышленных химических веществ* - 1973-. Вып. 13., С. 47–51.

174. Medicine Pracy/ MaidaA., Chrusaielska K.-1965.-Vol.XXXIV.-P.321-396

175. Про захист тварин від жорстокого поводження : Закон України № 3447-IV. *Відомості Верховної Ради України. Офіц. вид.* 2006. № 27. С. 230.
176. Порядок проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах : Наказ Міністерства освіти, науки, молоді та спорту України № 249 від 01.03.2012. *Офіційний вісник України. Офіц. вид.* 2012. № 24. С. 82.
177. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Страсбург, 18 березня 1986 року.
178. Phytochemical analysis and antibacterial activity on seed and pod extracts of *Crotalaria incana*/ A.A.Mathewos,G.M. Habtamu, E.A.Milkyas , *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*.-2015.-Vol 3,№4.-P.100-108.
179. Антимікотичні властивості похідної карбамінової кислоти/ О.В. Медведь, Л.М. Шкарапута,В.Г. Коляденко, та ін. *Український журнал дерматології, венерології, косметології* -2011- Т. 3, № 42, С. 83-86
180. Визначення антимікробної активності бедринцю ломикаменевого екстракту густого / Е. А. Паращук, Н. І. Ткачук, С. М. Марчишин, Г. Р. Козир, *Фармацевтичний часопис*. -2019.- № 1. С. 104-110.
181. IgE-Sensitization to Cellular and Culture Filtrates of Fungal Extracts in Patients with Atopic Dermatitis/ Dorte Nissen, Lars J Petersen, Robert Esch, Else Svejgaard, Per Stahl Skov, Lars K Poulsen, Hendrik Nolte, *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*,- 1998- Vol. 81, Is. 3, P. 247-255
182. Skin prick testing in atopic eczema: atopic to what and at what age?. /Hon Kl.E., Wang S.S., Wong W.L. et al. *World J Pediatr* -2012-Vol. 8, P.164–168
183. Effects of Natural Products on Contact Dermatitis / Rios J.L., Bas E., Recio M.C., *Current medicinal Chemistry- Anti- Inflammatory and anty- allergy agents* – 2005- Vol. 4, N. 1, P. 65-80
184. Mold Occurring on the Air Cleaner High-Efficiency Particulate Air Filters Used in the Houses of Child Patients with Atopic Dermatitis/ Seong Hwan Kim, Geum Ran Ahn, Seung Yeol Son, Gwi-Nam Bae & Yeo Hong Yun, *Mycobiology*, -2014- Vol. 42, N.3, P. 286-290,

185. Contact dermatitis. Environmental and occupational dermatitis/ Johansen J.D., Aalto-Korte K., Klaus T.A., Magnus A. *European Society of Contact Dermatitis guideline for diagnostic patch testing – recommendations on best practice*. -2015.- Vol. 201573,N.4, P.195-221
186. Occupational Contact Dermatitis to Penicillium molds on Salami Skin/ Wantke F., Simon-Nobbe B., Poll V., et al *Jornal of allergy and clinical immunology*.- 2011.- Vol. 127, No 2.21-26
187. Anatomical structure of the stem and leaf of *Daphne glomerata* Lam./ K. Mchedlidze, M. Churadze, J. Aneli, et al. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* - 2019.- Vol.8, N.4, P. 3241-3244
188. Вміст свинцю та кадмію в лікарських рослинах Житомирського Полісся / Ю. А. Білявський, *Вісник Житомирського національного агроекологічного університету* - 2012. - № 2(1). - С. 44-55.
189. Визначення селену в індикаторних рослинах та кормах методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії з електро-термічною атомізацією/ Д.В. Янович, Є.Г. Заріцька А. В. Галабурда , *Науково-технічний бюлетень Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок і інституту біології тварин*, -2015-, вип. 16, № 2, С. 423-429.
190. Фармацевтична енциклопедія. – Київ: МОРІОН. – 2010. 1632 с.
191. Pure linoleate deficiency in rat; influence on growth, accumulation of n-6 polyunsaturates and linileat oxidation/ Cunnane S, Anderson M. *J Lipid Res* -1997- Vol.38, N4, P. 805–12.
192. Both (n-3) and (n-6) fatty acids stimulate wound healing in the rat intestinal epithelial cel line, IEC-6 / Ruthig DJ, Meckling-Gill KA. *Journal of Nutrition*- 1999- Vol 129,N10, P 1791–1798
193. β -амирингексадеканат из *Arthenocissus quinquefolia* как ингибитор трипсина /ЧистоходоваН.А., Живирага И., Нгуен Ч., Майлс Г. Д., УжеговаН. А., Солодников С.Ю. *Химико-фармацевтический журнал*. – 2002. – т.36, №5.- С. 23 – 25.

