

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

ВРУБЕЛЬ ОЛЬГА РОМАНІВНА

УДК 615.011:615.322:582.688.31:616.5

**ФАРМАКОГНОСТИЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ БРУСЛИНИ ЄВРОПЕЙСЬКОЇ
(*EUONYMUS EUROPAEA L.*)**

15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фармацевтичних наук

Львів – 2021

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі фармакогнозії і ботаніки Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького МОЗ України

Науковий керівник: кандидат фармацевтичних наук, доцент
Дармограй Роман Євдокимович,
Львівський національний медичний університет
імені Данила Галицького,
доцент кафедри фармакогнозії і ботаніки

Офіційні опоненти: доктор фармацевтичних наук, професор
Грицик Андрій Романович,
Івано-Франківський національний
медичний університет,
завідувач кафедри фармації

доктор фармацевтичних наук, професор
Коновалова Олена Юріївна,
Київський медичний університет,
завідувач кафедри фармацевтичної і
біологічної хімії, фармакогнозії

Захист відбудеться «12» травня 2021 року о 10 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 35.600.02 при Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького за адресою: 79010, м. Львів, вул. Пекарська, 69.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (79000, м. Львів, вул. Січових Стрільців, 6).

Автореферат розісланий «9» квітня 2021 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

І. В. Драпак

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

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 засобів є представники роду Бруслина (*Euonymus* L.), які здавна використовують в народній медицині як рослини 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 гутапєрчі, 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 антиоксидантну, 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 сесквітерпєнових 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, вивчення 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 б. 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 б. 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. europaе* 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 вискоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), газової хроматографії з мас-спектрометрією (ГХ-МС) та імунохімічних реакцій (реакція

гематоглітинації та пригнічення гематоглітинації) 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 гелі-хроматографії, ліофільного висушування. Здійснено порівняльний аналіз лектинів, виділених з кори та насіння рослини. Встановлено ідентичність одержаних лектинів із застосуванням 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 високоефективної 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 обліпіхи.

Новизну досліджень підтверджено та захищено патентом України на корисну модель «Спосіб одержання лектину бруслини європейської (*Euonymus 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. Зарезультатами дисертаційної роботи розроблено «Лабораторний регламент одержання лектину з кори бруслини європейської (*Euonymus europaeus* L.)», який використовують в практичній роботі НВК «Лектинотест».

Насіння б. європейської запропоновано у якості нового виду ЛРС як джерела біологічно активної субстанції – жирної олії, опрацьовано критерії та параметри її стандартизації, підготовлено проєкти 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. Визначені морфолого-анатомічні особливості будови листя, кори та насіння досліджуваної рослини та розроблено проекти МКЯ на нові перспективні види ЛРС та субстанції, одержані із них. Обґрунтовано технологію спільного одержання лектинів та ліпофільних сполук із кори та насіння б. 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., Согомонян Є. А., Цивінською М. П.

Апробація результатів досліджень. Основні результати дисертаційної роботи викладено та обговорено на Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Хімія природних сполук» (Тернопіль, 2016); VIII Національному з'їзді фармацевтів України (Київ, 2016); 7-й 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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Ботанічна характеристика, хімічний склад, фармакологічні властивості бруслини європейської (*Euonymus europaea* L.) (огляд літератури)

Проведено детальний аналіз джерел літератури щодо систематичного положення, морфологічних особливостей, географічного поширення, стану природних ресурсів та культивування, хімічного складу і використання б. європейської в медицині та фармації. Наявність у даної рослини широкого спектру БАР, різнобічної фармакологічної активності, недостатнє їх фітохімічне та фармакологічне дослідження створюють передумови для комплексного вивчення субстанцій, одержаних із б. європейської, з метою створення на основі їх БАР нових лікарських засобів.

Об'єкти та методи дослідження

При дослідженні лектинів кори та насіння використовували наступні методи: імунохімічні (реакція гемаглютинації та пригнічення гемаглютинації), методи препаративної хімії білків (екстракція, осадження, діаліз, центрифугування, афінна, іонообмінна та гель-хроматографія, ліофільне висушування), аналітичні (виявлення та кількісне визначення білків і вуглеводів, електрофорез та диск-електрофорез в поліакриламідному гелі, УФ- спектроскопія).

При дослідженні жирної олії, яку одержували екстракційним методом, як етап незжирення насіння рослини перед отриманням лектину, було використано: фармакопейні методи визначення числових показників (кислотного, йодного, ефірного чисел, числа омилення), газову хроматографію для визначення жирно-кислотного складу, спектральні методи (спектрофотометрія, ГХ-МС, ВЕРХ) – для ідентифікації та кількісного визначення складу БАР.

Хроматографічне розділення суміші речовин проводили за допомогою колонкової рідинно-адсорбційної хроматографії на силікагелі та ТШХ.

