

АНОТАЦІЯ

Петровська У.В. Фармакогностичне вивчення шпинату городнього (*Spinacia oleracea* L.). – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 «Фармація» (22 – Охорона здоров'я). – Національний фармацевтичний університет, МОЗ України, Харків, 2020.

Дисертаційна робота присвячена комплексному фармакогностичному вивченню коренів, листя та насіння шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія, замороженого листя цієї рослини вітчизняного виробництва, одержанню та фітохімічному вивченню лікарського засобу на їх основі, розробці параметрів стандартизації сировини та лікарського засобу на її основі.

За допомогою хімічних реакцій, методів ПХ та ТШХ в усіх досліджуваних зразках коренів, листя та насіння шпинату городнього виявлено полісахариди, органічні та гідроксикоричні кислоти, амінокислоти, флавоноїди, хлорофіли, каротиноїди, стероїдні сполуки. У коренях та насінні цієї рослини виявлено крохмаль, у листі та насінні – токоферол.

В усіх видах сировини, взятої для аналізу, було ідентифіковано яблучну, лимонну, хлорогенову та кофейну кислоти, амінокислоти лейцин, аспарагін, метіонін, ізолейцин, аргінін та флавоноїд лютеолін. Крім того, в усіх зразках листя шпинату городнього виявлено щавлеву, малонову кислоти, гліцин, фенілаланін, серин, треонін, цистеїн, рутин та апігенін.

Якісний склад та кількісний вміст фенольних сполук у сировині шпинату городнього вивчали методом ВЕРХ. Відмічено, що за якісним складом та кількісним вмістом фенольних сполук аналогічні види сировини шпинату городнього досліджуваних сортів відрізнялись не значно. У коренях шпинату городнього обох досліджуваних сортів ідентифіковано по 3 фенольні сполуки, у насінні – по 5, в усіх зразках листя цієї рослини – по 7. Найбільша кількість фенольних сполук накопичувалася у листі шпинату городнього сорту Фантазія – 1650,03 мг/кг. У насінні цих сполук містилося від 405,13 до 465,71 мг/кг. Вміст

фенольних сполук у коренях досліджуваної рослини не перевищував 317,32 мг/кг.

За результатами експерименту в усіх зразках сировини ідентифіковано хлорогенову та кофейну кислоти, лютеолін. Крім того, у листі шпинату городнього досліджуваних сортів та замороженому листі цієї рослини містилися флавоноїди рутин, гіперозид, апігенін та кемпферол. За вмістом у коренях та насінні шпинату городнього обох сортів, а також замороженому листі цієї рослини переважали гідроксикоричні кислоти. У висушеному листі шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія превалювали флавоноїди. Максимальний вміст гідроксикоричних кислот (560,93 мг/кг) та флавоноїдів (1089,10 мг/кг) було відмічено у листі шпинату городнього сорту Фантазія. Серед гідроксикоричних кислот у коренях та листі шпинату городнього досліджуваних сортів домінувала кофейна кислота. Її вміст у листі був у межах 340,85 – 351,50 мг/кг. У насінні шпинату городнього сортів Красень Полісся і Фантазія переважала хлорогенова кислота (233,77 і 191,79 мг/кг відповідно).

Серед флавоноїдів у коренях шпинату городнього обох досліджуваних сортів переважав лютеолін – від 80,51 до 90,19 мг/кг. В усіх зразках листя та насіння шпинату городнього домінували апігенін та рутин. Максимальний їх вміст був у листі шпинату городнього сорту Фантазія – 617,92 та 323,43 мг/кг відповідно.

Вміст токоферолів в усіх зразках листя та насіння шпинату городнього визначали методом ВЕРХ. В усіх досліджуваних об'єктах ідентифіковано α -, β -, γ - та δ -токоферолі. Однаково високий вміст токоферолів був у насінні шпинату городнього сортів Красень Полісся (72,60 мг/кг) та Фантазія (72,00 мг/кг). В усіх зразках листя шпинату городнього домінував γ -токоферол, у насінні – δ -токоферол.

Амінокислотний склад сировини шпинату городнього досліджували методом іонообмінної рідинно-колонкової хроматографії. В усіх досліджуваних зразках ідентифіковано по 18 амінокислот. Найбільша сумарна кількість амінокислот накопичувалася у листі шпинату городнього сорту Красень Полісся – 155,09 мг/кг. Вміст амінокислот у насінні шпинату городнього коливався від 86,13 до 116,07 мг/кг. У коренях цієї рослини вміст амінокислот не перевищував 42,11 мг/кг. У сировині шпинату городнього на вміст незамінних амінокислот

припадало від 30 до 42 %. Мажоритарними незамінними амінокислотами у коренях шпинату городнього обох досліджуваних сортів були треонін, валін та лейцин. У листі та насінні цієї рослини обох досліджуваних сортів превалювали лізин, лейцин, аргінін та треонін.

