

Національний фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України

Національний фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Чайка Наталя Борисівна

УДК 615.451.13:582.912.4:547.56

ДИСЕРТАЦІЯ

**Фітохімічне вивчення листя мучниці звичайної та створення на їх основі
нових лікарських засобів**

226 – Фармація

22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

Н. Б. Чайка

Науковий керівник Кошовий Олег Миколайович, доктор фармацевтичних
наук, професор

Харків – 2022

АНОТАЦІЯ

Чайка Н. Б. Фітохімічне вивчення листя мучниці звичайної та створення на їх основі нових лікарських засобів. – 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, 2022.

Дисертаційна робота присвячена фітохімічному вивченню листя мучниці звичайної та сухих екстрактів з цієї сировини для створення нових стандартизованих лікарських засобів з діуретичною, протизапальною, гіпоглікемічною та гіполіпідемічною дією.

Фітохімічний скринінг основних груп БАР у листі мучниці звичайної показав наявність похідних гідрохінону, фенолкарбонових та гідроксикоричних кислот, кумаринів, флавоноїдів, дубильних речовин і тритерпенових сапонінів. При цьому, методом ТШХ були ідентифіковані такі речовини, як арбутин, галова, елагова, протокатехова, хлорогенова і *n*-кумарова кислоти, кверцетин, рутин, гіперозид, гало- та елаготаніни. Встановлено кількісний вміст основних груп фенольних сполук у сировині.

Методом ВЕРХ в листі мучниці звичайної ідентифіковано 8 речовин, серед яких домінуючими були арбутин, гіперозид та катехін. У мучниці звичайної листі спостерігався значний вміст фенольних сполук, однак з усього різноманіття ідентифіковано тільки арбутин, 2 фенолкарбонові кислоти: галову та елагову, і 5 флавоноїдів. Так, вміст арбутину у сировині був близько 3 %.

Методом ВЕРХ було ідентифіковано та визначено кількісний вміст 8 сапонінів у мучниці звичайної листі: урсолову кислоту (1,07 %), еускапову кислоту (0,04 %), торментинову кислоту (0,02 %), уваол (0,35 %), олеанолову кислоту (0,16 %), еритродіол (0,16 %), бетулін (0,13 %) та лупеол (0,37 %). Домінуючими речовинами були урсолова кислота, уваол та лупеол. Таким

чином, тритерпенові сапоніни листя мучниці звичайної представлені похідними урсану, олеанану та лупану, серед яких домінують похідні урсану (майже 1,5 %), які, безперечно, мають вплив на загальний діуретичний та антимікробний ефект цієї сировини.

Дослідження сполук легкої фракції мучниці звичайної листя проводили методом ГХ-МС. Вміст речовин легкої фракції склав 14,46 мг/100 г сировини, при цьому було виявлено 42 речовини, з яких тільки 26 вдалося ідентифікувати. При цьому основними речовинами є октан, камфора, 2,4-декадиеналь, гексадекан, гексагідрофарнезилацетон, фітол, етилпальмітат, етиллінолеат, 4,8,12,16-тетраметилгептадекан-4-олід, пентакозан, гексакозан, нонакозан, унтриаконтан та тритриаконтан, з яких домінували нор-олеан-12-ен, унтриаконтан, нонакозан та фітол.

Для вибору оптимального екстрагенту для екстракції БАР з мучниці звичайної листя було отримано п'ять сухих екстрактів з використанням води, 30, 50, 70 та 96 % етанолу. При цьому вихід сухих екстрактів у залежності від екстрагенту склав $16,72 \pm 0,32$ %; $13,12 \pm 0,63$ %; $11,84 \pm 0,41$ %; $10,09 \pm 0,28$ % та $6,72 \pm 0,76$ % відповідно. Методом ВЕРХ в одержаних сухих екстрактах мучниці звичайної листя визначено вміст основних БАР фенольної природи і сапонінів: арбутину, 2 фенолкарбонових кислот, 6 флавоноїдів та 8 сапонінів. З одержаних результатів видно, що арбутин та сапоніни краще екстрагуються водою та слабкими розчинами етанолу, тоді як фенолкарбонові кислоти та флавоноїди – 50-70 % етанолом. Результати досліджень кількісного вмісту основних груп БАР методом СФ показали, що з листя мучниці звичайної водою та 30 % розчином етанолу забезпечується найкраща екстракція гідрокінонпохідних; гідроксикоричні кислоти краще екстрагуються водно-спиртовими розчинами у концентраціях 30-50 %, флавоноїди – у концентраціях 50-70 %. Враховуючи вихід екстрактів, вміст різних груп фенольних сполук та економічний чинник, встановлено, що 50 % спирт етиловий є оптимальним екстрагентом для одержання лікарських засобів на основі фенольних сполук із мучниці звичайної листя, а вода

очищена оптимальний екстрагент для одержання екстрактів багатих на гідрохінонпохідні. Встановлено, що оптимальна кратність водної та водно-спиртової екстракції (50 % етанол) з цієї сировини складає два рази, що буде використано при розробці технології одержання нових сухих екстрактів з мучниці звичайної листя.

Проведено вивчення діуретичної і антимікробної активності одержаних сухих екстрактів мучниці звичайної листя. У результаті дослідження діуретичної активності екстрактів мучниці звичайної листя було встановлено, що найбільшою діуретичною активністю володіє екстракт, одержаний 50 % етанолом, у дозі 50 мг/кг, збільшуючи діурез на 70 %, що на 22 % менше, ніж активність лікарського засобу гіпотіазиду у дозі 25 мг/кг. Діуретична активність екстракту, отриманого 96 % етанолом, у дозі 50 мг/кг становила 33 % і була на 59 % менша, ніж активність препарату порівняння. Сухі екстракти мучниці звичайної листя виявили активність по відношенню до *St. aureus*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* та *C. albicans* на рівні з відваром листя мучниці. Отримані екстракти виявляють більш широкий спектр антимікробної активності в порівнянні з референс-препаратом Хлорофіліптом. Сухий екстракт мучниці звичайної, отриманий 50 % етанолом, виявив найвищу активність по відношенню до *P. aeruginosa* та *C. albicans*.

На сьогоднішній час актуальним є одержання субстанцій зі значним вмістом арбутину та гідрохінонпохідних, тому було розроблено дві схеми одержання екстрактів зі значним вмістом арбутину. Так, фракціонування водного екстракту етилацетатом дозволило отримати сухий екстракт із вмістом арбутину на рівні 19,11 %. При обезжирюванні водного екстракту хлороформом, після очищення на катіоніті КУ2, випарювання та екстракції фенольних сполук етанолом, отримано субстанцію з вмістом арбутину на рівні 31,25 %.

З мучниці звичайної листя були розроблені способи одержання сухих екстрактів, модифікованих 10 різними амінокислотами. Вихід сухих модифікованих екстрактів становив від 28,6 до 36,2 % у залежності від

амінокислоти. Принципові схеми одержання сухих модифікованих екстрактів були запропоновані вперше та захищені 10 патентами України: 5 патентами на винахід 123476, 123477, 123380, 124042, 124043 та 5 патентами на корисну модель 141184, 140872, 140486, 142210 та 142930.

В одержаних модифікованих екстрактах з мучниці листя методом ВЕРХ було ідентифіковано фенологікозид (арбутин), фенолкарбонову кислоту (галову кислоту), 5 флавоноїдів та 4 гідроксикоричні килоти, встановлено їх кількісний вміст. Серед флавоноїдів домінуючими були гіперозид та катехін, серед гідроксикоричних кислот – кофейна та хлорогенова кислоти. Вміст усіх ідентифікованих фенольних сполук у модифікованих екстрактах був нижчий у порівнянні з нативним екстрактом, отриманим 50 % розчином етанолу. В одержаних модифікованих екстрактах мучниці звичайної листя методом СФ встановлено вміст гідрохінонпохідних (у перерахунку на арбутин), гідроксикоричних кислот (у перерахунку на хлорогенову кислоту), флавоноїдів (у перерахунку на рутин) та суми фенольних сполук (у перерахунку на галову кислоту). У модифікованих екстрактах вміст всіх зазначених груп БАР нижчий за екстракт з відвару, тоді як їх гіпоглікемічна дія перевищує екстракт, одержаний 50 % розчином етанолу. Це вказує на те, що додавання амінокислот потенціює дію фенольних сполук мучниці звичайної листя.