При дослідженні ліпофільних фракцій проводили хроматографічне розділення суміші речовин та подальшу ГХ-МС для ідентифікації та кількісного визначення окремих груп речовин.

Дослідження фармакологічної дії проводили на моделі неалергічного контактного дерматиту у щурів.

Мікроскопічні дослідження здійснювали з використанням мікроскопа Olympusbx51 (Olympus, Японія), оснащеного високоапаратурними об'єктивами 1,5x, 5x, 10x, 40x та камерою LUMC-B11/Sony (Labtron, ВБ). Для обробки результатів експериментів використовували статистичні методи.

Дослідження якісного складу і кількісного вмісту біологічно активних речовин бруслини європейської

При проведенні експериментальної частини комплексного дослідження б. європейської було розроблено схему спільного одержання лектинів та ліпофільних речовин із кори та насіння рослини, а також досліджено ліпофільні фракції листя та квіток. Екстракцію лектинів здійснювали 1 % розчином натрію хлориду при кімнатній температурі. Насіння попередньо знежирювали гексаном, в результаті чого було одержано жирну олію у кількості 24 ± 4 % від маси насіння.

Дослідження лектинів, одержаних із кори та насіння бруслини європейської. Лектини в екстрактах виявляли за допомогою реакції гемаглютинації еритроцитів людини та тварин. Встановлено, що вони достатньо 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°C залишалось лише 50 % рівня початкової активності. При підкисленні екстрактів до рН 5,0 спостерігалось лише 25 % рівня початкової активності. Менше чутливі лектини до лужних значень рН середовища. При рН 10,2 зберігалось 50 % їх активності, концентрування лектину з екстракту найкраще здійснювати за допомогою хлориду натрію при майже повному його насиченні (300 г/л).

Протягом життєвого циклу розвитку рослини, гемаглютинуюча активність лектинів змінювалась в доволі значному діапазоні, що найчіткіше простежувалося у корі б. європейської (рис. 1).

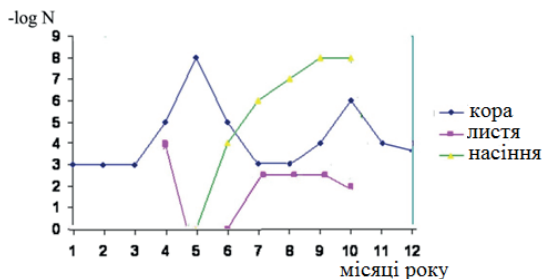


Рис.1 Графіки дослідження активності лектину протягом року

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

ще спостерігається агрегація. Кольоровими лініями позначено титри агрегації еритроцитів групи I(0) людини екстрактів відповідно з кори, листків та плодів б. європейської.

В зв'язку з тим, що екстракти кори та насіння б. європейської виявляли приблизно однаковий титр агрегації, було зроблене паралельне виділення лектинів з цих видів сировини та здійснено порівняльний аналіз для встановлення їх ідентичності.

За результатами проведених досліджень нами опрацьовано спосіб одержання лектину б. європейської, який включає екстракцію рослинної сировини, де як сировина використовується кора рослини, проведення іонообмінної та афінної хроматографії, концентрування проводиться шляхом осадження хлоридом натрію, іонообмінна хроматографія здійснюється на ДЕАЕ-Tojoparl, вихід лектину з колонки контролюється за допомогою реакції агрегації еритроцитів людини групи B(III) або O(I). Для додаткової очистки проводилась афінна хроматографія на поперечно-зшитому овомуцині. Сорбований на колонці лектин знімали за допомогою 0,1М боратного буферного розчину pH 9,0 – 9,8, підігрітого до температури 30 – 55 °С. Графіки очистки лектину кори рослини з використанням різних видів хроматографії представлені на рис. 2 та рис. 3.

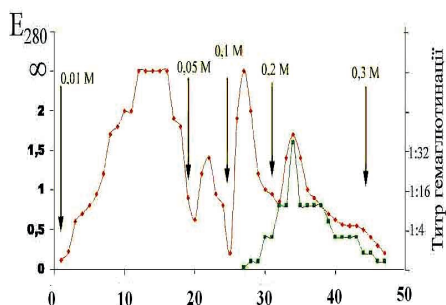


Рис. 2 Графік очистки лектину кори бруслини європейської з використанням іонообмінної хроматографії

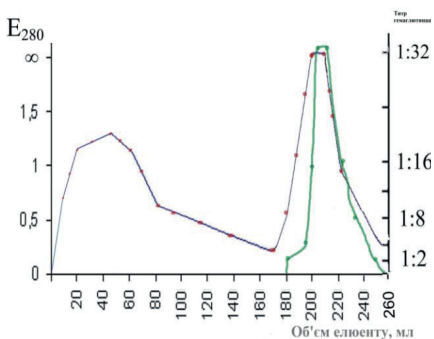


Рис. 3 Графік очистки лектину кори бруслини європейської з використанням афінної хроматографії

Вихід лектину з кори б. європейської, заготовленої весною під час сокоруху, за розробленим нами методом становив до 13 мг із 1 кг повітряно-сухої сировини. У табл. 1 представлено дані щодо розрахунку ефективності очистки лектину кори, одержаного запропонованим способом, яка була 634 кратною відносно початкового екстракту.