Жирнокислотний склад шпинату городнього коренів, листя і насіння сортів Красень Полісся та Фантазія, а також замороженого листя цієї рослини досліджували методом ГХ. У коренях шпинату городнього обох досліджуваних сортів ідентифіковано 12 жирних кислот, у насінні – 11, у листі – 13-14 (залежно від сорту). В усіх аналізованих зразках за вмістом домінували ненасичені жирні кислоти, вміст яких коливався від 81,46 % у коренях шпинату городнього сорту Фантазія до 87,49 % у листі цієї рослини сорту Красень Полісся. Серед ненасичених жирних кислот у коренях та насінні шпинату городнього обох сортів превалювали олеїнова та лінолева кислоти, в усіх зразках листя – ліноленова кислота. У максимальній кількості олеїнова (25,43 %) накопичувалася у коренях шпинату городнього сорту Красень Полісся, ліноленова (45,45 %) та лінолева (60,68 %) – у листі та насінні цієї рослини сорту Фантазія відповідно.

Методом абсорбційної спектрофотометрії визначено кількісний вміст аскорбінової кислоти, суми вільних амінокислот, поліфенольних, стероїдних сполук, гідроксикоричних кислот, флавоноїдів, хлорофілів а і b, каротиноїдів в усіх зразках коренів, листя та насіння шпинату городнього. Встановлено, що найбільше аскорбінової кислоти (0,18 %), гідроксикоричних кислот (2,60 %) та флавоноїдів (4,02 %) накопичувалося у листі шпинату городнього сорту Красень Полісся. Зі свого боку, у листі шпинату городнього сорту Фантазія у максимальній кількості містилось суми вільних амінокислот (3,21 %), хлорофілів а (366,41 мг/100 г) і b (670,89 мг/100 г), каротиноїдів (250,86 мг/100 г), суми поліфенольних (11,30 %) та стероїдних сполук (0,70 %).

Методом гравіметрії у досліджуваній сировині шпинату городнього визначено кількісний вміст полісахаридів та їх фракційний склад. Найвищий вміст суми полісахаридів (28,58 %) та клітковини (30,28 %) був у насінні шпинату городнього сорту Красень Полісся, ПР (6,62 %) та ГЦ Б (4,58 %) – у листі та коренях

цієї рослини відповідно. За вмістом ГЦ А (19,87 %) переважала у листі шпинату городнього сорту Фантазія. Поляриметричним методом встановлено, що найбільше крохмалю містилося у насінні шпинату городнього сорту Фантазія – 28,41 %.

Алкаліметричним та перманганатометричним методами визначено вміст органічних кислот та щавлевої кислоти в усіх досліджуваних об'єктах. Максимальний вміст органічних кислот (3,95 %) зафіксовано у листі шпинату городнього сорту Фантазія. Найбільше щавлевої кислоти було у листі шпинату городнього. Вміст цієї сполуки у листі коливався від 0,77 до 0,93 % залежно від сорту. У коренях досліджуваної рослини щавлева кислота містилася у слідовій кількості, у насінні її вміст не перевищував 0,08 %.

Кількісний вміст протеїну у сировині визначали методом К'ельдаля за загальним вмістом нітрогену. Найвище його значення спостерігалось у листі шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія – 29,82 та 33,10 % відповідно.

Якісний склад та кількісний вміст макро- та мікроелементів у сировині шпинату городнього вивчали методом атомно-абсорбційної спектроскопії. За результатами аналізу в усіх зразках сировини ідентифіковано по 19 мінеральних елементів. Максимальний сумарний їх вміст було відмічено у листі шпинату городнього сорту Фантазія (11675,72 мкг/100 г), мінімальний – у насінні цієї рослини (2013,43 мкг/100 г). Домінуючими макроелементами в усіх зразках сировини були калій, кальцій та натрій. Серед мікроелементів в усіх об'єктах превалювали алюміній, ферум, цинк та манган. Вміст важких металів знаходився в межах гранично допустимої норми для лікарської рослинної сировини за вимогами ДФУ.