194. The biological action of saponins in animal systems: a review /Francis G., Kerem Z., Makkar H. P. S., Becker K.*Br. J. Nutr.*— 2002.— V. 88.— C. 587–605
195. Saponins; a ubiquitous phytochemical : a review of its biochemical, physiological and pharmacological effects Soetan K.O., AjibadeT.O., Akinrinde A.S / *Recent Prog. Med. Plants.*- 2014. - Vol. 44. - P. 439 -463

ДОДАТКИ
Додаток А
Список опублікованих праць
Список опублікованих праць за темою дисертації

15. The lectin of the bark of European spindle (*Euonymus europaeus* L.): purification, physico-chemical characteristics and application in histochemical studies/ Vruble O. R., Sogomonian E. A., Antonyuk V. O. *Biopolymers and Cell*. 2020. V. 36. N 1. P. 3–13. (Особистий внесок - підготовка сировини, проведення експериментальних досліджень, участь у обробці результатів).

16. Комплексне використання кори бруслини європейської (*Euonymus europaea* L.). Дослідження ліпофільних речовин / О. Р. Врубель, А. Р. Зинь, В. О. Антонюк. *Фармацевтичний журнал*. 2016. Т. 6. С. 79-87 (Особистий внесок – підготовка зразків для аналізу, проведення експериментальних досліджень, участь у обробці результатів та підготовці тексту статті).

17. Дослідження ліпофільних речовин листків та квітів бруслини європейської (*Euonymus europaea* L.) / О. Р. Врубель, А. Р. Зинь, В. О. Антонюк . *Фармацевтичний журнал*. 2019. Т. 2. С. 73-79. (Особистий внесок – підготовка зразків для аналізу, проведення експериментальних досліджень, участь у обробці результатів та підготовці тексту статті).

18. Investigation of the chemical composition and efficiency of seed oil of spindle tree (*Euonymus europaea* L.) on the model of non-allergic dermatitis/Vruble O., Nektegaev I., Antonyuk V. *EUREKA: Health Sciences*. 2018. N 3. P. 45 – 54. (Особистий внесок – підготовка зразків для аналізу, проведення частини експериментальних досліджень, участь у обробці результатів та підготовці тексту статті).

19. Identification and quantification of squalene in Europaeen spindle seed oil (*Euonymus europaeus* L.) by optimized high performance liquid chromatography (HPLC) procedure / O. Vruble, O. Korobova, S. Humenyuk , V. Antonyuk. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2019, V.8, N.5, P. 1722-1726. (Особистий внесок – підготовка зразків для аналізу, проведення частини експериментальних досліджень, участь у обробці результатів та підготовка тексту статті).

20. Morphological and anatomical study of the bark, leaves and seeds of *Euonymus europaeus* L. / Vruble OR, Darmohray RYE and Antonyk VO. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2020. V. 9, N.1, P. 1297-1299. (Особистий внесок – підготовка зразків для аналізу, проведення частини експериментальних досліджень, участь у обробці результатів та підготовка тексту статті).

21. Спосіб одержання лектину бруслини європейської (*Euonymus europaea* L.): пат. 59331 на корисну модель Україна: МПК А61К 36/00 С07К 1/00 № u 201012857; заявл. 29.10. 2010 року, опубл. 10.05.2011 р. Бюл. №9, (Особистий внесок - проведення експериментальних досліджень, здійснення патентного пошуку).

22. Врубель О.Р., Дармограй Р.Є. Види роду *Euonymus* L. Як перспективні джерела нових видів біологічно активних речовин . *Хімія природних сполук* : матеріали Всеукраїнської наук.-практ. конф., 21–22.04. 2016 р. Тернопіль, 2016. С. 48. (Особистий внесок- огляд літературних даних, узагальнення даних та підготовка до оформлення тез)

23. Врубель О.Р, Антонюк В.О. Визначення вмісту каротиноїдів та токоферолів в олії насіння бруслини європейської (*Euonymus europaea* L.) *Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження*: матеріали інтернет-конференції, 5.04.2018. м. Харків, 2018 -С. 30. (Особистий внесок-проведення експериментальних досліджень, участь у обробці результатів).

24. Антонюк В., Врубель О. Дармограй Р., Спосіб одержання хітизв'язуючих білків кори бруслини європейської (*Euonymus europaeus* L.) *Проблеми та перспективи розвитку сучасної науки в країнах Європи та Азії*: матеріали XXVI Міжнародної науково-практичної інтернет - конференції, 30.04.2020, Переяслав - Хмельницький, 2020, С. 23 - 28. (Особистий внесок-проведення експериментальних досліджень, участь у обробці результатів).