У групах тварин, яким вводили досліджувані екстракти у дозі 3000 мг/кг загибелі мишей не спостерігалось, що дає змогу вважати модифіковані екстракти мучниці звичайної листя нетоксичними у обраних дозах. Оскільки дози 3000 мг/кг не призвели до смерті дослідних тварин в усіх групах, можна зробити висновок, що $LD_{50} > 1000$ мг/кг і згідно з класифікацією Сидорова К. К., модифіковані екстракти мучниці звичайної листя можна віднести до IV класу токсичності (малотоксичні сполуки).

Визначено протизапальну активність модифікованих екстрактів мучниці звичайної листя з амінокислотами на моделі карагенінового набряку. Найактивнішими субстанціями, які проявили протизапальну активність, стали

модифіковані екстракти мучниці звичайної листя з лізином, гліцином, аргініном, аланіном, валіном, лейцином і цистеїном.

Дослідження діуретичної активності модифікованих екстрактів мучниці звичайної листя проводили за методом Берхіна. Серед модифікованих екстрактів мучниці звичайної листя найбільш перспективними були екстракти з валіном, гліцином та фенілаланіном.

Вивчення антимікробної активності модифікованих екстрактів мучниці звичайної з амінокислотами провели методом дифузії в агар. Встановлено, що всі досліджувані екстракти мучниці звичайної листя, модифіковані з амінокислотами, проявляють антибактеріальну активність. Виражену антибактеріальну активність щодо штамів *St. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *Pr. vulgaris* ATCC 4636, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *B. subtilis* ATCC 6633 та *C. albicans* ATCC 653/885 проявили екстракти мучниці звичайної листя, модифіковані з лейцином, валіном та препарат порівняння нативний екстракт мучниці звичайної листя, отриманий 50 % розчином етанолу.

Первинний фармакологічний скринінг гіпоглікемічних властивостей нових екстрактів, одержаних з мучниці звичайної листя, з додаванням амінокислот провели на інтактних тваринах за допомогою двох методів – первинного скринінгу і орального тесту толерантності до глюкози. З огляду на те, що глікемічна крива після перорального навантаження та розрахунок площі під кривою здатні певною мірою відобразити процеси утилізації глюкози в організмі експериментальних тварин, можна припустити, що в умовах вуглеводного навантаження саме під дією модифікованих екстрактів мучниці звичайної листя інтенсивність поглинання глюкози тканинами зростає. Експериментально було встановлено, що екстракти з аргініном, цистеїном та глютаміною кислоти підвищували толерантність до вуглеводів у тварин і є найбільш активними.

Гіпоглікемічну та гіполіпідемічну активність найбільш перспективних модифікованих екстрактів мучниці звичайної листя також вивчили на моделі викликаної ісулінорезистентності. Розвиток стану резистентності до інсуліну

супроводжувався розвитком гіперглікемії. Введення екстрактів мучниці звичайної листя призводило до зниження рівня глюкози. При цьому найбільшу активність виявив екстракт з листя мучниці з додаванням аргініну. Розвиток стану резистентності у експериментальних тварин супроводжувався також зниженням рівню ХС-ЛПВГ та підвищенням вмісту ХС-ЛПНГ, що свідчить про формування проатерогенного стану. Введення тваринам екстрактів мучниці мав нормалізуючий вплив на вміст холестерину. Так, вміст ХС-ЛПНГ вірогідно знижувався, а вміст ХС-ЛПВГ підвищувався. Найвищу активність у цьому випадку продемонстрували екстракти з цистеїном і аргініном. Їх активність була вище активності препарату порівняння «Арфазетину» і наближалася до «Метформіну». Встановлено, що сухий екстракт мучниці звичайної листя, модифікований цистеїном, має виражений гіпоглікемічний і панкреопротекторний ефект на моделі інсулінорезистентності, індукованої дексаметазоном. Встановлено, що введення сухого екстракту з мучниці звичайної листя, а також модифікованих сухих екстрактів з цистеїном та аргініном проявляє нормалізуючу дію на метаболічні порушення на тлі високофруктозної дієти, тому вони є перспективними агентами для корекції метаболічного синдрому.

Оскільки найбільш перспективними виявилися екстракти, які були модифіковані цистеїном, фенілаланіном, валіном, гліцином та аргініном, то були запропоновані методи їх стандартизації. У результаті проведених досліджень розроблено проекти МКЯ та згідно з їх вимогами проведено дослідження одержаних сухих екстрактів. Проекти МКЯ на сухі екстракти мучниці звичайної розроблено за такими показниками: опис, розчинність, ідентифікація (ТШХ: метод А (гідрохінонпохідні), В (флавоноїди) та С (амінокислоти)), втрата в масі під час висушування (не більше 10 %), залишкові кількості органічних розчинників (спирт етиловий не більше 1,0 %), важкі метали (не більше 100 ppm), мікробіологічна чистота, вміст гідрохінонпохідних (менше 5 % у перерахунку на арбутин) та флавоноїдів (не

менше 2 % у перерахунку на гіперозид). Усі екстракти відповідали вимогам розробленої документації.

Ключові слова: мучниця звичайна, листя, сухий екстракт, модифікація, амінокислота, біологічно активні речовини, протизапальна, антимікробна, діуретична, гіпоглікемічна та гіполіпідемічна активність.

Список публікацій здобувача

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Чайка Н. Б., Комісаренко М. А., Кошовий О. М., Ковальова А. М., Бородіна Н. В. Дослідження динаміки екстрагування біологічно активних речовин з листя мучниці звичайної. *Фітотерапія. Часопис*. 2019. № 4. С. 64-68. <https://doi.org/10.33617/2522-9680-2019-4-64>. (Особисто здобувачем виконана частина експериментального дослідження, підготовлено статтю до друку).
2. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Комісаренко М. А., Кіреєв І. В., Кравченко Г. Б. Параметри стандартизації модифікованих екстрактів мучниці звичайної листя. *Український біофармацевтичний журнал*. 2020. № 4 (65). С. 16-23. <https://doi.org/10.24959/ubphj.20.293>. (Особисто здобувачем виконана частина експериментального дослідження, підготовлено статтю до друку).
3. Chaika N., Koshovyi O., Raal A., Kireyev I., Zupanets A., Odyntsova V. Phytochemical profile and pharmacological activity of the dry extract from *Arctostaphylos uva-ursi* leaves modified with phenylalanine. *Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science»*. 2020. № 6 (28). P. 74-78. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2020.222511> (Scopus). (Особисто здобувачем проведено аналіз літературних джерел, виконано частину експериментального дослідження, підготовлено статтю до друку).
4. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Комісаренко М. А., Бородіна Н. В., Кіреєв І. В. Фітохімічний профіль і діуретична активність сухих екстрактів із мучниці звичайної листя. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2021. Т. 14. № 1 (35). С. 45-51.

- <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2021.1.226761>. (Особисто здобувачем виконана частина експериментального дослідження, підготовлено статтю до друку).
5. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Мазен М., Кравченко А. Б., Ковальова А. М., Кіреєв І. В. Перспективи створення нового лікарського засобу для корекції метаболічного синдрому на основі БАР мучниці звичайної листя. *Український біофармацевтичний журнал*. 2021. № 1 (66). С. 46-52. <https://doi.org/10.24959/ubphj.21.305>. (Особисто здобувачем виконана частина експериментального дослідження, підготовлено статтю до друку).
 6. Chaika N.B., Koshovyi O.M., Mazen M., Kravchenko G.B., Goryacha O.V., Kireyev I.V., Kovalenko S.M., Darmograi R.E. Research in phytochemical composition and hypoglycemic activity screening of the dry extracts from bearberry leaves. *Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science»*. 2021. № 3 (31). P. 42-50. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2021.235939>. (Scopus). (Особисто здобувачем виконана частина експериментального дослідження, підготовлено статтю до друку).
 7. Kravchenko, G., Krasilnikova, O., Raal, A., Mazen, M., Chaika, N., Kireyev, I., Grytsyk, A., Koshovyi O. (2022). *Arctostaphylos uva-ursi* L. leaves extract and its modified cysteine preparation for the management of insulin resistance: chemical analysis and bioactivity. *Nat. Prod. Bioprospect.* 2022. 12. 30. <https://doi.org/10.1007/s13659-022-00352-1>. (Scopus). (Особисто здобувачем виконана частина експериментального дослідження щодо одержання екстрактів та вивчення їх хімічного складу, статистична обробка результатів, підготовлено статтю до друку).
 8. Кошовий О. М., Кравченко Г. Б., Красільнікова О. А., Чайка Н. Б., Матар М. Спосіб одержання засобу з гіпоглікемічною та ліпотропною дією з листя мучниці звичайної з додаванням цистеїну: пат. на винахід 124043 Україна, № а 2019 10496; заявл. 21.10.2019; опубл. 07.07.2021; Бюл. № 27. 4. (Виконана частина експериментального дослідження, підготовлені матеріали для подання в патентне бюро).

9. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Кіреєв І. В., Ільїна Т. В., Бородіна Н. В. Спосіб одержання засобу з діуретичною дією з листя мучниці звичайної та валіну: пат. на винахід 123476 Україна, № а2019 09314; заявл. 15.08.2019; опубл. 07.04.2021; Бюл. № 14. 4. (Виконана частина експериментального дослідження, підготовлені матеріали для подання в патентне бюро).
10. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Кіреєв І. В., Ільїна Т. В., Бородіна Н. В. Спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу з діуретичною та протизапальною дією з листя мучниці звичайної з валіном: пат. на кор. мод. 141184 Україна, № u2019 9322; заявл. 15.08.2019; опубл. 25.03.2020; Бюл. № 6. 6. (Виконана частина експериментального дослідження, підготовлені матеріали для подання в патентне бюро).
11. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Кіреєв І. В., Комісаренко М. А., Ковальова А. М. Спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу діуретичної дії з листя мучниці звичайної та гліцину: пат. на кор. мод. 140872 Україна, № u2019 09323; заявл. 15.08.2019; опубл. 10.03.2020; Бюл. № 5, 5. (Виконана частина експериментального дослідження, підготовлені матеріали для подання в патентне бюро).
12. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Кіреєв І. В., Комісаренко М. А., Ковальова А. М. Спосіб одержання засобу з діуретичною дією з листя мучниці звичайної та гліцину: пат. на винахід 123477 Україна, № а2019 09327; заявл. 15.08.2019; опубл. 07.04.2021; Бюл. № 14. 4. (Виконана частина експериментального дослідження, підготовлені матеріали для подання в патентне бюро).
13. Кошовий О. М., Кравченко Г. Б., Красільнікова О. А., Чайка Н. Б., Матар М. Спосіб одержання засобу з гіпоглікемічною та гепатопротекторною дією з листя мучниці звичайної з додаванням аргініну: пат. на кор. мод. 142210 Україна, № u 2019 10482; заявл. 21.10.2019; опубл. 25.05.2020; Бюл. № 10. 4. (Виконана частина експериментального дослідження, підготовлені матеріали для подання в патентне бюро).
14. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Кіреєв І. В., Зупанець А. А.,

- Комісаренко А. М. Спосіб одержання лікарського засобу з листя мучниці звичайної та фенілаланіну з діуретичною активністю: пат. на винахід 123380 Україна, № а2019 09321; заявл. 15.08.2019; опубл. 24.03.2021; Бюл. № 12. 4. (Виконана частина експериментального дослідження, підготовлені матеріали для подання в патентне бюро).
15. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Кіреєв І. В., Зупанець А. А., Комісаренко А. М. Спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу з діуретичною дією з листя мучниці звичайної з фенілаланіном: пат. на кор. мод. 140486 Україна, № u2019 09324; заявл. 15.08.2019; опубл. 25.02.2020; Бюл. № 4. 5. (Виконана частина експериментального дослідження, підготовлені матеріали для подання в патентне бюро).
16. Кошовий О. М., Кравченко Г. Б., Красільнікова О.А., Мазен М., Чайка Н.Б.. Спосіб одержання засобу з гіпоглікемічною та ліпотропною дією з листя мучниці звичайної з додаванням цистеїну: пат. на кор. мод. 142930 Україна, № u2019 10495; заявл. 21.10.2019; опубл. 10.07.2020; Бюл. № 13. 4. (Виконана частина експериментального дослідження, підготовлені матеріали для подання в патентне бюро).
17. Кошовий О. М., Кравченко Г. Б., Красільнікова О. А., Чайка Н. Б., Мазен М.. Спосіб одержання засобу з гіпоглікемічною та гепатопротекторною дією з листя мучниці звичайної з додаванням аргініну: пат. на винахід 124042 Україна, № а2019 10483; заявл. 21.10.2019; опубл. 07.07.2021; Бюл. № 27. 4. (Виконана частина експериментального дослідження, підготовлені матеріали для подання в патентне бюро).

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

18. . Vinakova A.E., Chayka N.B., Koshovyi O.M. Research of the dry alcoholic extract from bearberry leaves. *Topical issues of new drugs development: Abstracts of XXIV International Scientific And Practical Conference of Young Scientists and Students (April 20, 2017). Vol. 1. Kh.: Publishing office NUPh, 2017. P. 140.*
19. Polozova A.V., Chayka N.B., Koshovyi O.M. Research in biological active

- substances of the bearberry leaves extract, which was obtained with 50 % ethanol. *Topical issues of new drugs development: Abstracts of XXIV International Scientific And Practical Conference of Young Scientists and Students* (April 20, 2017). Vol. 1. Kh.: Publishing office NUPh, 2017. P. 117.
20. Chaika N., Koshovyi O., Ilina T., Borodina N., Masen M., Kravchenko G. The study of the chemical composition and the hypoglycemic activity of dry extracts from the leaves of bearberry. *Sciences and Practice 2018: the 9th International Pharmaceutical Conference, dedicated to the 100th years anniversary of independent Lithuania's pharmacy, Kaunas, Lithuania, 09th November, 2018. Kaunas, 2018. P. 40.*
21. Чайка Н.Б., Голембіовська О.І., Кошовий О.М. Дослідження сапонінового складу листя мучниці. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів: Матеріали VII науково-практичної конференції з міжнародною участю (27 - 28 вересня 2018 р.)*. Тернопіль: ТДМУ «Укрмедкнига», 2018. С. 50-51.
22. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Ільїна Т. В., Бородіна Н. В. Визначення параметрів стандартизації екстрактів з листя мучниці звичайної. *Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів: мат. III Міжнар. наук.-практ. конференції. У 2-х т. Т. 2. м. Харків, 14-15 бер. 2019 р. Х.: НФаУ, 2019. С. 303.*
23. Chaika N. B., Koshovyi O. M., Kireev I. V., Ilina T. V., Kovalyova A. M. The prospects for creation of a new drug based on a modified extract of bearberry leaves. *Chemistry of Natural Compounds: abstracts XIII International Symposium, October 16–19, 2019, Shanghai. P. 81.*
24. Чайка Н.Б., Рааль А., Кошовий О.М., Кіреєв І.В. Визначення оптимального екстрагенту для екстракції БАР з листя мучниці звичайної. *Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, м. Харків, 19 вересня 2019 р. Х.: НФаУ, 2019. Том. 1, С. 294-296.*
25. Чайка Н.Б., Кошовий О.М., Комісаренко М.А., Кіреєв І.В. Новий

модифікований екстракт з діуретичною активністю на основі бар листя мучниці звичайної та валіну. *Сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження*: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, м. Івано-Франківськ, Яремче, 12-13 травня 2020 р. С. 184

ANNOTATION

Chaika N. B. The phytochemical study of bearberry leaves and creation of new medicines based on them. – A qualifying scientific work as a manuscript.

The thesis for a degree of Doctor of Philosophy (PhD) in speciality 226 “Pharmacy” (22 – “Healthcare”). – National University of Pharmacy, Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2022.

The thesis is devoted to the phytochemical study of bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) leaves and dry extracts from this raw material to create new standardized medicines with diuretic, anti-inflammatory, hypoglycemic and hypolipidemic effects.

The phytochemical screening of the main groups of biologically active substances (BAS) in bearberry leaves showed the presence of hydroquinone derivatives, phenol carboxylic and hydroxycinnamic acids, coumarins, flavanoids, tannins and triterpene saponins. At the same time, such substances as arbutin, gallic, ellagic, protocatechoic, chlorogenic and *p*-coumaric acids, quercetin, rutin, hyperoside, galo- and ellagotannins were identified by TLC. The quantitative content of the main groups of phenolic compounds in the raw material was determined.

Using HPLC, 8 substances were identified in bearberry leaves; among them arbutin, hyperoside and catechin were dominant. Bearberry leaves showed a significant content of phenolic compounds, but only arbutin, 2 phenol carboxylic acids (gallic and ellagic), and 5 flavonoids were identified from the entire variety. Thus, the content of arbutin in the raw material was about 3 %.