За результатами фітохімічного вивчення коренів, листя та насіння шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія, а також замороженого листя цієї рослини встановлено, що однакові види сировини мають ідентичний хімічний склад. За кількісним вмістом основних груп БАР вони відрізнялись не значно. У листі шпинату городнього обох досліджуваних сортів зафіксовано порівняно

високий вміст майже усіх груп досліджуваних БАР. У замороженому листі цієї рослини вміст БАР був або на тому ж рівні, що й у висушеному листі, або у 2-3 рази нижчим. Тому як перспективну сировину для подальших досліджень, пов'язаних з розробкою лікарських засобів, було обрано висушене листя шпинату городнього без надання переваги будь-якому із досліджуваних сортів.

Методом гравіметрії для обраної сировини визначено показники якості за вимогами ДФУ: втрату в масі при висушуванні (7,76 %), вміст загальної золи (16,17 %) та золи, не розчинної в хлористоводневій кислоті (1,45 %). Встановлено, що найкращим екстрагентом, який вилучав максимальну кількість екстрактивних речовин (24,73 %), поліфенолів (10,68 %), гідроксикоричних кислот (2,77 %) та флавоноїдів (4,20 %) зі шпинату городнього листя був 40 % етанол. Крім того, було визначено технологічні параметри шпинату городнього листя.

Дослідження морфолого-анатомічної будови шпинату городнього листя дозволило встановити діагностичні ознаки цієї сировини. До основних макроскопічних ознак віднесено овальну форму та тип жилкування листкової пластинки, наявність крилатих черешків з піхвоподібним розширенням при основі. До мікроскопічних діагностичних ознак віднесено наявність кулястих прорихів аномоцитного типу, сферичну, напівсферичну або трикутну форму поперечного перерізу черешка, а також наявність у мезофілі листка та черешка ідіобластів з кристалами оксалату кальцію кубічної або таблитчастої форми, які зростаються у чисельні друзи.

Методом трьохфакторного математичного планування здійснено підбір оптимальних умов екстракції БАР зі шпинату городнього листя для забезпечення їх максимального виходу. Як параметри оптимізації використовували вихід поліфенолів, гідроксикоричних кислот та флавоноїдів. Таким чином, шпинату городнього листя екстракт густий одержували методом трикратної дробної мацерації при температурі екстракції 60°C та співвідношенні сировини до екстрагенту 1 : 5. Вихід готового продукту становив не менше 38 %.

Методами ПХ та ТШХ в одержаному екстракті ідентифіковано хлорогенову, неохлорогенову, кофейну яблучну, лимонну, винну, щавлеву, малонову та

аскорбінову кислоти, рутин, лютеолін, гіперозид, апігенін, лейцин, аспарагін, метіонін, ізолейцин, аргінін, гліцин, фенілаланін, серин, треонін та цистеїн.

Методом ВЕРХ у шпинаті городнього листя екстракті густому ідентифіковано десять фенольних сполук, загальний вміст яких складав 3778,89 мг/кг. Вміст флавоноїдів (2362,91 мг/кг) у досліджуваному об'єкті у 1,6 рази перевищував вміст гідроксикоричних кислот (1415,98 мг/кг). Серед ідентифікованих сполук домінували кофейна кислота (883,04 мг/кг), рутин (1046,43 мг/кг) та апігенін (923,46 мг/кг).

Методом іонообмінної рідинно-колонкової хроматографії у шпинату городнього листя екстракті густому ідентифіковано 18 амінокислот, загальний вміст яких становив 308,15 мг/кг. На вміст незамінних амінокислот (135,00 мг/кг) припадало близько 44 % від сумарного вмісту цих сполук у екстракті. Превалюючими незамінними амінокислотами були лізин, валін та лейцин.

Вміст мінеральних елементів у шпинату городнього листя екстракті густому досліджували методом ААС. Вміст мінеральних елементів у цьому об'єкті складав 14170,92 мкг/100 г. Серед макроелементів переважали калій, кальцій та натрій, серед мікроелементів – ферум та цинк. Вміст важких металів знаходився в межах гранично допустимої норми для екстрактів з лікарської рослинної сировини за вимогами ДФУ.

Методом абсорбційної спектрофотометрії у шпинату городнього листя екстракті густому визначено кількісний вміст суми вільних амінокислот (6,96 %), поліфенольних сполук (26,52 %), гідроксикоричних кислот (3,73 %), флавоноїдів (8,10 %) та стероїдних сполук (1,63 %). Вміст полісахаридів (1,35 %) визначали гравіметричним, щавлевої кислоти (0,06 %) – перманганатометричним методом.