25. Vruble O., Antonyuk V. Obtaining and researching the effectiveness of spindle tree (*Euonymus europaea* L.) oil on non-allergic contact dermatitis 7th *International Weigl conference*: theses. 26-29.09.2017 Lviv, 2017. P. 104. (Особистий

внесок-проведення частини експериментальних досліджень, участь у обробці результатів та підготовці тез до друку).

26. Врубель О. Р., Антонюк В.О. Одержання лектинів з кори бруслини європейської *Фармація XXI століття: тенденції та перспективи*: матеріали VIII Національного з'їзду фармацевтів України 13.09-16.09 2016, Київ, 2016, С.54. (Особистий внесок-проведення експериментальних досліджень, участь у обробці результатів та підготовка тез до друку).

27. Кушак О., Цивінська М., Антонюк В. Дослідження жирної олії насіння бруслини європейської *Фармакологія та лікарська токсикологія*: матеріали IV Національного з'їзду фармакологів України. 10-12.10.2011, Київ-2011, С.184. (Особистий внесок-проведення експериментальних досліджень, оформлення тез до друку).

28. Врубель О.Р., Антонюк В.О., Дармограй Р.Є. Дослідження складу олії насіння бруслини європейської (*Eupytis eugoraeus* L.) *Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини та фармації*: матеріали II Науково-практичної конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю, 15.05. 2020. м.Харків, 2020. С.46. (Особистий внесок-проведення експериментальних досліджень, участь у обробці результатів, оформлення тез до друку).

ДОДАТОК Б

Затверджено:
на зборі НВК "Лектинотест"
протокол № 13.05.2020 р.
Голова Зборів проф. Білий Р.О.



Лабораторний регламент одержання лектину з кори бруслини європейської (*Euonymus europaeus* L.)

Розробник:
аспірант каф. фармакогнозії
і ботаніки ЛНМУ
_____ Врубель О.Р.

Регламент є власністю Науково-виробничого кооперативу "Лектинотест" і не може бути повністю або частково відтворений, тиражований, розповсюджений без дозволу НВК "Лектинотест", м. Львів



ДОДАТОК Г

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМ. ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО

«Затверджую»
 Ректор Львівського національного медичного університету
 ім. Данила Галицького
 академік НАМН України
 професор Б.С.Зіменковський
 » _____ 2021р.

ПРОЄКТ МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

Бруслини європейської насіння
Euopium europaea L. semen

Термін введення встановлено з

3. Ідентифікація.

3.1 Реакція гемаглютинації.

Сировину подрібнюють до розмірів частинок діаметром менше 0,5 мм, поміщають у посудину з мішалкою, екстрагують 0,9 – 1 % розчином хлориду натрію при перемішуванні не менше 60 хв у співвідношенні сировина: екстрагент 1: 5 - 8.

Реакцію гемаглютинації проводять з використанням відмитої від сироватки крові 2% суспензії еритроцитів людини О, А та В груп та тварин різних видів у забуференому фізіологічному розчині. До серії послідовних двократних розведень у мікропробірках екстракту, додавали 2 %-ну суспензію еритроцитів у забуференому фізіологічному розчині і після 10-ти хвилинної інкубації пробірки центрифугували 30 секунд при 500g і результат аглютинації спостерігали візуально (неозброєним оком). Аглютинація (позитивний результат) характеризується утворенням згустка еритроцитів, який не розпадається при обережному збовтуванні пробірки; при відсутності ж аглютинації еритроцити при збовтуванні підіймаються з дна пробірки кожен окремо, без утворення згустка (негативний результат).

4. Кількісне визначення.

4.1 Кількісне визначення проводять гравіметричним методом.

5,0 г подрібненого насіння поміщають у круглодонну колбу місткістю 10 мл, додають 50 мл гексану, нагрівають зі зворотним холодильником протягом 60 хв, охолоджують і фільтрують в іншу, попередньо зважену круглодонну колбу. Залишок у першій колбі промивають 25 мл гексану, змиви фільтрують у ту саму зважену колбу, одержаний екстракт випарюють до видалення розчинника. Круглодонну колбу із жирною олією висушують у сушильній шафі до постійної маси.

Вміст жирної олії, у відсотках, у перерахунку на суху сировину, обчислюють за формулою:

$$X = \frac{m \times 100 \times 100}{m_1 \times (100 - W)}$$

де m- маса жирної олії, г;

m₁-маса наважки випробовуваної сировини, г;

W- втрата в масі при висушуванні, %.

Упаковка.

По 15 кг в мішки або в тюки по 40 кг ГОСТ 17768-90. На етикетці зазначають назву сировини українською та латинською мовами, масу сировини нетто, умови зберігання, номер партії, термін придатності.

Групова і транспортна тара відповідно до ГОСТ 17768-90.

Транспортування. Відповідно до ГОСТ 17768-90.