Using HPLC, the quantitative content of 8 saponins in bearberry leaves, namely ursolic acid (1.07 %), euscopic acid (0.04 %), tormentinic acid (0.02 %), uvaol (0.35 %), oleanolic acid (0.16 %), erythrodiol (0.16 %), betulin (0.13 %) and lupeol (0.37 %), was identified and determined. The dominant substances were ursolic acid, uvaol and lupeol. Therefore, triterpene saponins of bearberry leaves are represented by derivatives of ursane, oleanane and lupane, among which ursane derivatives dominate (almost 1.5%); they undoubtedly have an impact on the overall diuretic and antimicrobial effect of this raw material.

The study of compounds of the volatile fraction of bearberry leaves was performed by the GC-MS method. The content of the volatile fraction substances was 14.46 mg/100 g of the raw material, 42 substances were detected, of them only 26 substances were identified. In this case, the main substances were octane, camphor, 2,4-decadienal, hexadecane, hexahydropharnesylacetone, phytol, ethyl palmitate, ethyllinoleate, 4,8,12,16-tetramethylheptadecane-4-olide, pentacosan, hexacosan, nonacosan, untriacontan and tritriacontan; among them nor-olean-12-ene, untriacontan, nonacosan and phytol dominated.

To determine the optimal BAS extractant from bearberry leaves, five dry extracts were obtained using water, 30, 50, 70 and 96% ethanol. At the same time, the yield of dry extracts, depending on the extractant, was 16.72 ± 0.32 %; 13.12 ± 0.63 %; 11.84 ± 0.41 %; 10.09 ± 0.28 % and 6.72 ± 0.76 %, respectively. Using the HPLC method, the content of the main BAS of phenolic nature and saponins – arbutin, 2 phenol carboxylic acids, 6 flavonoids and 8 saponins – was determined in the dry extracts from bearberry leaves obtained. The results show that arbutin and saponins are better extracted with water and weak ethanol solutions, while 50-70 % ethanol is an extractant for phenol carboxylic acids and flavonoids. The results of studying the quantitative content of the main groups of BAS by spectrophotometry showed that bearberry leaves with ordinary water and 30% ethanol solution provided the best extraction of hydroquinone derivatives; hydroxycinnamic acids were better extracted with water-alcohol solutions in the concentrations of 30-50%, and flavonoids – in the concentrations of 50-70 %. Taking into account the yield of

extracts, the content of various groups of phenolic compounds and the economic factor it was found that 50% ethyl alcohol was the optimal extractant for obtaining medicines from bearberry leaves based on phenolic compounds, while purified water was the optimal extractant for obtaining extracts rich in hydroquinone derivatives. It was found that the optimal frequency of water and water-alcohol extraction (50% ethanol) from this raw material was two times. This fact will be used in the development of technology for obtaining new dry extracts from bearberry leaves.

The diuretic and antimicrobial activity of the dry extracts of bearberry leaves obtained was studied. As a result of the study of the diuretic activity of bearberry leaf extracts, it was found that the extract obtained with 50% ethanol in the dose of 50 mg/kg had the greatest diuretic activity, increasing diuresis by 70%, which was 22% less than the activity of the drug "Hypothiazid" in the dose of 25 mg/kg. The diuretic activity of the extract obtained with 96% ethanol in the dose of 50 mg/kg was 33%; it was 59% less than the activity of the reference drug. Dry extracts of bearberry leaves showed the same activity against *St. aureus*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* and *C. albicans* as for a decoction of bearberry leaves. The extracts obtained exhibited a wider spectrum of the antimicrobial activity compared to the reference drug "Chlorophyllipt". The dry bearberry extract obtained with 50% ethanol showed the highest activity against *P. aeruginosa* and *C. albicans*.

Currently, it is relevant to obtain substances with a significant content of arbutin and hydroquinone derivatives. Therefore, two flow sheets for obtaining extracts with a significant content of arbutin were developed. Thus, fractionation of the aqueous extract with ethyl acetate made it possible to obtain a dry extract with the arbutin content of 19.11 %. When the aqueous extract was degreased with chloroform after purification on Cu₂ cationite, evaporation and extraction of phenolic compounds with ethanol, a substance with the arbutin content of 31.25 % was obtained.

Methods for obtaining dry extracts modified with 10 different amino acids were developed from bearberry leaves. The yield of dry modified extracts ranged from 28.6 to 36.2%, depending on the amino acid. The flow sheets for obtaining dry

modified extracts were proposed for the first time and protected by 8 Ukrainian patents: 4 invention patents 123476, 123477, 123380, 124042 and 4 utility model patents 141184, 140872, 140486 and 142930.

Phenologlycoside (arbutin), phenol carboxylic acid (gallic acid), 5 flavonoids and 4 hydroxycinnamic acids were identified in the modified extracts from bearberry leaves obtained by HPLC, and their quantitative content was found. Hyperoside and catechin were dominant among flavonoids, while caffeic and chlorogenic acids were dominant among hydroxycinnamic acids. The content of all phenolic compounds identified in the modified extracts was lower compared to the native extract obtained with 50% ethanol solution. In the modified extracts of bearberry leaves obtained the content of hydroquinone derivatives (calculated with reference to arbutin), hydroxycinnamic acids (calculated with reference to chlorogenic acid), flavonoids (calculated with reference to rutin) and the total amount of phenolic compounds (calculated with reference to gallic acid) was determined using spectrophotometry. In modified extracts, the content of all these groups of BAS was lower than in the extract from the decoction, while their hypoglycemic effect exceeded the extract obtained with 50% ethanol solution. This suggests that the addition of amino acids potentiates the action of phenolic compounds of bearberry leaves.

In the groups of animals that were injected with the extracts under study in the dose of 3000 mg/kg, no death of mice was observed. It allows us to consider modified extracts of bearberry leaves to be non-toxic in the doses selected. Since doses of 3000 mg/kg did not lead to the death of experimental animals in all groups, it could be concluded that $LD_{50} > 1000$ mg/kg, and according to the classification of Sidorov K. K., modified extracts of bearberry leaves could be referred to the IV class of toxicity (low-toxic compounds).

The anti-inflammatory activity of modified bearberry leaf extracts with amino acids was determined on the model of carrageenan-induced edema. The most active substances that showed the anti-inflammatory activity were modified extracts of bearberry leaves with lysine, glycine, arginine, alanine, valine, leucine and cysteine.

The diuretic activity of modified extracts of bearberry leaves was studied according to the Berchin's method. Among the modified bearberry leaf extracts, the most promising were extracts with valine, glycine and phenylalanine.

The antimicrobial activity of modified bearberry extracts with amino acids was studied by diffusion into agar. It has been found that all the extracts of bearberry leaves under study modified with amino acids exhibit the antibacterial activity. A pronounced antibacterial activity against strains of *St. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *Pr. vulgaris* ATCC 4636, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *B. subtilis* ATCC 6633 and *C. albicans* ATCC 653/885 was shown by the extracts of bearberry leaves modified with leucine, valine and the reference drug – native bearberry leaf extract obtained with 50 % ethanol solution.

The primary pharmacological screening of hypoglycemic properties of new extracts obtained from bearberry leaves with the addition of amino acids was performed on intact animals using two methods – primary screening and oral glucose tolerance test. Taking into account the fact that the glycemic response curve after oral loading and the calculation of the area under the curve can reflect to a certain extent the processes of glucose utilization in the body of experimental animals it can be assumed that under the conditions of carbohydrate load it is under the action of modified extracts of bearberry leaves that the intensity of glucose absorption by tissues increases. It was experimentally found that extracts with arginine, cysteine and glutamic acid increased carbohydrate tolerance in animals and were the most active.

The hypoglycemic and hypolipidemic activity of the most promising modified bearberry leaf extracts was also studied on the model of induced insulin resistance. The development of the insulin resistance state was accompanied by the development of hyperglycemia. The introduction of bearberry leaf extracts led to a decrease in glucose levels. At the same time, the extract from bearberry leaves with the addition of arginine showed the greatest activity. The development of the resistance state in experimental animals was also accompanied by a decrease in the level of HDL-C and an increase in the content of LDL-C, indicating the formation

of the proatherogenic state. The introduction of bearberry extracts to animals had a normalizing effect on the cholesterol content. Thus, the LDL-C content significantly decreased, while the HDL-C content increased. Extracts with cysteine and arginine showed the highest activity in this case. Their activity was higher than that of the reference drug “Arphasetin” and was close to “Metformin”. It has been found that the dry bearberry leaf extract modified with cysteine has a pronounced hypoglycemic and pancreoprotective effect on the model of dexamethasone-induced insulin resistance. It has been found that the introduction of the dry extract from bearberry leaves, as well as modified dry extracts with cysteine and arginine, has a normalizing effect on metabolic disorders against the background of a high-fructose diet, therefore, they are promising agents for the correction of the metabolic syndrome.