Таблиця 1

Розрахунок ефективності очищення лектину кори бруслини європейської

№	Стадія очистки	V (мл)	C (мг/мл)	T	VxT	CxV = m (мг)	Білок, (%)	Активність, (%)	Ефективність очистки
1.	Початковий екстракт	1540	1.8	2 ⁻³	12320	2772	100	100	1
2.	Осадження натрію хлоридом (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.

Перевагою запропонованого способу отримання лектину є те, що джерелом для цього є кора рослини, яка може бути заготовлена у будь-яку пору року, що значно розширює календарні терміни збору сировини, немає необхідності проведення етапу знежирення рослинної сировини, що відповідно зменшує кількість стадій очищення.

Лектин кори і лектин насіння б. європейської виявляють однакові фізико-хімічні та імунобіологічні властивості. Про це свідчать результати проведення електрофорезу в ПААГ в денатуруючих умовах (0,1 % розчин ДДС-натрію), а також дані досліджень їх взаємодії з еритроцитами людини та тварин, вивчення вуглеводної та гістохімічної специфічності цих лектинів.

При проведенні електрофорезу в 15 % розчині ПААГ в присутності 0,1 % розчину ДДС-Na в лужній буферній системі встановлено, що одержаний лектин має понад 70 % чистоти та визначено молекулярну масу поліпептидних ланцюгів лектину, яка становила згідно отриманих результатів 17 кДа.

Встановлено, що екстракти кори та насіння б. європейської, отримані з використанням як екстрагента 0,9 % розчину натрію хлориду, мають однакову гемаглютинуючу активність. Екстракти аглютинували наступні еритроцити крові в міру зменшення титру гемаглютинації: собака > кролик > людина > корова. При використанні еритроцитів баранячої крові аглютинації не спостерігалось. При використанні крові людини виявлена залежність титру гемаглютинації від групи крові. Зокрема, під впливом екстракту кори рослини аглютинація еритроцитів спостерігалась при використанні групи крові В(III) в титрі 1:16, О(I) - 1:8, А(II) - 0.

Наступним етапом було дослідження вуглеводної специфічності очищеного лектину, яке показало, що лектин не взаємодіє з більшістю випробуваних моно- та дисахаридів, із них лише лактоза виявилась 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 наступними видами полісахаридів: гуміарабік, дріжджовий манан, підщелепний муцин вівці. Дані щодо вивчення вуглеводної специфічності досліджуваних лектинів наведено у табл. 2.

Таблиця 2

Вуглеводна специфічність досліджуваних лектинів

№ з/п	Назва вуглеводу	Мінімальна концентрація 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	Оваріумуцин Н	0,03 %	0,03 %
10	Оваріумуцин А	0,125 %	0,125 %
11	Оваріумуцин В	0,004 %	0,004 %
12	α -феніл-N-ацетил-D-глюкозамін	-	-
13	L-рамноза	-	-
14	Салівомуцин 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	Дріжджовий манан	-	-
21	L-фукоза	-	-
22	L-ароабіноза	-	-
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	-	-
29	Овомукоїд	1 %	1 %

Для обох лектинів, виділених із кори та насіння б. 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 виявляли більш інтенсивну позитивну реакцію, порівняно із поверхневим епітелієм, епітелієм залоз, а також децидуальними клітинами.

Дослідження жирної олії насіння бруслини європейської

Жирну олію з насіння б. європейської одержували методом екстракції гексаном як етап проведення знежирення насіння рослини при отриманні лектину із даного виду сировини. Отримана жирна олія насіння б. європейської розчинялася в хлороводнях (хлороформ, метиленхлорид), ацетоні, спиртах, вуглеводнях (гексан, петролейний ефір).

Одержана жирна олія – в'язка рідина яскраво-помаранчевого кольору із специфічним запахом. Вихід олії з насіння становить 20 – 28% від маси сировини. З використанням фармакопейних методів аналізу встановлено основні фізико-хімічні властивості жирної олії, а також числові показники. Результати наведено у табл. 3.

Таблиця 3

Числові показники жирної олії насіння бруслини європейської

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

Для дослідження хімічного складу жирної олії було проведено її фракціонування за допомогою органічних розчинників, змінюючи їх полярність. У результаті чого отримано метанольну, ацетонову та хлороформну фракції олії. Залишок метанольної фракції становив близько 17% від наважки жирної олії, ацетонової – 74%. Після видалення ацетону залишок олії повністю розчинився у хлороформі та становив 5%.