Зберігання. Відповідно до ГОСТ 6077-80 і ГОСТ 17768-90. У сухому, захищеному від світла місці не вище 25 °С.

Термін придатності. 2 роки.

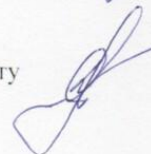
Розробники:

Аспірант кафедри фармакогнозії і ботаніки
Львівського національного медичного університету
імені Данила Галицького



О. Р. Врубель

Доцент кафедри фармакогнозії і ботаніки
Львівського національного медичного університету
імені Данила Галицького, канд. фарм. наук



Р. Є. Дармограй

ДОДАТОК Д

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМ. ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО

Найменування показника	Допустимі норми	Методи
Ідентифікація <i>A. Опис</i>	Олія є прозорою, без сторонніх домішок, запаху, смаку.	«Затверджую» Ректор Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького академік НАМН України професор Б.С.Зіменковський
В. Розчинність	Не менше 100% розчиняється в 100 частинках розчинника.	МКЯ, п.2; ДФУ, п.1.4
С. ТНХ	На хроматограмі випробовуваного	МКЯ, п.3; ДФУ, п.2.3.2
ПРОЕКТ МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ Бруслини європейської олія насіння Euonymi europaea L. semenі oleum		
Випробування		МКЯ, п.4
Розчинники	Не більше 0,001 % (10ppm) гексану Р	ДФУ, 2.4.24; 2.2.28
Мікробіологічна чистота	Допускається наявність не більше 10^3 КУО/г або КУО/мл аеробних мікробіологічних та не більше 10^2 КУО/г або КУО/мл дріжджових та плісневих грибів	ДФУ, п. 5.1.4; 2.6.12
Кількісне визначення	Каротиноїди не менше 26	Термін введення встановлено з «___» _____ 2021р.

Продовження додатка Д

Транспортування. Відповідно до ГОСТ 17768-90.

Зберігання. Відповідно до ГОСТ 6077-80 і ГОСТ 17768-90. У сухому, захищеному від світла місці не вище 25 °С.

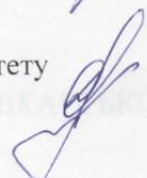
Термін придатності. 2 роки.

Розробники:

Аспірант кафедри фармакогнозії і ботаніки
Львівського національного медичного університету
імені Данила Галицького

 О. Р. Врубель

Доцент кафедри фармакогнозії і ботаніки
Львівського національного медичного університету
імені Данила Галицького, канд. фарм. наук

 Р.С.Дармограй

Бруславин європейської олії насіння
Euphrasii europaea L. semenі oleum

Термін введення встановлено з

«...» ... 2021р.

ДОДАТОК Е



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Ректор Львівського національного
медичного університету
імені Данила Галицького
акад. НАМН України,
проф. Б.С.Зіменковський
» _____ 2021р.

ІНСТРУКЦІЯ ІЗ ЗАГОТІВЛІ ТА СУШІННЯ КОРИ БРУСЛИНИ ЄВРОПЕЙСЬКОЇ

Бруслина європейська (*Euonymus europaea* L.) родини Бруслинові (*Celastraceae*) - кущ, рідше дерево 2-5 м висоти. Гілки тупо чотиригранні з буруватими опробковілими ребрами, пізніше сірувато-бурі. Бруньки невеликі, яйцевидно-конічні; листки черешкові (черешок 2-16 мм довжини), продовгувато-еліптичні або обернено-яйцеподібні, рідше широко-яйцеподібні 1,5-7 (до 11) см довжини, найширші по-середині ідещо вище 1-4 (до 6) см ширини, на кінці заокруглені, за виключенням нижніх листків, рівномірно-пилчасті з гачкоподібними зубцями, злегка шкірясті, зверху голі, знизу по жилках короткоопушені. Квіти зібрані в півзонтики, які є звичайно з недорозвиненою середньою квіткою, в 2-3 рази коротші за квітоніжки; чашечка широкояйцевидна з тупими долями, в 2 рази коротша за пелюстки; пелюстки лопатчасто-продовгуваті, жовтувато-зелені, тупі, по загнутому краю війчасті, тичинки з нитками 1,5 мм довжини та з жовтуватими пильниками; зав'язь тупоконічна, гола, стовпчики майже циліндричні, коротші за тичинки; коробочка поникла, грушовидної форми, на кінці вдавнена, помітно чотирилопатева 7-13 мм довжини, гладка, гола, недозріла – зелена, дозріла – яскравопурпурова. Насінина розміщені по одній в гнізді, обернено-яйцеподібні, білуваті, цілком одягнуті в оранжевий принасіник, разом з яким до 10 мм довжини. Цвіте в травні-червні, плодоносить в серпні-вересні.