Since the most promising extracts were those that were modified with cysteine, phenylalanine, valine, glycine, and arginine, the methods for their standardization were proposed. As a result of the research conducted, the projects of the Drug Quality Control Methods (DQCM) were developed, and in accordance with their requirements the dry extracts obtained were studied. The projects of DQCM for the bearberry dry extracts were developed according to the following indicators: description, solubility, identification (TLC: method A (hydroquinone derivatives), B (flavonoids) and C (amino acids)), loss on drying (not more than 10 %), residual amounts of organic solvents (ethyl alcohol not more than 1.0 %), heavy metals (not more than 100 ppm), microbiological purity, the content of hydroquinone derivatives (less than 5 % calculated with reference to arbutin) and flavonoids (not less than 2 % calculated with reference to hyperoside). All extracts met the requirements of the documentation developed.

Key words: bearberry, leaves, dry extract, modification, aminoacid, biologically active substances, anti-inflammatory, antimicrobial, diuretic, hypoglycemic and hypolipidemic activity.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	21
ВСТУП.....	24
РОЗДІЛ 1 МУЧНИЦЯ ЗВИЧАЙНА (<i>ARCTOSTAPHYLOS UVA-URSI</i> L. SPRENG.) – ДЖЕРЕЛО БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН ТА ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ (огляд літератури).....	31
1.1 Ботанічна характеристика.....	31
1.2 Ареал зростання рослини, заготівля сировини.....	33
1.3 Хімічний склад	35
1.4 Фармакологічні властивості та застосування у медичній та фармацевтичній практиці.....	48
РОЗДІЛ 2 ВІДОМОСТІ ПРО МАТЕРІАЛИ, ПРИЛАДИ, РЕАКТИВИ ТА МЕТОДИКИ	59
РОЗДІЛ 3 ФІТОХІМІЧНИЙ СКРИНІНГ ОСНОВНИХ ГРУП БАР У МУЧНИЦІ ЗВИЧАЙНОЇ ЛИСТІ ТА ОДЕРЖАННЯ ГАЛЕНОВИХ ЕКСТРАКТІВ НА ЇХ ОСНОВІ.....	76
3.1 Хроматографічний скринінг основних груп БАР у мучниці звичайної листі.....	76
3.1.1 Ідентифікація арбутину.....	77
3.1.2 Ідентифікація фенолкарбонових кислот	77
3.1.3 Ідентифікація гідроксикоричних кислот	78
3.1.4 Ідентифікація кумаринів	78
3.1.5 Ідентифікація флавоноїдів	79
3.1.6 Ідентифікація дубильних речовин	80
3.1.7 Ідентифікація тритерпенових сапонінів.....	81
3.2 Дослідження фенольних сполук мучниці звичайної листя методом ВЕРХ.....	81
3.3 Дослідження тритерпенових сапонінів мучниці звичайної листя методом ВЕРХ.....	82
3.4 Дослідження сполук легкої (гексанової) фракції мучниці звичайної листя методом ГХ-МС	85

3.5 Вибір оптимального екстрагенту для екстракції БАР з мучниці звичайної листя.....	87
3.6 Визначення оптимальної кратності екстракції при одержанні екстрактів.....	94
3.6.1 Екстракція водою очищеною	94
3.6.2 Екстракція 50 % розчином етанолу	97
РОЗДІЛ 4 ФІТОХІМІЧНЕ ТА ФАРМАКОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ НОВИХ НОВОГАЛЕНОВИХ ЕКСТРАКТІВ МУЧНИЦІ ЗВИЧАЙНОЇ ЛИСТЯ.....	105
4.1 Одержання та дослідження новогаленових екстрактів мучниці звичайної листя з високим вмістом арбутину	105
4.1.1 Одержання та дослідження новогаленового екстракту фракціонуванням етилацетатом	105
4.1.2 Одержання та дослідження новогаленового очищеного екстракту	107
4.2 Схеми одержання новогаленових екстрактів мучниці звичайної листя, модифікованих амінокислотами.....	110
4.3 Фітохімічне дослідження БАР модифікованих екстрактів мучниці звичайної листя.....	111
4.4 Дослідження токсичності.....	118
4.5 Скринінг протизапальної активності.....	118
4.6 Скринінг діуретичної активності.....	128
4.7 Скринінг антимікробної активності	132
4.8 Скринінг гіпоглікемічної активності.....	134
4.9 Дослідження гіпоглікемічної та гіполіпідемічної активності екстрактів на моделі експериментальної інсулінорезистентності.....	140
4.10 Дослідження панкреопротекторної активності.....	143
РОЗДІЛ 5. ВИЗНАЧЕННЯ ПАРАМЕТРІВ СТАНДАРТИЗАЦІЇ МУЧНИЦІ ЗВИЧАЙНОЇ ЛИСТЯ ЕКСТРАКТІВ СУХИХ.....	155
ВИСНОВКИ	167
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	170
ДОДАТКИ	188

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- АЛТ – аланінамінотрансфераза;
- АТФ – аденозинтрифосфат;
- БАР – біологічно активні речовини;
- ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія;
- ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я;
- ВФД – дієта збагачена фруктозою;
- ГАМК – гамма-аміномасляна кислота;
- ГХ-МС – газова хроматографія – мас-спектрометрія;
- ДСЗ – державний стандартний зразок;
- ДФУ – Державна фармакопея України;
- ІР – інсулінорезистентність;
- ЛР – лікарська рослина;
- ЛРС – лікарська рослинна сировина;
- МКЯ – методи контролю якості;
- МОЗ – міністерство охорони здоров'я;
- МСР-1 – білок хемоаттрактанта моноцитів-1 (monocyte chemoattractant protein-1);
- НАМН – Національна академія медичних наук;
- НД – нормативна документація;
- НФаУ – Національний фармацевтичний університет;
- ОТТГ – оральний тест толерантності до глюкози;
- ПЕ – екстракт мучниці звичайної листя, отриманий 50 % розчином етанолу;
- ПЕА – екстракт мучниці звичайної листя, модифікований аланіном;
- ПЕАр – екстракт мучниці звичайної листя, модифікований аргініном;
- ПЕВ – екстракт мучниці звичайної листя, модифікований валіном;
- ПЕГ – екстракт мучниці звичайної листя, модифікований гліцином;
- ПЕГі – екстракт мучниці звичайної листя, модифікований гістидином;
- ПЕГлу – екстракт мучниці звичайної листя, модифікований глютаміновою

кислотою;

ПЕЛ – екстракт мучниці звичайної листя, модифікований лейцином;

ПЕЛі – екстракт мучниці звичайної листя, модифікований лізином;

ПЕФ – екстракт мучниці звичайної листя, модифікований фенілаланіном;

ПЕЦ – екстракт мучниці звичайної листя, модифікований цистеїном;

ПХ – паперова хроматографія;

РСЗ – робочий стандартний зразок;

СФ – спектрофотометрія;

ТШХ – тонкошарова хроматографія;

УФ – ультрафіолетовий;

ФСЗ – фармакопейний стандартний зразок;

ХС-ЛПВГ – холестерину ліпопротеїдів високої густини;

ХС-ЛПНГ – холестерину ліпопротеїдів низької густини;

ЦД – цукровий діабет;

ЦД2 – цукровий діабет другого типу;

ЦНДЛ – Центральна науково-дослідна лабораторія;

ЦНС – центральна нервова система;

АІ – відвар арфазетину;

AUC – площа глюкози під кривою;

САТ – каталаза;

ДС – дієнові кон'югати;

Dex – дексаметазон;

Dex_grph – група тварин, яким вводили дексаметазон та відвар арфазетину;

Dex_cys – група тварин, яким вводили дексаметазон та цистеїн;

Dex_met – група тварин, яким вводили дексаметазон та метформін;

Dex_ПЕ – група тварин, яким вводили дексаметазон та екстракт мучниці;

Dex_ПЕЦ – група тварин, яким вводили дексаметазон та екстракт мучниці, модифікований цистеїном;

GLUT4 – ізоформи глюкозного транспортера;

GSH – відновлений глутатіон;

GSH-Rx – глутатіонпероксидаза;

IC – інтактні тварини;

ICAM-1 – молекули міжклітинної адгезії 1 (intercellular adhesion molecules 1);

JNK – c-Jun N-кінцева кінза;

MAP-кінза – мітогенактивована кінза;

NF-каппаВ – каппа-підсилювача легких ланцюгів активованих β -клітин;

NMDA – глутаматні рецептори;

p-JNK – фосфорильована c-Jun N-кінцева кінза;

ROS – активні форми кисню;

SAB – стресактивований протеїн;

SOD – супероксиддисмутаза;

TBARS – тіобарбітурової кислоти активні продукти;

VCAM-1 – молекули судинної клітинної адгезії 1 (vascular cellular adhesion molecules 1).