При дослідженні складу отриманих фракцій з використанням методу ГХ-МС метанольна та ацетонова фракції виявились схожими за складом. Із високою ймовірністю виявлено наступні речовини: абітатрієн, каур-16-єн, гібереліни, лінолеву та пальмітинову кислоти, бутеноліди. У ацетоновій фракції виявлено сквален, велика кількість проміжних продуктів синтезу, похідних індолу, аміноциклогексану, ароматичних кетонів.

Залишок хлороформної фракції додатково розділяли колонковою хроматографією на силікагелі. Ідентифіковано такі речовини як ерукамід, вітамін Е, похідні акридину, жирні кислоти (стеаринова, пальмітинова, олеїнова та ліноленова), вуглеводні гексатрикозан, пентатрикозан, октадекан, γ -ситостерол, тетракозагексаєн, 10-деметилсквален та інші.

Жирнокислотний склад жирної олії вивчали методом ГХ, результати дослідження наведені у табл. 4.

Таблиця 4

Жирнокислотний склад олії бруслини європейської

№ з/п	Кислота	Час виходу, с	Висота піку	Поправочний коеф.	Площа піку	Відсотковий вміст
1	C 10:0(капринова)	177,6	12,0660	0,10	1,21	0,13
2	C 12:0 (лауринова)	298,0	15,0095	0,18	2,70	0,29
3	C 14:0 (міристинова)	403,0	3,8985	0,31	1,21	0,13
4	C 16:0 (пальмітинова)	668,1	46,7572	0,60	88,06	9,46
5	C 16:1 (пальмітоолеїнова)	808,4	20,31	0,87	17,68	1,90
6	C 18:0 (стеаринова)	1138,6	13,9319	1,47	20,48	2,20
7	C 18:1 (олеїнова)	1372,2	209,9759	2,09	438,84	47,15
8	C 18:2 (лінолева)	1779,6	108,0784	2,79	301,54	32,40
9	C 18:3 (ліноленова)	2445,9	13,8875	4,25	59,03	6,34

В результаті дослідження встановлено наявність 9 жирних кислот, серед яких 4 ненасичені (олеїнова, пальмітоолеїнова, лінолева та ліноленова), що в сумі складають 87,79 % усіх жирних кислот олії б.європейської.

Для визначення складу БАР жирної олії насіння рослини, а також ідентифікації окремих компонентів, проводили її розділення з використанням колонкової хроматографії на силікагелі, а склад одержаних фракцій вивчали за допомогою методу ТПХ. Встановлена наявність каротиноїдів та токоферолів, кількісне визначення яких проводили шляхом вимірювання екстинції хлороформного розчину на спектрофотометрі CF-46 ($\lambda=460$ нм; кювета з товщиною шару 10 мм). Встановлено, що жирна олія насіння б. європейської містить 26 ± 5 мг% суми каротиноїдів в перерахунку на β -каротин та 40 ± 5 мг% суми токоферолів в перерахунку на α -токоферол.

Якісний склад жирної олії вивчали також методом високоефективної хроматографії з УФ-детекцією із оберненою фазою (RP-HPLC), зокрема виявлено наявність такої важливої тритерпенової сполуки як сквален. Кількісний вміст сквалену у жирній олії визначали за калібрувальним графіком, отриманим за хроматограмами стандартного зразка різної концентрації цієї речовини, які наведені на рис. 4 і рис. 5.

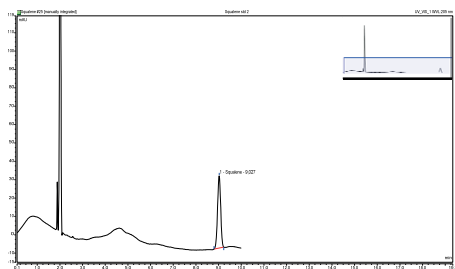


Рис. 4 Хроматограма стандартного розчину сквалену 0,1 мг/мл

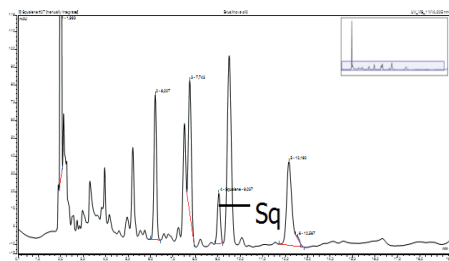


Рис. 5 Хроматограма розчину олії насіння бруслини європейської

Проведення аналізу характеризується повним хроматографічним розділенням піку сквалену від піків інших компонентів жирної олії, що є необхідною вимогою для специфічності методики. Час утримування піку сквалену на хроматограмі олії б. європейської (рис. 5) співпадає з часом утримування піку на хроматограмі розчину стандартного зразка сквалену (рис. 4). Встановлено, що вміст сквалену у жирній олії насіння, яка отримана шляхом екстракції гексаном, становить 173 ± 5 мг/100г, що значно вище, ніж у більшості жирних олій рослинного походження.