Бруслина європейська проростає у світлих лісах, переважно дубових та соснових, зазвичай на узліссях та чагарниках, в тінистих ярах, іноді біля житла по всій території України,

У якості сировини використовується кора бруслини європейської - зовнішня, розташована до периферії від камбію, частина пагонів. Кора зеленого кольору із опробковілими ребрами сірого або сіро-бурого кольорів, із внутрішньої сторони – біла, волокниста.

Продовження додатка Е

Заготівлю насіння бруслини європейської проводять у період повного дозрівання плодів (вересень - жовтень). Рекомендовано проводити заготівлю із рослин, які проростають на сонячних ділянках, подалі від великих автошляхів та територій, забруднених відходами підприємств. Насіння збирають у суху погоду. Насіння збирають вручну або шляхом обтрушування пагонів кущів. При первинній обробці насіння відділяють від малинових оплоднів. Перед сушінням проводять видалення сторонніх домішок органічного походження.

Диференціацію від насіння близького виду бруслини бородавчастої (*Eupytus verrucosa Scop.*) проводять за зовнішнім виглядом. У бруслини бородавчастої насінини фіолетового кольору, лише частково вкриті принасінником, на відміну від насіння бруслини європейської, яке є білим, повністю вкриті принасінником.

Сушіння насіння проводять на сонці або під навісами, а також у сушильних приміщеннях з підігрівом при температурі не вище 50°C. Вихід повітряно-сухої сировини 30-50%.

Відповідно до МКЯ « Бруслини європейської насіння » сировина складається із цілих або подрібнених насінин без оплодня. Числові показники доброякісності сировини : втрата в масі при висушуванні- не більше 10%, зола загальна- не більше 5%, сторонні домішки- не більше 2%.

Готову сировину упаковують у мішки по 15 кг. Зберігають на стелажах в сухому, прохолодному, затемненому, добре провітрюваному приміщенні при температурі не вище +25°C і вологості не вище 80%. Термін придатності сировини 3 роки.

Насіння бруслини європейської використовують для отримання лектину та жирної олії, яка виявляє протизапальну та ранозагоювальну дію

Аспірант кафедри фармакогнозії та ботаніки
Львівського національного медичного
університету ім. Данила Галицького



Врубель О.Р.

Доцент кафедри фармакогнозії і ботаніки
Львівського національного
медичного університету
ім. Данила Галицького, канд. фарм. наук,



доц. Дармограй Р.С

Завідувач кафедри фармакогнозії і ботаніки
Львівського національного медичного
університету ім. Данила Галицького
канд. фарм. наук,



доц. Шаповалова Н.В.

ДОДАТОК Є

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Ректор Львівського національного
медичного університету
імені Данила Галицького
акад. НАМН України,
проф. Б.С.Зіменковський



«__» _____ 2021р.

ІНСТРУКЦІЯ ІЗ ЗАГОТІВЛІ ТА СУШІННЯ НАСІННЯ БРУСЛИНИ ЄВРОПЕЙСЬКОЇ

Бруслина європейська (*Euonymus europaea* L.) родини Бруслинові (*Celastraceae*) - кущ, рідше дерево 2-5 м висоти. Гілки тупо чотиригранні з буруватими опробковілими ребрами, пізніше сірувато-бурі. Бруньки невеликі, яйцевидно-конічні; листки черешкові (черешок 2-16 мм довжини), продовгувато-еліптичні або обернено-яйцеподібні, рідше широко-яйцеподібні 1,5-7 (до 11) см довжини, найширші по-середині ідещо вище 1-4 (до 6) см ширини, на кінці заокруглені, за виключенням нижніх листків, рівномірно-пилчасті з гачкоподібними зубцями, злегка шкірясті, зверху голі, знизу по жилках короткоопушені. Квіти зібрані в півзонтики, які є звичайно з недорозвиненою середньою квіткою, в 2-3 рази коротші за квітоніжки; чашечка широкояйцевидна з тупими долями, в 2 рази коротша за пелюстки; пелюстки лопатчасто-продовгуваті, жовтувато-зелені, тупі, по загнутому краю війчасті, тичинки з нитками 1,5 мм довжини та з жовтуватими пильниками; зав'язь тупоконічна, гола, стовпчики майже циліндричні, коротші за тичинки; коробочка поникла, грушовидної форми, на кінці вдавнена, помітно чотирилопатева 7-13 мм довжини, гладка, гола, недозріла – зелена, дозріла – яскравопурпурова. Насінини розміщені по одній в гнізді, оберненояйцеподібні, білуваті, цілком одягнуті в оранжевий принасінник, разом з яким до 10 мм довжини. Цвіте в травні-червні, плодоносить в серпні-вересні.

Бруслина європейська проростає у світлих лісах, переважно дубових та соснових, зазвичай на узліссях та чагарниках, в тінистих ярах, іноді біля житла по всій території України.