Проведені дослідження дозволили визначити параметри стандартизації шпинату городнього листя та шпинату городнього листя екстракту густого. У цих об'єктах пропонується регламентувати якісний склад фенольних сполук та кількісний вміст поліфенолів, гідроксикоричних кислот, флавоноїдів і щавлевої кислоти. Результати фармакогностичного вивчення були використані при розробці МКЯ «Шпинату городнього листя», «Шпинату городнього листя екстракт густий».

Методом дифузії в агар вивчено антимікробну активність шпинату городнього листя екстракту густого у порівнянні з Хлорофіліптом. Встановлено, що *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* та *Candida albicans* були чутливими, а *Staphylococcus aureus* – високочутливим до дії шпинату городнього листя екстракту густого. Антирадикальну активність одержаного екстракту визначали *in vitro* методом абсорбційної спектрофотометрії у еквіваленті хлорогенової кислоти. Антирадикальна активність для цього об'єкту становила 8,31 мг/г.

У дослідях *in vivo* встановлено, що шпинату городнього листя екстракт густий відноситься до V класу токсичності (практично нетоксичні речовини) за класифікацією К. К. Сидорова. У мінімальній ефективній дозі 150 мг/кг шпинату городнього листя екстракт густий проявляв виражену антиоксидантну та гепатопротекторну активність на рівні з препаратом порівняння Карсил (АТ «Софарма», Болгарія).

Наукова новизна проведених досліджень підтверджена патентом України на корисну модель № 136789 від 27.08.2019 р. «Лікарський рослинний засіб з гепатопротекторною активністю».

Ключові слова: шпинат городній, сорт Красень Полісся, сорт Фантазія, корені, листя, насіння, фармакогностичне вивчення, протимікробна, антиоксидантна, гепатопротекторна активність.

Список публікацій здобувача

1. Гриненко У. В., Журавель І. О. Визначення жирнокислотного складу в насінні шпинату городнього сорту «Фантазія». *Фітотерапія. Часопис*. 2017. № 3. С. 55-58. (*Особистий внесок* – огляд літературних джерел, планування експерименту, аналіз та узагальнення результатів експерименту).

2. Гриненко У. В., Журавель І. О. Визначення вмісту хлорофілів та каротиноїдів в листі шпинату городнього (*Spinacia oleracea* L.). *Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П. Л. Шупика*. 2018. Вип. 28. С. 29-33. (*Особистий внесок* – огляд літературних джерел, планування та проведення

експерименту, аналіз та узагальнення результатів, підготовка матеріалів публікації).

3. Гриненко У. В., Журавель І. А. Идентификация и количественное определение содержания хлорофиллов и каротиноидов в листьях шпината огородного сортов «Красавец полесья» и «Фантазия». *Рецепт*. 2018. Т. 21, № 2. С. 226-230. (Особистий внесок – огляд літературних джерел, планування експерименту, аналіз та узагальнення результатів експерименту та комп'ютерна обробка матеріалів дослідження, підготовка матеріалів до друку).

4. Petrovska U. V., Zhuravel I. O., Hutsol V. V. Identification And Quantitative Content Determination Of Macro- And Microelements In Spinach Leaves, Seeds And Roots Of “Krasen’ Polissia” And “Fantasy” Cultivars. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2018. № 9 (6). P. 530-534. (Особистий внесок – планування експерименту, пробопідготовка зразків сировини, аналіз та узагальнення результатів експерименту, комп'ютерна обробка результатів).

5. Гриненко У. В., Журавель І. О., Могильна О. М. Порівняльний аналіз жирнокислотного складу листя шпинату городнього сортів «Красень полісся» та «Фантазія». *Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П. Л. Шупика*. 2018. Вип. 30. С.388-397. (Особистий внесок – планування експерименту, огляд літературних джерел, аналіз та узагальнення результатів експерименту, комп'ютерна обробка матеріалів дослідження).

6. Петровська У. В., Журавель І. О., Гуцол В. В. Визначення кількісного вмісту протеїну та клітковини в листі та насінні шпинату городнього сортів Красень Полісся та Фантазія. *Фітотерапія. Часопис*. 2018. № 4. С. 56-58. (Особистий внесок – планування експерименту, аналіз та узагальнення результатів експерименту, комп'ютерна обробка матеріалів дослідження).

7. Petrovska U., Zhuravel I., Gurieva I. Study of the qualitative composition and quantitative content of amino acids in spinach plant raw material of Krasen Polissia and Fantasy cultivars. *Norwegian Journal of development of the International Science*. 2019. №31, Vol 1. P. 60-63. (Особистий внесок – планування експерименту, огляд

літературних джерел, пробопідготовка зразків сировини, аналіз та узагальнення результатів експерименту).