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження

Хвороби сечовивідних шляхів і нирок займають провідне місце поміж захворювань у всьому світі. В Україні кожна четверта людина схильна до захворювань сечовивідної системи та майже для 10 % населення притаманні ознаки хронічних захворювань нирок. Для лікування захворювань сечовивідної системи застосовують відвар мучниці звичайної листя.

Мучниці звичайної листя входить до ДФУ та є одним з найбільш широко використовуваних видів офіцінальної лікарської рослинної сировини з діуретичною та уроантисептичною дією.

У мучниці звичайної листі виявлено прості феноли: арбутин, метиларбутин; гідроксикоричні кислоти: кофейну, ферулову та протокатехову кислоти; флавоноїди: кверцетин, мірицетин та їх глікозиди, катехін, антоціани: дельфінідин та ціанідин; дубильні речовини, іридоїди: асперулозид, монотропеїн; алантоїн; сапоніни: α -амірин, α -аміринацетат, олеанолову, урсолову, бетулінову кислоти, уваол, лупеол та стероїди: β -ситостерол, стигмастерол. Однак, фармацевтичною промисловістю, в основному, використовуються гідрохінонпохідні цієї рослини, у той час, як вона багата і на інші фенольні сполуки, які потенційно мають протизапальну, гіпоглікемічну та гіполіпідемічну дію.

Галенові засоби або суха сировина входять до складу лікарських препаратів, функціональних та дієтичних добавок. Аналіз українського ринку показав, що на основі БАР мучниці звичайної існує 19 препаратів, з них 8 (53 %) вітчизняного виробництва. Вітчизняні лікарські засоби представлені фасованою сировиною та комплексними зборами. При цьому, на ринку України немає жодного стандартизованого вітчизняного галенового або новогаленового лікарського засобу на основі мучниці листя, тому розробка нових лікарських засобів на їх основі є актуальною.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційну роботу виконано відповідно до плану проблемної комісії «Фармація» МОЗ та НАМН України як фрагмент комплексної наукової роботи Національного фармацевтичного університету «Фармакогностичне дослідження лікарської рослинної сировини та розробка фітотерапевтичних засобів на її основі» (номер державної реєстрації 0114U000946).

Мета і завдання роботи

Метою дисертаційної роботи було фітохімічне вивчення мучниці звичайної листя та нових сухих екстрактів з цієї сировини для створення нових стандартизованих лікарських засобів з діуретичною, протизапальною, гіпоглікемічною, гіполіпідемічною та панкреопротекторною дією.

Для досягнення цієї мети були поставлені такі завдання:

- Узагальнити дані наукових першоджерел з ботанічної характеристики, ареалу зростання, методів заготівлі, сушки та зберігання сировини, вивчення хімічного складу та застосування мучниці звичайної листя та лікарських засобів на їх основі у медичній та фармацевтичній практиці.
- Вивчити якісний склад та кількісний вміст БАР мучниці звичайної листя.
- Розробити схеми одержання нових сухих очищених та модифікованих екстрактів з мучниці звичайної листя.
- Дослідити якісний склад та кількісний вміст БАР у одержаних екстрактах.
- Визначити параметри стандартизації одержаних екстрактів з мучниці звичайної листя та розробити відповідні проекти МКЯ.
- Підтвердити перспективність створення нових лікарських засобів шляхом вивчення протизапальної, антимікробної, діуретичної, гіпоглікемічної, гіполіпідемічної та панкреопротекторною активності екстрактів.

Об'єкт дослідження: фітохімічне вивчення мучниці звичайної листя, сухих екстрактів на його основі для створення нових стандартизованих лікарських засобів з діуретичною, антимікробною, протизапальною, гіпоглікемічною, гіполіпідемічною та панкреопротекторною активністю.

Предмет дослідження: виявлення, ідентифікація і кількісний вміст БАР у листі та сухих екстрактах мучниці звичайної листя; параметри стандартизації одержаних екстрактів; протизапальна, антимікробна, діуретична, протизапальна, гіпоглікемічна, гіполіпідемічна та панкреопротекторна активність екстрактів.

Методи дослідження

Для вирішення поставлених завдань використані сучасні методи досліджень: тонкошарова хроматографія (ТШХ), паперова хроматографія (ПХ), високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), хромато-мас-спектрометрія (ГХ-МС), спектрофотометрія (СФ) в УФ і видимій областях спектру; дослідження біологічної активності проводили за допомогою методів *in vivo* (протизапальна активність – на моделі гострого запального карагенінового набряку, діуретична – за методом Берхіна, гіпоглікемічна – первинний скринінг і оральний тест толерантності до глюкози; модель викликаної інсулінорезистентності; гіполіпідемічна – модель викликаної інсулінорезистентності) та *in vitro* (антибактеріальна активність – методом дифузії в агар). Статистичну обробку одержаних результатів досліджень проводили за допомогою комп'ютерної програми Excel-7.0 (Microsoft Corp., США).

Наукова новизна отриманих результатів

Фітохімічний скринінг БАР у мучниці звичайної листі дозволив виявити 8 речовин фенольної природи, серед яких домінуючими були арбутин, гіперозид та катехін, 8 тритерпенових сапонінів, серед яких домінуючими були урсолова кислота, уваол та лупеол, 42 речовини легкої фракції, з яких тільки 26 вдалося ідентифікувати.

Встановлено, що з мучниці звичайної листя водою та 30 % розчином етанолу забезпечується краща екстракція гідроксикоричних кислот; гідроксикоричні кислоти краще екстрагуються водно-спиртовими розчинами у концентраціях 30-50 %, флавоноїди – у концентраціях 50-70 %. Визначено оптимальну кратність водної екстракції листя мучниці звичайної, яка

становить два рази.

Уперше розроблено дві схеми одержання екстрактів зі значним вмістом арбутину. Фракціонування водного екстракту мучниці звичайної листя етилацетатом дозволило отримати сухий екстракт із вмістом арбутину на рівні 19,11 %. При обезжирюванні водного екстракту хлороформом, очищенням на катіоніті КУ2, випарюванням та екстракцією фенольних сполук етанолом, отримано субстанцію з вмістом арбутину 31,25 %.

Уперше розроблено схеми одержання нових модифікованих екстрактів з мучниці звичайної листя з використання 10 амінокислот. Новизна розроблених схем одержання найбільш перспективних модифікованих екстрактів підтверджена та захищена 10 патентами України: 5 патентами на винахід 123476, 123477, 123380, 124042, 124043 та 5 патентами на корисну модель 141184, 140872, 140486, 142210 та 142930.

Уперше в одержаних модифікованих екстрактах з мучниці звичайної листя методом ВЕРХ було ідентифіковано 1 фенологікозид (арбутин), 1 фенолкарбонову кислоту (галову кислоту), 5 флавоноїдів та 4 гідроксикоричні кислоти, встановлено їх кількісний вміст. Серед флавоноїдів домінуючими були гіперозид та катехін, серед гідроксикоричних кислот – кофейна та хлорогенова кислоти.

Уперше досліджено антимікробну, протизапальну, діуретичну, гіпоглікемічну, гіполіпідемічну та панкреопротекторну активності одержаних модифікованих екстрактів мучниці звичайної листя. Сухий екстракт з цистеїном мав виражену панкреопротекторну активність. Сухі екстракти, модифіковані цистеїном та аргініном, проявляли найбільш виражену нормалізуючу дію на метаболічні порушення на тлі високофруктозної дієти (гіпоглікемічна та гіполіпідемічна дія), тому вони є перспективними агентами для корекції метаболічного синдрому.

Практичне значення отриманих результатів

Розроблено схеми одержання сухих екстрактів мучниці звичайної листя зі значним вмістом арбутину та екстрактів, модифікованих амінокислотами,

які виявились перспективними субстанціями для створення нових лікарських засобів з діуретичною, антимікробною, протизапальною, гіпоглікемічною, гіполіпідемічною та панкреопротекторною діями.

За результатами досліджень розроблено проекти МКЯ на найбільш перспективні сухі екстракти з мучниці звичайної листя, які були модифіковані цистеїном, фенілаланіном, валіном, гліцином та аргініном.