В якості лікарської рослинної сировини використовують насіння бруслини європейської, відділене від малинового оплодня. Насінина біла, зверху вона повністю вкрита помаранчевим арилусом (принасінником).

Продовження додатка Є

Заготівлю насіння бруслини європейської проводять у період повного дозрівання плодів (вересень - жовтень). Рекомендовано проводити заготівлю із рослин, які проростають на сонячних ділянках, подалі від великих автошляхів та територій, забруднених відходами підприємств. Насіння збирають у суху погоду. Насіння збирають вручну або шляхом обтрушування пагонів кущів. При первинній обробці насіння відділяють від малинових оплоднів. Перед сушінням проводять видалення сторонніх домішок органічного походження.

Диференціацію від насіння близького виду бруслини бородавчастої (*Euonymus verrucosa Scop.*) проводять за зовнішнім виглядом. У бруслини бородавчастої насінини фіолетового кольору, лише частково вкриті принасінником, на відміну від насіння бруслини європейської, яке є білим, повністю вкриті принасінником.

Сушіння насіння проводять на сонці або під навісами, а також у сушильних приміщеннях з підігрівом при температурі не вище 50°C. Вихід повітряно-сухої сировини 30-50%.

Відповідно до МКЯ «Бруслини європейської насіння» сировина складається із цілих або подрібнених насінин без оплодня. Числові показники доброякісності сировини: втрата в масі при висушуванні - не більше 10%, зола загальна - не більше 5%, сторонні домішки - не більше 2%.

Готову сировину упаковують у мішки по 15 кг. Зберігають на стелажах в сухому, прохолодному, затемненому, добре провітрюваному приміщенні при температурі не вище +25°C і вологості не вище 80%. Термін придатності сировини 3 роки.

Насіння бруслини європейської використовують для отримання лектину та жирної олії, яка виявляє протизапальну та ранозагоювальну дію

Аспірант кафедри фармакогнозії та ботаніки
Львівського національного медичного
університету ім. Данила Галицького



Врубель О.Р.

Доцент кафедри фармакогнозії і ботаніки
Львівського національного
медичного університету
ім. Данила Галицького, канд. фарм. наук,



доц. Дармограй Р.Є

Завідувач кафедри фармакогнозії і ботаніки
Львівського національного медичного
університету ім. Данила Галицького
канд. фарм. наук,



доц. Шаповалова Н.В.

ДОДАТОК Ж



«Затверджую»

Проректор з науково-дослідної роботи

./проф. Луцик О.Д./

« 24 » « травня » 2011р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції для впровадження: Кон'югати лектинів з пероксидазою, одержані з кори та насіння бруслини європейської

2. Установа, автор: Львівський національний медичний університет, кафедра фармакогнозії та ботаніки - Кушак О.Р.

3. Джерела інформації: 1. Патент на корисну модель. Україна, МПК А61К9/06, . Спосіб одержання лектину бруслини європейської (*Euonymus europaea*) / Кушак О.Р. Согомоян Є.А., Антонюк В.О.; заявник і патентовласник - Кушак О.Р. Согомоян Є.А., Антонюк В.О - № u 2010 12857 ; заявл. 29.10.2010 ; позитивне рішення на видачу патенту №6266/ЗУ/11 від 1.04.2011 р.

4. Де впроваджено: Кафедра гістології, цитології та ембріології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького

5. Форма впровадження: при виконанні наукових досліджень.

6. Ефект від впровадження: використано при виконанні дисертаційної роботи Согомоян Є.А., яка була успішно захищена 12.05. 2011 року .

7. Строки впровадження: 2009-2010 навч. рік.

Зав. кафедрою
Гістології, цитології та ембріології
Професор

Луцик О. Д.

«Затверджую»
Проректор з наукової роботи та інновацій
Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця
д-м.н., проф. Земсков С.І.