Дослідження ліпофільних фракцій кори, листя та квіток бруслини європейської

Оскільки практичне використання бруслини європейської в минулому було пов'язане із вмістом у коренях рослини значної кількості гутаперчі, яка є високомолекулярним вуглеводнем і при біосинтезі якої утворюється значна кількість речовин ліпофільної природи, нами досліджено ліпофільні екстракти сировинних органів б. європейської як потенційне джерело БАР.

Повітряно-суху рослинну сировину (квітки, листя, кора) екстрагували петролейним ефіром ($t_{\text{кип}} = 40 - 70^\circ\text{C}$) у співвідношенні 1:5 при постійному перемішуванні. Після завершення екстракції екстрагент відганяли, сухі залишки зважували, а частину із них розчиняли у хлороформі і аналізували з використанням ГХ-МС. В результаті дослідження із квіток рослини було одержано 0,83 % екстрактивних речовин, з листя - 0,62 %. Кору б. європейської використовували після екстракції розчином натрію хлориду (виділення лектину) з наступною екстракцією етанолом і хлороформом. В результаті було отримано з кори рослини 2,84 % екстрактивних речовин.

З використанням методу ГХ-МС (мас-спектрометр 6С/MS Agilent Technologies 6890 N/5975B, США) більшість сполук, які становлять основну частину екстрактивних речовин, були нами ідентифіковані. Для ідентифікації компонентів екстрактивних речовин використовували бібліотеку мас-спектрів NIST05 IWILEY 2007 в поєднанні з комп'ютерними програмами для ідентифікації AMDIS. Отримані результати наведені в табл. 5.

Таблиця 5

Якісний склад та кількісний вміст ліпофільних речовин кори, квіток та листя бруслини європейської

№ з/п	Назва речовини	Кількісний вміст, %		
		Квітки	Листя	Кора
1	2	3	4	5
<i>Парафінові вуглеводні</i>				
1	Декан ($\text{C}_{10}\text{H}_{22}$)	0,4	-	-
2	Ейкозан ($\text{C}_{20}\text{H}_{42}$)	5,78	1,03	17,87
3	Генейкозан ($\text{C}_{21}\text{H}_{44}$)	2,41	-	0,15
4	Докозан ($\text{C}_{22}\text{H}_{46}$)	1,3	-	0,64

Продовження таблиці 5

1	2	3	4	5
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
<i>Похідні вуглеводнів</i>				
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 кислота	18,11	12,64	-
2	Пальмітинова кислота	3,32	2,1	3,41
3	Стеаринова кислота	-	-	0,87
4	Метилловий естер 9-октадеканової кислоти	3,16	-	-
5	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	γ -ситостерол	5,51	4,38	2,38
3	α -амірин	-	-	3,88
4	β -амірин	1,99	-	-
5	Лупеол	0,89*	1,77	
6	Фріделін	2,53	14,88	10,90
7	Фрієдоолеанан-3-ол	1,08	-	-
8	D:B-фрієдо-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

Продовження таблиці 5

1	2	3	4	5
2	Біс(2-етилгексил)фталат	0,69	0,25	0,74
3	α -токоферол	0,16	2,67	-
4	γ -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 табл. 5, можна відмітити, що кора, квітки і листя б. європейської містять значну кількість парафінових вуглеводнів (від $C_{20}H_{42}$ до $C_{31}H_{64}$). Їх вміст як за асортиментом, так і за кількістю у квітах рослини є найвищим.

Жирні кислоти у цих органах рослини представлені олеїновою та пальмітиновою кислотами. В той же час вміст стероїдних і терпенових сполук є вищим в листі рослини. Слід відмітити високий вміст тритерпену фріделіну в листі та корі рослини, а також значний вміст сквалену в листі, який складає понад 2% від маси петролейно-ефірного екстракту, що є досить високим. Аналізуючи вміст ліпофільних речовин, необхідно зауважити, що практичне використання листя та кори б. європейської як нових видів ЛРС є більш перспективним, ніж квіток рослини.

Дослідження складу основних мікроелементів сировинних органів б. європейської (листя та кора) проводили методом атомно-абсорбційної спектроскопії з електротермічною атомізацією (табл. 6).

За кількісним вмістом досліджувані мікроелементи, виявлені у листках рослини, можна розмістити в наступному порядку: $Zn < Mn < Cu < Pb < Se < Cd < Co$, а мікроелементи, виявлені у корі б. європейської - $Mn < Zn < Cu < Pb < Se < Cd < Co$.