8. Петровська У. В., Никифорок А. Я., Журавель І. О., Фіра Л. С. Лікарський рослинний засіб з гепатопротекторною активністю: пат. на кор. мод. 136789 Україна. № u 201906898; заявл. 20.06.2019; опубл. 27.08.2019; Бюл. № 16. (*Особистий внесок – планування експерименту, огляд літературних джерел, одержання та стандартизація екстракту, аналіз та узагальнення результатів експерименту, оформлення матеріалів до друку*).

9. Гриненко У. В. Определение содержания гидроксикоричных кислот в листьях шпината огородного (*Spinacia oleracea* L.). *Актуальные проблемы современной медицины и фармации 2017*: мат. LXXI Междунар. научн.-практ. конф. студентов и молодых ученых, г. Минск, 17-19 апреля 2017 г. Минск. 2017. С. 1530.

10. Гриненко У. В. Определение количественного содержания органических кислот в листьях шпината огородного (*Spinacia oleracea* L.). *Актуальные вопросы современной медицины и фармации*: мат. 69-й итоговой научн.-практ. конф. студентов и молодых ученых, г. Витебск, 19-20 апреля 2017 г. Витебск. 2017. С. 611-612.

11. Гриненко У. В. Количественное определение фенольных соединений в листьях шпината огородного (*Spinacia oleracea* L.). *Роль молодежи в развитии медицинской науки*: мат. XII научн.-практ. конф. молодых ученых и студентов ТГМУ им. Абуали ибни Сино с международным участием, посвященной «Году молодежи», г. Душанбе, 28 апреля 2017 г. Душанбе. 2017. С. 292-293.

12. Гриненко У. В., Журавель І. О. Визначення вмісту флавоноїдів в листі шпинату городнього. *Промислова фармація: етапи становлення та майбутнє*: мат. Міжнар. наук.-практ. конф., м. Харків, 29-30 вересня 2017 р. Харків. 2017. С. 35-37.

13. Grynenko U. V., Zhuravel I. O. Extractable matter determination in spinach leaves (*Spinacia oleracea* L.). *Science and Practice: Abstracts of 8th international conference on pharmaceutical sciences and pharmacy practice Kaunas, 15th of December*

2017. Kaunas. 2017. P. 63-64.

14. Гриненко У. В., Журавель І. О. Визначення технологічних параметрів для сировини шпинату городнього сортів «Красень полісся» та «Фантазія». *Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження*: мат. І Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 5 квітня 2018 р. Харків. 2018. С. 41.

15. Гриненко У. В., Журавель І. О. Визначення числових показників в сировині шпинату городнього сортів «Красень полісся» та «Фантазія». *Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології*: зб. наук. праць, вип. 4. Харків. 2018. С. 71.

16. Петровська У. В., Журавель І. О. Визначення якісного складу та кількісного вмісту амінокислот в листі та насінні шпинату городнього сортів «Красень полісся» та «Фантазія». *Інноваційний розвиток: освіта та наука XXI століття*: мат. Міжнар. наук.-практ. конф., м. Київ, 19 червня 2018 р. Обухів: 2018. Т. 2. С. 92-93.

17. Петровська У. В., Журавель І. О. Вивчення крохмалю в насінні шпинату городнього (*Spinacia oleracea* L.) сортів Красень Полісся та Фантазія. *Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція*: мат. І наук.-практ. інтернет-конф. з міжнар.участю, м. Харків, 18 жовтня 2018 р. Харків. 2018. С. 176.

18. Петровська У. В., Журавель І. О. Визначення та встановлення кількісного вмісту фенольних сполук в листі та насінні шпинату городнього сорту Фантазія та Красень Полісся. *PLANTA+. Досягнення та перспективи*: мат. Міжнар. наук.-практ. конф., присвяченої пам'яті д. хім. н., проф. Н. П. Максютіної (до 95-річчя від дня народження), м. Київ, 20–21 лютого 2020 р. Київ. 2020. С. 126-127.

19. Петровська У. В., Журавель І. О. Кількісний вміст органічних кислот, аскорбінової кислоти та гідроксикоричних кислот в сировині шпинату городнього сорту Красень Полісся та Фантазія. *Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять*

компоненти природного походження : мат. II Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 11 березня 2020 р. Харків. 2020. С. 129.