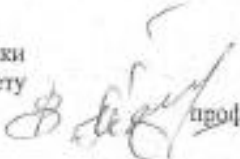


» 2021

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** результати вивчення біологічно активних речовин бруслини європейської (*Euonymus europaea* L.)
 2. **Установа, автор:** Львівський національний медичний університет ім. Д. Галицького, м. Львів, вул. Пекарська 69, кафедра фармакогнозії і ботаніки, Врубел О.Р., Дармограй Р.С.
 3. **Джерела інформації:**
 1. Vrubel O., Nektegaev I., Antonyuk V. Investigation of the chemical composition and efficiency of seed oil of spindle tree (*Euonymus europaea* L.) on the model of non-allergic dermatitis// EUREKA: Health Sciences. – 2018. – N 3. – p. 45 – 54.
 2. Врубел О. Р., Зинь А. Р., Антонюк В. О. Дослідження ліпофільних речовин листків та квітів бруслини європейської (*Euonymus europaea* L.)// Фармацевтичний журнал. - 2019. - № 2. - С. 73-79.
 3. Врубел О. Р., Зинь А. Р., Антонюк В. О. Комплексне використання кори бруслини європейської (*Euonymus europaea* L.). Дослідження ліпофільних речовин// Фармацевтичний журнал. - 2016. - № 6. - С. 79-87
 4. Vrubel O.R., Dartmohray R.YE., Antonyuk V.O. Morphological and anatomical study of the bark, leaves and seeds of *Euonymus europaeus* L. //Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. -2020.- 9(1), P 1297-1299.
 5. Vrubel O. R., Sogomonian E. A., Antonyuk V. O. The lectin of the bark of European spindle (*Euonymus europaeus* L.): purification, physico-chemical characteristics and application in histochemical studies // Biopolymers and Cell. -2020. -Vol. 36. N 1. P 3-13.
 6. Патент на корисну модель України № 59331 від 10.05.2011 р. Спосіб одержання лектину бруслини європейської (*Euonymus europaea* L.)./ Кушак О. Р., Согомонян С.А., Антонюк В.О./ Бюлл. №9, 2011 р., Заявка № u 201012857 від 29 жовтня 2010 року.
 4. **Де впроваджено:** кафедра фармакогнозії та ботаніки Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця
 5. **Форма впровадження:** навчальний процес і наукова робота кафедри фармакогнозії та ботаніки Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця
 6. **Ефект від впровадження:** поглиблення знань студентів з питань хімічного складу, фармакологічної активності та перспектив використання в медицині біологічно активних речовин бруслини європейської.
 7. **Терміни впровадження:** 2020-2021 навчальний рік
- Розглянуто і затверджено на засіданні кафедри фармакогнозії та ботаніки (протокол №13 від 3.02.2021р.)

Зав. кафедри фармакогнозії та ботаніки
Національного медичного університету
ім. О.О. Богомольця



проф. Мінарченко В.М.



«Затверджую»

Проректор з науково-педагогічної роботи
Національного фармацевтичного університету
Проф. І.М. Владимирова

2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- 1. Найменування пропозиції для впровадження:** результати вивчення біологічно активних речовин бруслини європейської (*Euonymus europaea* L.).
- 2. Установа, автор:** Львівський національний медичний університет ім. Д. Галицького, м. Львів, вул. Пекарська 69, кафедра фармакогнозії і ботаніки, Врубель О.Р., Дармограй Р.Є.
- 3. Джерела інформації:**
 1. Vrubel O., Nektegaev I., Antonyuk V. Investigation of the chemical composition and efficiency of seed oil of spindle tree (*Euonymus europaea* L.) on the model of non-allergic dermatitis // EUREKA: Health Sciences. – 2018. – N 3. – p. 45 – 54.
 2. Vrubel, O. R., Zin, A. R., Antonyuk, V. O. Investigation of lipophilic substances of the leaves and flowers of spindle tree (*Euonymus europaea* L.)// Фармацевтичний журнал-2019.- №2, С.73-80.
 3. Vrubel O. R., Sogomonian E. A., Antonyuk V. O. The lectin of the bark of European spindle (*Euonymus europaeus* L.): purification, physico-chemical characteristics and application in histochemical studies// Biopolymers and Cell. - 2020.- Vol. 36, N 1.- P 3–13.
 4. Патент на корисну модель України № 59331 від 10.05.2011 р Спосіб одержання лектину бруслини європейської (*Euonymus europaea* L.)/ Кушак О. Р., Согомонян Е.А., Антонюк В.О./ Бюлл. №9, 2011 р., Заявка № u 201012857 від 29 жовтня 2010 р
- 4. Де впроваджено:** кафедра фармакогнозії Національного фармацевтичного університету
- 5. Форма впровадження:** навчальний процес і наукова робота кафедри фармакогнозії Національного фармацевтичного університету
- 6. Ефект від впровадження:** поглиблення знань студентів з питань хімічного складу, фармакологічної активності та перспектив використання в медицині біологічно активних речовин бруслини європейської.
- 7. Терміни впровадження:** 2020-2021 навчальний рік
Розглянуто і затверджено на засіданні кафедри фармакогнозії (протокол № 4 від 5.11.2020р.)