Таблиця 6

Вміст мікроелементів у сировинних органах бруслини європейської

Сировина	Mn, мг/кг	Cu, мг/кг	Se, мг/кг	Pb, мг/кг	Cd, мг/кг	Zn, мг/кг	Co, мг/кг
Листя	60	10,3	0,19	0,26	0,16	64,5	0,09
Кора	60,1	9,7	0,42	0,91	0,29	57	0,09

При дослідженні елементного складу було встановлено, що б. європейська не накопичує важких металів, вміст яких залишався в нормі. За вмістом плюмбуму та кадмію аналізовані види рослинної сировини відповідають вимогам, що регламентуються директивами ВООЗ (не більше 10 мг/кг та 0,3 мг/кг відповідно), а також їх кількість знаходиться в межах допустимих концентрацій згідно вимог ДФУ 2.0 для препаратів рослинного походження.

Дослідження фармакологічної активності жирної олії насіння бруслини європейської

Визначення основних напрямків фармакологічних досліджень проводили, ґрунтуючись на даних літератури, відповідно до яких олія б. європейської використовується як засіб нетрадиційної медицини при дерматитах та екземі.

Проведення фармакологічних досліджень здійснювалось за консультативною допомогою співробітника кафедри фармакології Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького І.О.Нектегаєва.

При визначенні гострої токсичності не виявлено симптомів інтоксикації при введенні жирної олії б. європейської у шлунок щурів, загальний стан тварин та інші показники були задовільними, цю біологічно активну субстанцію можна віднести до 4 класу токсичності (малотоксичні).

Ефективність жирної олії насіння б. європейської при дерматологічних захворюваннях визначали на моделі неалергічного контактного дерматиту у щурів. Інтенсивність запального процесу в організмі тварин оцінювали за станом шкіри, а також за гематологічними та біохімічними показниками крові. Препаратом порівняння була обрана обліпихова олія, оскільки вона виявляє виражену протизапальну і ранозагоювальну дію.

Згідно із одержаними результатами, на 10 день після нанесення скипидару у всіх тварин розвинулися чіткі ознаки запалення. У тварин, які були ліковані обліпиховою олією, ознаки запалення (набряк, почервоніння, крововиливи) на 4-ий день лікування повністю зникли, в той час, як при лікуванні олією бруслини ці симптоми зникли дещо пізніше, на 6 – 7 день лікування. Це дає можливість зробити висновок, що жирна олія бруслини має схожу дію з олією обліпихи, але активність її дещо менша, хоча вона також може бути використана як засіб для лікування захворювань шкіри. Зміни гематологічних та біохімічних показників у досліджуваних тварин (щурів) достовірно були кращими при застосуванні олії бруслини в порівнянні з такими у тварин контрольної групи.

Для вивчення протимікробної дії були отримані водно-спиртові настоянки листя, квіток, насіння та кори б. європейської, отримані методом мацерації (екстрагент- 40 % розчин станолу, співвідношення 1:10). Методом дифузії в агар доведено антимікробну активність щодо 6 музейних штамів мікроорганізмів та грибів (препарат порівняння – ністатин). Досліджувані настоянки, а також жирна олія, виявили виражену протигрибкову дію проти пліснявих грибів *Penicillium notatum* ATCC 28089, *Aspergillus niger* ATCC 16404 в однаковій мірі.

Морфолого-анатомічне дослідження сировинних органів бруслини європейської

Найбільш поширені на території України б. європейська і б. бородавчаста, які мають спільні місця зростання. Нами встановлено відмітні морфологічні ознаки цих двох видів вітчизняної флори, що важливо для ідентифікації б. європейської в природних умовах з метою заготівлі її сировинних органів. На основі проведених досліджень підготовлені проекти «Інструкції із заготівлі і сушіння насіння бруслини європейської» та «Інструкції із заготівлі і сушіння кори бруслини європейської».

В плані стандартизації сировинних органів б. європейської проведено визначення морфологічних ознак таких видів сировини як листя, кора та насіння рослини (рис.6). Б. європейська має чотиригранне стебло зеленого кольору, ребра по краях сіро-бурі, насіння повністю покрите принасінником, яскраво-помаранчеве, листя темно-зелене, шкірясте зверху і світліше знизу, проте опушеність не характерна.

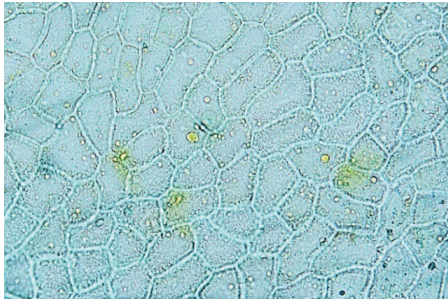


Рис. 6 Зовнішній вигляд вегетативних і генеративних органів бруслини європейської: А – коробочка з насінням, Б – чотиригранне стебло, В – квітки, Г – листя.