Розроблені схеми одержання сухих модифікованих екстрактів з мучниці звичайної листя апробовано на обладнанні ТОВ «КФК «Грін фарм Косметик». Проекти технологічних схем та проекти МКЯ на розроблені субстанції передано для подальшого впровадження у виробництво у компаніях ТОВ «КФК «Грін фарм Косметик» (м. Харків, Україна) та Vgrpharmexport SRL (м. Брюссель, Бельгія).

Результати досліджень упроваджено у навчальний процес і науково-дослідну роботу кафедри ботаніки Національного фармацевтичного університету; кафедри фармакогнозії і ботаніки Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького; кафедри фармакогнозії, фармакології та ботаніки Запорізького державного медичного університету; кафедри фармації Івано-Франківського національного медичного університету; кафедри фармакології та фармакогнозії Одеського національного медичного університету; кафедри фармацевтичної та біологічної хімії, фармакогнозії Київського медичного університету; кафедри технології біологічно активних сполук фармації та біотехнології Національного університету «Львівська політехніка».

Особистий внесок здобувача

Дисертаційна робота є самостійною завершеною працею. Автором особисто здійснено патентно-інформаційний пошук, проаналізовано і систематизовано дані першоджерел, проведено дослідження з вивчення якісного складу і кількісного вмісту БАР у об'єктах дослідження. Розроблено схеми одержання екстрактів з мучниці звичайної листя. Визначено основні показники якості екстрактів; розроблено проекти МКЯ на сухі екстракти.

Проведено графічну і статистичну обробку одержаних результатів, описано всі розділи дисертаційної роботи. Постановку мети, завдань, узагальнення результатів, формулювання основних положень і висновків здійснено за участі наукового керівника. Дослідження фармакологічних властивостей одержаних екстрактів проведено на базі ЦНДЛ НФаУ під керівництвом професора Кіреєва І. В., доцента Кравченко Г.Б. та аспіранта Мазена М. Співавторами наукових праць є науковий керівник і науковці, спільно з якими проведено дослідження. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, дисертанту належить фактичний матеріал та основний творчий доробок.

Апробація матеріалів дисертації

Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня, а саме: XXIV міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Topical issues of new drugs development» (м. Харків, April 20, 2017); 9 міжнародній фармацевтичній конференції, присвяченій 100-річному незалежній фармації Литви (the 9th International Pharmaceutical Conference, dedicated to the 100th years anniversary of independent Lithuania's pharmacy) «Sciences and Practice 2018» (Kaunas, Lithuania, 09th November, 2018.); VI науково-практичній конференції з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (Тернопіль, 27 - 28 вересня 2018 р.); III Міжнародній науково-практичній конференції «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів» (м. Харків, 14-15 бер. 2019 р.); XIII International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds (Shanghai, China, October 16–19, 2019); Науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченої 20-й річниці заснування Дня фармацевтичного працівника України «Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку» (м. Харків, 19 вересня 2019 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження» (м. Івано-Франківськ, Яремче, 12-13

травня 2020 р.).

Структура та обсяг дисертації

Дисертації викладена на 228 сторінках, складається з анотації, вступу, 5 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел та додатків. Робота ілюстрована 23 таблицями та 34 рисунками. Список використаних джерел містить 166 найменувань, з них 68 кирилицею та 98 латиницею.

РОЗДІЛ 1

МУЧНИЦЯ ЗВИЧАЙНА (*ARCTOSTAPHYLOS UVA-URSI* L. SPRENG.) – ДЖЕРЕЛО БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН ТА ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ (огляд літератури)

1.1 Ботанічна характеристика

Мучниця звичайна (лат. *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng.) – типовий представник роду Мучниця (*Arctostaphylos*), відноситься до родини Вересові (*Ericaceae*). Вічнозелений приземкуватий гіллястий кущик. Наукова родова назва утворена від грец. ἀρκτος - «ведмідь» і σταφυλή - «лоза», видовий епітет *uva-ursi* – від латинських (лат. *uva* – язичок і *ursus* – ведмідь) (рис.1.1) [51].

Таксономічне положення: домен еукаріоти, царство рослини, відділ покритонасінні, клас дводольні, порядок *Ericales* (Вересоцвіткові), родина *Ericaceae* (Вересові), рід *Arctostaphylos* (Мучниця).



Рис. 1.1 Мучниця звичайна (*Arctostaphylos uva-ursi* L. Spreng.)

Стебла стеляться, дуже розгалужені, які досягають 1,5 м завдовжки з жовтою корою. Молоді пагони зелені чи зеленувато-бурі, опушені, старі лежачі, з червонувато-бурою корою, яка відшаровується. Листя почергові, товсті, дрібні, шкірясті, продовгувато-обернено-яйцеподібні, на верхівці округлі, суцільнокраї, зверху темно-зелені, блискучі, зморшкуваті від вдавлених жилок, знизу більш світлі. Листя живе 2 роки, до кінця 3-го року відмирає [33, 51].

Квітки мучниці звичайної на коротких квітконіжках, 4–6 квіточок у пониклих верхівкових китицях, дрібні, правильні, двостатеві, з 1 чи 2 дуже дрібними приквітниками. Чашечка п'ятироздільна, маленька, непадаюча. Віночок колесоподібний, з 5-зубчастим відігнутих краєм, зверху рожевий, знизу білий [33, 51].

Плід – червона, мучниста, прісно-солодка, шароподібна кістянка з 5 кісточками. Цвіте у травні-червні, плоди дозрівають у липні-серпні. Розмножується вегетативно, хоча можливе розмноження насінням [47, 51].

При перегляді мікропрепарату листа під мікроскопом виявляються анатомо-діагностичні ознаки, які характерні для мучниці звичайної листа: фрагменти епідермісу, який складається з багатокутних ізодіаметричних клітин із прямими товстими стінками, з виступаючими продихами аномоцитного типу (довжиною 41-54 мкм, шириною 37-50 мкм) з вузькою продиховою щілиною, які оточені 8 (5-9) навколопродиховими клітинами, які дрібніші за інші клітини епідермісу. Зустрічаються фрагменти паренхіми та жилок з кристалами оксалату кальцію у вигляді призм, їх відростків і друз. Дуже рідко зустрічаються 1-2 клітинні товстостінні з бородавчастою поверхнею конусоподібні прямі і зігнуті (гачкоподібні) прості (довжиною до 187 мкм) і головчасті волоски на 1-2 клітинній ніжці, з 2-6 клітинною дворядною головкою. Присутні фрагменти губчастої рихлої паренхіми з крупними повітроносними порожнинами, фрагменти епідермісу черешки з клітинами майже прямокутної форми з рівними стінками, з простими та головчастими волосками (рис 1.2) [47, 51].

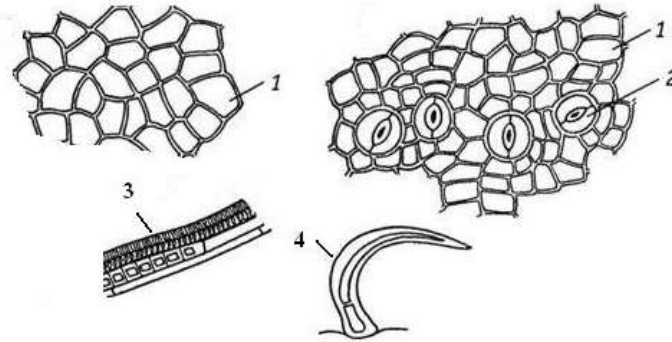


Рис. 1.2 Мікроскопія листа мучниці:

1 – клітина епідермісу, 2 – продих, 3 – призматичні кристали уздовж жилки (в клітинах обкладки), 4 – волосок [47]

Відомо, що на коренях *Arctostaphylos uva-ursi* L. знаходиться арбутоїдна мікориза. Типова ектомікориза сосни звичаної (*P. Abies*) була виявлена у тісному взаємозв'язку з мучницею та відома як надзвичайно неспецифічний фітобіонт. Мікориза, утворена як на *Arctostaphylos uva-ursi* L., так і на *P. abies* L., демонструє типові ознаки ектомікоризів. Основна відмінність мікоризних симбіозів від різних фітобіонтів – це поява внутрішньоклітинних гіф у епідермальних клітинах коренів мучниці звичайної [104, 124].