20. Макро- та мікроскопічні ознаки листя прикореневої розетки шпинату городнього (*Spinacia oleracea* L.): Інформаційний лист № 368-2018, протокол № 104 від 24.10.2018 р. / У. В. Петровська, І. О. Журавель, В. С. Кисличенко. К.: Укрмедпатентінформ, 2018. 4 с.

ANNOTATION

Petrovska U. V. Pharmacognostic study of Spinach (*Spinacia oleracea* L.). – Qualification scientific work in manuscript status.

Thesis for a PhD degree in specialty 226 «Pharmacy» (22 – Health care). – National University of Pharmacy, Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2020.

The thesis is devoted to a comprehensive pharmacognostic study of *Spinacia oleracea* roots, leaves and seeds, Krasen Polissia and Fantazia cultivars, frozen leaves of this domestic plant, obtaining and phytochemical study of a medicine on their basis, development of herb standardization parameters and of a medicine on its basis.

With the help of chemical reactions, paper and thin-layer chromatography, in all tested samples of *Spinacia oleracea* roots, leaves and seeds such substances were discerned as polysaccharides, organic and hydroxycinnamic acids, amino acids, flavonoids, chlorophylls, carotenoids, steroid compounds. Roots and seeds of this plant also contain starch, leaves and seeds contain tocopherols.

In all tested types of herb malic, citric, chlorogenic and caffeic acids were identified as well as the following amino acids: leucine, asparagine, methionine, isoleucine, arginine and flavonoid luteolin. All samples of spinach leaves contained oxalic, malonic acids, glycine, phenylalanine, serine, threonine, cysteine, rutin and apigenin.

The qualitative composition and quantitative content of phenolic compounds in *Spinacia oleracea* herb were studied by high performance liquid chromatography. Differences in qualitative composition and quantitative content of phenolic compounds

among similar types of herbs of tested cultivars were found to be insignificant. Roots of tested *Spinacia oleracea* ch cultivars contained each 3 phenolic compounds, seeds contained 5 phenolic compounds each and all samples of leaves contained 7 phenolic compounds each. The highest accumulation of phenolic compounds took place in Fantazia cultivar *Spinacia oleracea* leaves – 1650,03 mg/kg. Their content in seeds was from 405,13 to 465,71 mg/kg. The content of phenolic compounds in roots of tested plants never exceeded 317,32 mg/kg.

Experiment results showed the presence of chlorogenic and caffeic acids, luteolin in all tested herb samples. Fresh and frozen leaves of this plant contained flavonoids rutin, hyperoside, apigenin and kaempferol. Quantitative superiority in roots and seeds of both cultivars, as well as in frozen leaves belonged to hydroxycinnamic acids. Flavonoids prevailed in dried leaves of Krasen Polissia and Fantazia *Spinacia oleracea*. The highest content of hydroxycinnamic acids (560,93 mg/kg) and flavonoids (1089,10 mg/kg) was found in Fantazia *Spinacia oleracea* ach leaves. Among hydroxycinnamic acids in tested *Spinacia oleracea* roots and leaves caffeic acid dominated, its content in leaves being within the limits 340,85 – 351,50 mg/kg. In Krasen Polissia and Fantazia *Spinacia oleracea* seeds chlorogenic acid prevailed (233,77 and 191,79 mg/kg respectively).

Most widespread among flavonoids in *Spinacia oleracea* roots of both cultivars was luteolin – from 80,51 to 90,19 mg/kg. In all samples of *Spinacia oleracea* leaves and seeds apigenin and rutin dominated. Their content was the highest in Fantazia *Spinacia oleracea* leaves – 617,92 and 323,43 mg/kg respectively.

The content of tocopherols in all samples of *Spinacia oleracea* leaves and seeds was determined by high performance liquid chromatography. α -, β -, γ - and δ -tocopherols were identified in all tested samples, their content being identical in seeds of Krasen Polissia (72,60 mg/kg) and Fantazia (72,00 mg/kg) *Spinacia oleracea*. γ -tocopherol dominated in all samples of *Spinacia oleracea* leaves, whereas δ -tocopherol dominated in seeds.

Amino acid composition of *Spinacia oleracea* was studied by ion exchange liquid column chromatography. In each of tested samples 18 amino acids were identified. The highest total amount of amino acids accumulated in Krasen Polissia *Spinacia oleracea* leaves – 155,09 mg/kg. *Spinacia oleracea* seeds contained from 86,13 to 116,07 mg/kg

amino acids, whereas roots contained only maximum 42,11 mg/kg. Indispensable amino acids made 30 to 42 % of total content in *Spinacia oleracea* herb. The majority of indispensable amino acids in *Spinacia oleracea* roots of both cultivars were threonine, valine and leucine. In leaves and seeds of both cultivars of this plant lysine, leucine, arginine and threonine prevailed.