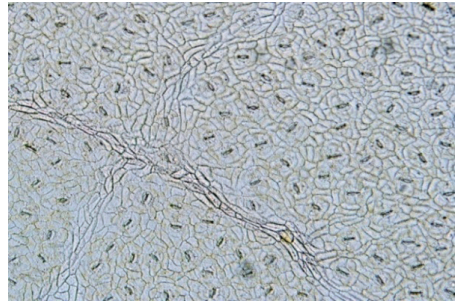
При мікроскопічному дослідженні листя, результати якого наведені на рис. 7, встановлено, що продиховий комплекс аномоцитного типу, продихи розміщені лише на нижній епідермі, волоски прості, зустрічаються в основному вздовж жилок, у паренхімі спостерігаються друзи кальцію оксалату, які локалізовані більшою мірою по краях листової пластинки та при її основі. Зубчасті краї листка закінчуються темними багатоклітинними утворами.

При вивченні анатомічної будови кори встановлено, що корок складається із двох - трьох шарів клітин, під яким один шар коленхіми. В області виступів корок потовщений, а первинна кора відсутня. У первинній корі спостерігаються розширення (дилатації) з друзами кальцію оксалату, волокна та склереїди відсутні.

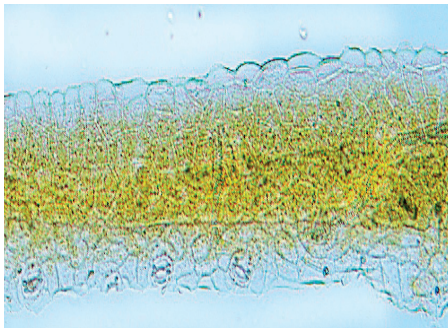
Насіння б. європейської покрите яскраво-помаранчевим двошаровим принасінником (арилусом), шари клітин якого розділені кутикулою з помаранчевими жировими включеннями різного розміру. Клітини ендосперму овальні, білого кольору, також містять жирові включення різного розміру.



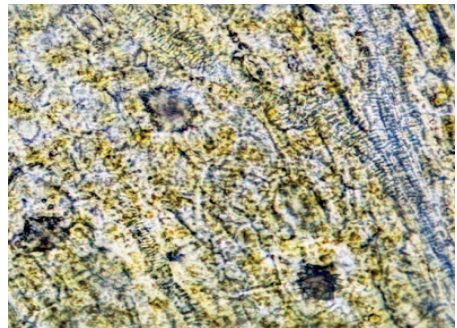
А



Б



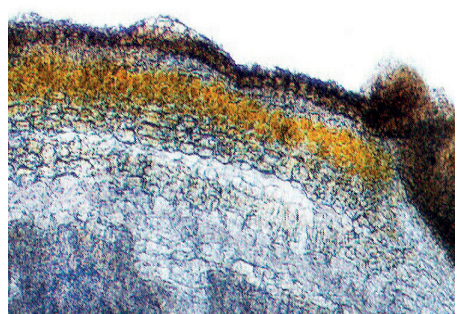
В



Г



Д



Е

Рис. 7 Анатомічна будова сировинних органів бруслини європейської: А – верхня епідерма; Б – нижня епідерма; В – поперечний переріз листової пластинки; Г – друзи кальцію оксалату у мезофілі листка; Д – прості волоски; Е – кора на поперечному перерізі

Розробка методів стандартизації рослинної сировини та біологічно активних субстанцій

На основі проведених досліджень розроблено проєкти МКЯ на новий вид ЛРС - насіння б. європейської та жирну олію насіння, а також «Лабораторний регламент одержання лектину з кори бруслини європейської (*Euonymus europaeus* L.)».

Насіння б. європейської рекомендовано стандартизувати за наступними параметрами: морфолого-анатомічні ознаки, втрата в масі при висушуванні, загальна зола, кількісний вміст жирних кислот.

Жирну олію рекомендовано стандартизувати за числовими показниками, тонкошаровою хроматографією, кількісним вмістом суми каротиноїдів у перерахунку на β -каротин, контролювати мікробіологічну чистоту та залишкові кількості розчинників.

У «Лабораторному регламенті одержання лектину з кори бруслини європейської (*Euonymus europaeus* L.)», який впроваджено НВК «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.

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 б. європейської встановлено наявність та проведено виділення лектину, який за вугледовною специфічністю не відрізняється від попередньо отриманого лектину насіння рослини. У лектину кори визначена електрофоретична чистота та проведено порівняльне дослідження імунохімічних властивостей лектинів кори та насіння б. 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 б. європейської протягом річного вегетаційного циклу розвитку рослини, що дозволило рекомендувати оптимальні терміни заготівлі сировини для отримання цих субстанцій.

3. Проведено отримання жирної олії насіння б. 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 б. європейської. Встановлено, що жирна олія насіння рослини містить 26 ± 5 мг% каротиноїдів та 40 ± 5 мг% токоферолів. Вперше виявлено сквален у жирній олії б. 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 б. 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 б. європейської, вміст токсичних елементів і важких металів не перевищував нормативів ВООЗ і ДФУ 2.0.