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри фармакогнозії

Національного фармацевтичного університету
професор

О.М. Кошовий



«Затверджую»

Проректор із науково-педагогічної роботи
Національного фармацевтичного університету
проф. Владимирова І. М.
" _____ 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** результати вивчення біологічно активних речовин бруслини європейської (*Euonymus europaea* L.)
2. **Установа, автор:** Львівський національний медичний університет ім. Д. Галицького, м. Львів, вул. Пекарська 69, кафедра фармакогнозії і ботаніки, Врубель О.Р., Дармограй Р.Є.
3. **Джерела інформації:**
 1. Vrubel O., Nektegaev I., Antonyuk V. Investigation of the chemical composition and efficiency of seed oil of spindle tree (*Euonymus europaea* L.) on the model of non-allergic dermatitis. EUREKA: Health Sciences. 2018. N 3. p. 45 – 54.
 2. Врубель О. Р., Зинь А. Р., Антонюк В. О. Дослідження ліпофільних речовин листків та квітів бруслини європейської (*Euonymus europaea* L.) Фармацевтичний журнал. 2019. № 2. С. 73-79.
 3. Врубель О. Р., Зинь А. Р., Антонюк В. О. Комплексне використання кори бруслини європейської (*Euonymus europaea* L.). Дослідження ліпофільних речовин. Фармацевтичний журнал. 2016. № 6. С. 79-87
 4. Vrubel O.R., Darmohray R.YE., Antonyuk V.O. Morphological and anatomical study of the bark, leaves and seeds of *Euonymus europaeus* L. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 2020. №9(1). P 1297-1299.
 5. Vrubel O. R., Sogomonian E. A., Antonyuk V. O. The lectin of the bark of European spindle (*Euonymus europaeus* L.): purification, physico-chemical characteristics and application in histochemical studies. Biopolymers and Cell. 2020. Vol. 36, N 1. P 3-13.
 6. Патент на корисну модель України № 59331 від 10.05.2011 р. Спосіб одержання лектину бруслини європейської (*Euonymus europaea* L.) / Кушак О. Р., Согомонян Є.А., Антонюк В.О. / Бюлл. №9, 2011 р., Заявка № u 201012857 від 29 жовтня 2010 року.
4. **Де впроваджено:** кафедра хімії природних сполук і нутриціології Національного фармацевтичного університету
5. **Форма впровадження:** навчальний процес і наукова робота кафедри хімії природних сполук і нутриціології Національного фармацевтичного університету
6. **Ефект від впровадження:** поглиблення знань студентів з питань хімічного складу, фармакологічної активності та перспектив використання в медицині біологічно активних речовин бруслини європейської.
7. **Терміни впровадження:** 2020-2021 навчальний рік.
Розглянуто і затверджено на засіданні кафедри хімії природних сполук і нутриціології (протокол № 10 від 06.10.2020 р.)

Зав. кафедри хімії природних сполук НФаУ,
д. фар. ац. н., професор

 В. С. Кисличенко

Відповідальний за впровадження:
к. фарм. н., доцент кафедри хімії
природних сполук НФаУ,

 О. М. Новосел



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** результати вивчення біологічно активних речовин бруслини європейської (*Euonymus europaea* L.)
2. **Установа, автор:** Львівський національний медичний університет ім. Д. Галицького, м. Львів, вул. Пекарська 69, кафедра фармакогнозії і ботаніки, Врубель О.Р., Дармограй Р.С.
3. **Джерела інформації:**
 1. Vrubel O., Nektegaev L., Antonyuk V. Investigation of the chemical composition and efficiency of seed oil of spindle tree (*Euonymus europaea* L.) on the model of non-allergic dermatitis// EUREKA: Health Sciences. – 2018. – N 3. – p. 45 – 54.
 2. Врубель О. Р., Зинь А. Р., Антонюк В. О. Дослідження ліпофільних речовин листків та квітів бруслини європейської (*Euonymus europaea* L.)// Фармацевтичний журнал. - 2019. - № 2. - С. 73-79.
 3. Врубель О. Р., Зинь А. Р., Антонюк В. О. Комплексне використання кори бруслини європейської (*Euonymus europaea* L.). Дослідження ліпофільних речовин// Фармацевтичний журнал. - 2016. - № 6. - С. 79-87
 4. Vrubel O.R., Darmohray R.YE., Antonyk V.O. Morphological and anatomical study of the bark, leaves and seeds of *Euonymus europaeus* L. //Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. -2020.- 9(1), P 1297-1299.
 5. Vrubel O. R., Sogomonian E. A., Antonyuk V. O. The lectin of the bark of European spindle (*Euonymus europaeus* L.); purification, physico-chemical characteristics and application in histochemical studies // Biopolymers and Cell. -2020. -Vol. 36, N 1, P 3–13.
 6. Патент на корисну модель України № 59331 від 10.05.2011 р. Спосіб одержання лектину бруслини європейської (*Euonymus europaea* L.). Кушак О. Р., Согомонян Є. А., Антонюк В. О./ Бюл., №9, 2011 р., Заявка № u 201012857 від 29 жовтня 2010 року.
4. **Де впроваджено:** кафедра фармацевтичної ботаніки та фармакогнозії Буковинського державного медичного університету