Fatty acid composition of Krasen Polissia and Fantazia *Spinacia oleracea* roots, leaves and seeds, as well as of frozen leaves of this plant, was studied by gas chromatography. In *Spinacia oleracea* roots of both cultivars 12 fatty acids were identified, in seeds: 11, in leaves: 13-14 (depending on cultivar). In all tested samples unsaturated fatty acids dominated, taking from 81,46 % total fatty acids content in Fantazia *Spinacia oleracea* roots and to 87,49 % in Krasen Polissia leaves. Among unsaturated fatty acids oleic and linoleic acids dominated in roots and seeds of both *Spinacia oleracea* cultivars, whereas linolenic acid prevailed in all samples of leaves. The highest share of oleic acid was accumulated in Krasen Polissia *Spinacia oleracea* roots (25,43 %), that of linolenic (45,45 %) and linoleic acid (60,68 %) was accumulated in leaves and seeds of Fantazia spinach.

By absorption spectrophotometry we determined the quantitative content of ascorbic acid, total free amino acids, polyphenolic and steroid compounds, hydroxycinnamic acids, flavonoids, a and b chlorophylls, carotenoids in all samples of *Spinacia oleracea* roots, leaves and seeds. The highest accumulation of ascorbic acid (0,18 %), hydroxycinnamic acids (2,60 %) and flavonoids (4,02 %) took place in Krasen Polissia *Spinacia oleracea* leaves. On the other side, the highest content of total free amino acids (3,21 %), a chlorophyll (366,41 mg/100 g) and b chlorophyll (670,89 mg/100 g), carotenoids (250,86 mg/100 g), total polyphenolics (11,30 %) and total steroids (0,70 %) were found in Fantazia *Spinacia oleracea* leaves.

The quantitative content of polysaccharides and their fractional distribution were determined by gravimetry. The highest content of total polysaccharides (28,58 %) and cellulose (30,28 %) was found in Krasen Polissia *Spinacia oleracea* seeds, that of pectins (6,62 %) and hemicellulose B (4,58 %) was found in leaves and roots of this plant respectively. Hemicellulose A dominated (19,87 %) in Fantazia *Spinacia oleracea* leaves. Polarimetry

showed that most starch was contained in Fantazia *Spinacia oleracea* seeds – 28,41 %.

The contents of organic acids and oxalic acid in all tested objects were determined by alcalimetry and permanganatometry. The largest content of organic acids (3,95 %) was found in Fantazia *Spinacia oleracea* leaves. Oxalic acid was most accumulated in *Spinacia oleracea* leaves – 0,77 to 0,93 % depending on cultivar. Only traces of oxalic acid were found in roots of tested plant, whereas its content in seeds never exceeded 0,08 %.

The quantitative content of protein in the herb was determined by Kjeldahl method on the basis of total nitrogen. Its highest content was observed in Krasen Polissia and Fantazia *Spinacia oleracea* leaves – 29,82 and 33,10 % respectively.

The qualitative composition and quantitative content of macro- and microelements in *Spinacia oleracea* herb was determined by atomic absorption spectroscopy. In all herb samples 19 mineral elements were identified. Their highest total content was noticed in Fantazia *Spinacia oleracea* leaves (11675,72 µg/100 g), lowest level was in the plant seeds (2013,43 µg/100 g). Dominant macroelements in all herb samples were potassium, calcium and sodium. Among microelements aluminum, iron, zinc and manganese prevailed everywhere. The contents of heavy metals were within the acceptable limits for medicinal herbs as per Ukrainian State Pharmacopeia.

The results of phytochemical study of Krasen Polissia and Fantazia *Spinacia oleracea* roots, Leaves and seeds, as well as of frozen leaves of this plant, proved identical chemical composition of identical types of herb. The contents of basic groups of bioactive substances differed only slightly. Comparably high content of almost all groups of tested bioactive substances took place in *Spinacia oleracea* leaves of both cultivars. Their content in frozen leaves was either equal to that in dried leaves, or 2-3 times less. Therefore, we selected *Spinacia oleracea* dried leaves as a prospective raw material for further research and development of medicines, both cultivars being preferable for that.

The quality parameters for selected herb according to Ukrainian State Pharmacopeia requirements were established by gravimetry as follows: mass drying loss 7,76 %, total ash 16,17 %, hydrochloric acid-insoluble ash 1,45 %. 40 % ethanol was determined as the best extractant enabling to obtain maximum yield of extractive substances (24,73 %), polyphenols (10,68 %), hydroxycinnamic acids (2,77 %) and flavonoids (4,20 %) from *Spinacia oleracea*

leaves. Besides, process parameters for *Spinacia oleracea* leaves were established.