6. Встановлено, що при введенні олії б. 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 б. 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 настойки кори, листя та квітів) відносно пліснявих грибів.

7. Встановлено основні діагностичні ознаки сировинних органів б. 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 ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

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 europaeus* 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 European 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 в 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).

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 імені Данила Галицького МОЗ України, Львів, 2021.

Дисертаційна робота присвячена комплексному фармакогностичному дослідженню бруслини європейської, одержанню лектину із кори, розробці спільної схеми одержання біологічно активних речовин, зокрема жирної олії насіння, вивчення її фармакологічної дії. При дослідженні жирної олії вперше виявлено та встановлено в ній вміст сквалену. Вперше досліджено склад ліпофільних фракцій листя, квіток та кори.

Вперше проведено системне морфолого-анатомічне дослідження бруслини європейської, встановлено основні морфологічні та анатомічні діагностичні ознаки сировини.

Розроблено проекти методів контролю якості «Бруслини європейської насіння» та «Бруслини європейської олія насіння», «Лабораторний регламент одержання лектину з кори бруслини європейської (*Euonymus europaeus* L.)», а також проекти Інструкцій із заготівлі і сушіння насіння і кори бруслини європейської.

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

АННОТАЦИЯ

Врубель О. Р. Фармакогностическое исследование бересклета европейского (*Euonymus europaea* L.) - Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 15.00.02 - фармацевтическая химия и фармакогнозия. - Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого МЗ Украины, Львов, 2021.

Диссертация посвящена комплексному фармакогностическому исследованию бересклета европейского, получению лектина из коры, разработке общей схемы получения биологически активных веществ, в частности жирного масла семян, изучению его фармакологического действия. При исследовании жирного масла впервые выявлено и установлено в нем содержание сквалена. Впервые исследован состав липофильных фракций листьев, цветов и коры.

Впервые проведено системное морфолого-анатомическое исследование бересклета европейского, установлено основные морфологические и анатомические диагностические признаки сырья.

Разработаны проекты методов контроля качества «Бересклета европейского семена», «Бересклета европейского масло семян», «Лабораторный регламент получения лектина из коры бересклета европейского (*Euonymus europaeus* L.)» и проект Инструкции по сбору и сушке семян и коры бересклета европейского.

Ключевые слова: бересклет европейский, кора, семена, листья, цветы, лектины, жирное масло семян, сквален, дерматит.

SUMMARY

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

The dissertation for candidate's degree in pharmaceutical sciences in the speciality 15.00.02 – pharmaceutical chemistry and pharmacognosy. – Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Ministry of Public Health of Ukraine, Lviv, 2021.

The thesis is devoted to a complex pharmacognostic study of European spindle tree, obtaining lectin from the bark, development of a joint scheme for obtaining biologically active substances, in particular fatty oil of seeds, study of its pharmacological action.

The composition of lipophilic fractions of leaves, flowers and bark was studied for the first time.

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.

At the first stage of research, lectin of seeds and lectin of *Euonymus europaea* bark were obtained and purified using methods of precipitation, dialysis, centrifugation, affinity, ion exchange and gel chromatography, lyophilization.

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, etheric, iodine and saponification value 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.

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, abietatriene, 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 hexatriaicosan, pentatriaicosan, octadecane, gamma-sitosterol, tetracosahexaene 10-demethylsqualene and others.

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

No symptoms of intoxication were detected with the introduction of *Euonymus europaea* oil into the stomach of rats and it can be classified as hazard class 4. The anti-inflammatory activity of European spindle oil in comparison with sea buckthorn oil was studied in a model of non-allergic contact dermatitis. There was a pronounced effect of tinctures of all studied raw materials, as well as fatty oil against fungus.

The morphological features of such types of raw materials as leaves, bark and seeds were determined.

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 projects of quality control methods “*Euonymus europaea* L. seed “ and “*Euonymus europaea* L. seed oil” have 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.

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

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

E. – *Euonymus*;

б. - бруслина;

БАР- біологічно активні речовини;

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія;

ВЕРХ-МС- високоефективна рідинна хроматографія мас-спектрометрія;

ГХ- газова хроматографія;

ГХ-МС- газова хроматографія з мас-спектрометрією;

ДДС-На - додецилсульфат натрію;

ДФУ- Державна фармакопея України;

ЗФР- забуферений фізіологічний розчин;

ЛРС –лікарська рослинна сировина;

МКЯ- методи контролю якості;

ПААГ- поліакриламідний гель;

СФ – спектрофотометрія;

ТШХ- тонкошарова хроматографія.

Тираж здійснено у друкарні
Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького
79010, м. Львів, вул. Пекарська, 69

Підписано до друку 08.04.2021 р.
Формат 60×84/16. Папір офсетний. Умовн. друк. арк. 0,9.
Тираж 100 прим.