Morphological anatomic study of *Spinacia oleracea* leaves enabled the definition of the herb diagnostic signs. The basic macroscopic signs are oval shape and lamina venation type, winged petiole with a base vagina-shaped extension. Microscopic diagnostic signs are anomocytic type globular stomata, spherical, hemispherical or triangular petiole cross-section, as well as idioblasts present in leaf and petiole mesophyll with cubic or tablet-shaped calcium oxalate crystals which accrete into multiple druses.

The optimal terms for bioactive substances extraction from *Spinacia oleracea* leaves were selected by three-factor design to ensure their maximum yield. Optimization parameters were accepted as yield of polyphenols, hydroxycinnamic acids and flavonoids. Thus, thick extract from *Spinacia oleracea* leaves were obtained by threefold double maceration at extraction temperature 60°C and herb / extractant relation 1 : 5. The yield of final product was minimum 38 %.

By paper and thin-layer chromatography we identified in obtained extract chlorogenic, neochlorogenic, caffeic, malic, citric, tartaric, oxalic, malonic and ascorbic acids, rutin, luteolin, hyperoside, apigenin, leucine, asparagine, methionine, isoleucine, arginine, glycine, phenylalanine, serine, threonine and cysteine.

By high-performance liquid chromatography we identified in *Spinacia oleracea* leaves thick extract ten phenolic compounds to total amount of 3778,89 mg/kg. The contents of flavonoids (2362,91 mg/kg) in the extract was 1,6 times higher than that of hydroxycinnamic acids (1415,98 mg/kg). Dominant among these compounds were caffeic acid (883,04 mg/kg), rutin (1046,43 mg/kg) and apigenin (923,46 mg/kg).

By ion exchange liquid column chromatography we identified 18 amino acids in *Spinacia oleracea* leaves thick extract to total amount of 308,15 mg/kg. Indispensable amino acids (135,00 mg/kg) took nearly 44% of total content of the compounds in the extract. Among indispensable amino acids lysine, valine and leucine were prevalent.

By atomic absorption spectrometry we found mineral elements in *Spinacia oleracea* leaves thick extract to total amount of 14170,92 µg/100 g. Dominant macroelements were potassium, calcium and sodium, prevalent microelements were iron and zinc. The contents of heavy metals were within the acceptable limits for medicinal

herb extracts as per Ukrainian State Pharmacopeia.

The quantitative contents of total free amino acids (6,96 %), polyphenolic compounds (26,52 %), hydroxycinnamic acids (3,73 %), flavonoids (8,10 %) and steroid compounds (1,63 %) were determined by absorption spectrophotometry. The contents of polysaccharides (1,35 %) were determined by gravimetry, oxalic acid (0,06 %) by permanganometry.

Our research enabled to determine standardization parameters for *Spinacia oleracea* leaves thick extract. There we propose to specify qualitative composition of phenolic compounds and quantitative content of polyphenols, hydroxycinnamic acids, flavonoids and oxalic acid. The results of pharmacognostic study were used in the development of Quality Control Methodologies «*Spinacia oleracea* folia» and «*Spinacia oleracea* foliorum extractum spissum».

By agar diffusion we studied antimicrobial activity of *Spinacia oleracea* leaves thick extract as compared with Chlorophyllipt. It was established that *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* and *Candida albicans* were sensitive and *Staphylococcus aureus* highly sensitive to effect of *Spinacia oleracea* leaves thick extract. The antiradical activity of the extract was studied *in vitro* by absorption spectrophotometry in chlorogenic acid equivalent and was found to be 8,31 mg/g.

By *in vivo* studies we established that *Spinacia oleracea* leaves thick extract refers to V class of toxicity (actually non-toxic substances) under classification by K.K.Sidorov. At minimum effective dosage of 150 mg/kg *Spinacia oleracea* leaves thick extract showed distinctive anti-oxidant and hepatoprotective activity compared with Carsil drug (Sofarma, Bulgaria).

The novelty of the research was confirmed by Ukrainian utility patent № 136789 of 27.08.2019 «Herbal Medicine with Hepatoprotective Activity».

Key words: *Spinacia oleracea*, Krasen Polissia cultivar, Fantazia cultivar, roots, leaves, seeds, pharmacognostic study, antimicrobial activity, antioxidant activity, hepatoprotective activity.