1.2 Ареал зростання рослини, заготівля сировини

Мучниця звичайна поширена у субальпійській та лісотундровій зонах Середньої і Північної Європи, досягаючи широти 70° на півдні. У Південній та Центральній Європі зустрічається в Альпах, Апеннінах та на Балканах на висоті від 1500 до 2900 м над рівнем моря. Зустрічається також у субальпійському і лісотундровому поясах в Сибіру і у горах Центральної Азії, на Кавказі, на Далекому Сході, на півночі Сполучених Штатів Америки (на Алясці), у Канаді, у південно-західній Гренландії та на Алеутських островах [8, 42].

На території України мучниця звичайна зустрічається у Карпатах, поширена на Поліссі. Райони збирання мучниці звичайної листя зосереджені у Львівській, Івано-Франківській, Рівненській, Волинській, Житомирській, Київській та Чернігівській областях. Запаси сировини в Україні незначні, промислова заготівля недоцільна. Рослина потребує бережливого використання, охорони і відновлення [8, 66].

Мучниця звичайна зростає у сухих розріджених соснових та листяних лісах, на гарі та вирубках, на приморських дюнах, кам'янистих та щербенистих осипах; на крайній півночі зустрічається у лишайниковій тундрі [8].

Характерна особливість мучниці звичайної – наявність ендотрофної і екзотрофної мікоризи [99, 124], у зв'язку з чим для її розвитку необхідна наявність у ґрунті утворюючих мікоризу грибів, які враховуються при введенні мучниці звичайної у культуру.

Заготівля сировини – мучниці звичайної листя. Збір листя мучниці звичайної проводять у два строки: навесні – до цвітіння або на самому початку цвітіння (з кінця квітня до середини червня) і восени – з моменту дозрівання плодів до їх осипання (з кінця серпня до середини жовтня). Після цвітіння починається різкий приріст молодих пагонів. Листя, зібране у цей час, при сушінні стають бурими та, потрапляючи до сировини, роблять її нестандартною. Крім того, у період відростання молодих пагонів листя містять мінімальну кількість діючих речовин [17]. Тому з середини червня до кінця серпня заготівля сировини мучниці звичайної не проводиться.

При заготівлі сировини олістяні гілочки мучниці звичайної відрубують мотикою чи довгим гострим ножом та без упаковки транспортують до місця сушіння. Потім їх в'яжуть у пучки, попередньо обтрусивши відмерле почорніле листя, шматочки кори та пісок, сушать на відкритому повітрі під навісами чи на горищах з доброю вентиляцією. Висушене листя мучниці звичайної відокремлюють від стебел, прибирають вручну домішки та стеблові частини, просівають крізь сито для очищення сировини від механічних та

мінеральних домішок. Строк придатності мучниці звичайної листя 5 років. Запах у сировини відсутній, смак сильно в'язучий та гіркуватий [17].

Встановлено, що вміст арбутину у листі мучниці звичайної варіюється від 6,30 до 9,16 % в залежності від часу заготівлі. Виявлено, що осінь є кращим періодом, ніж весна для збору сировини цієї рослини для того, щоб отримати найбільший вихід арбутину [126, 127].

Повторну заготовку можна проводити на одному місці через 3 роки. При заготівлі всіх наземних неогрубілих пагонів відновлення заростів проходить повільно, тому повторна заготівля можлива лише через 5-6 років. Висмикувати всі рослини з коренями неможна, так як це веде до знищення заростів, відновити які практично неможливо [17].

Під час збору *Arctostaphylos uva-ursi* L. плутають з брусницею (*Vaccinium vitis-idaea* L.) та самшитом вічнозеленим (*Buxus sempervirens* L.). Отруйний самшит вічнозелений (подібний за морфологічними характеристиками, але не містить арбутин) [17, 140].

1.3 Хімічний склад

Згідно з науковими першоджерелами мучниці звичайної листя містить три основні групи фенольних сполук: прості феноли, флавоноїди і дубильні речовини.

Основним та найважливішим фенольним компонентом, який міститься у мучниці звичайної листі є арбутин (до 10 %) (гідрокінон-D-O-глюкопіранозид), однак метиларбутин (до 4 %) і вільні аглікони також розглядаються як основні фенольні складові [152].

Арбутин іноді називають β -арбутином, щоб відрізнити його від діастереомерної форми α -арбутину (α -конфігурація у аномерному центрі), що не є природним продуктом. α -Арбутин, має схожі, але не однакові біологічні властивості. Найчастіше позначення β -арбутину не використовується і

речовину називають просто арбутином. Синтез арбутину не є особливо складним завданням [166].

Ретросинтетичний аналіз свідчить про сполучення двох компонентів, гідрохінону і глюкози. При будь-якому синтезі з використанням техногенних реагентів та каталізаторів можна очікувати, що відбудеться звичайний багатоетапний процес, де залучений захист і зняття захисту ОН-груп. Білкове глікозилювання виявляється ще простішим, оскільки захист та зняття захисту не потрібні [166].

Для оптимальних умов вилучення арбутину та гідрохінону з рослинної сировини, субстанцій та дієтичних добавок на основі мучниці звичайної листя використовують 25 % розчин етанолу [88].

У систематичних дослідженнях біосинтезу рослинних глікозидів повідомлялося, що фермент із зародків пшениці каталізує реакцію уридин дифосфат глюкози з гідрохіноном з утворенням арбутину і уридину дифосфату (рис. 1.3.) [88, 95].

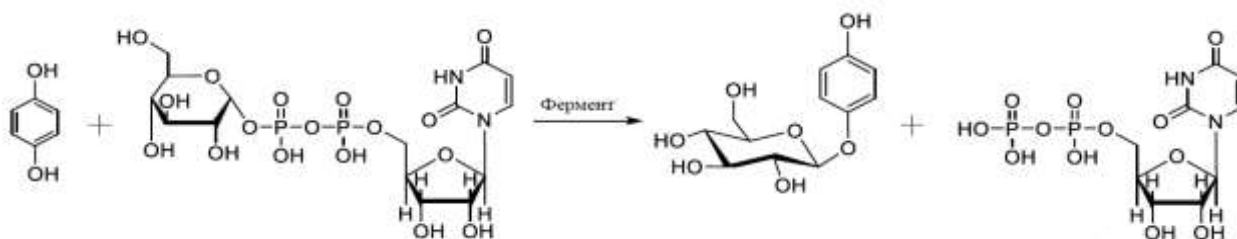
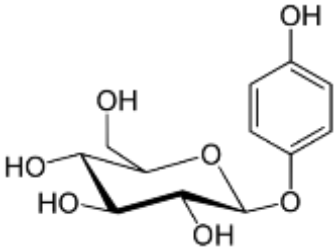
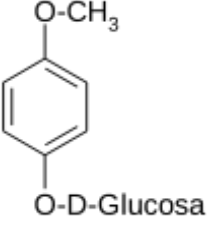

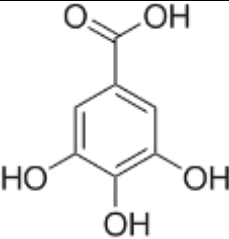
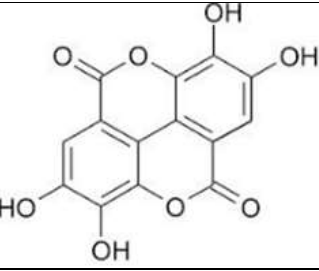
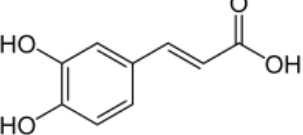


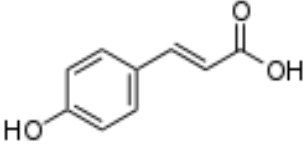
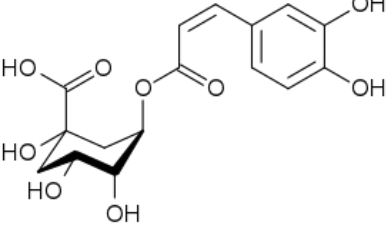
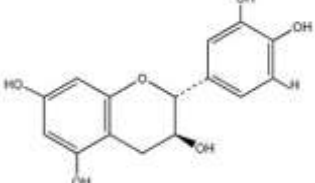
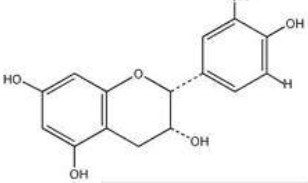
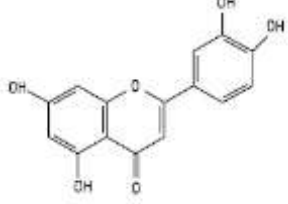
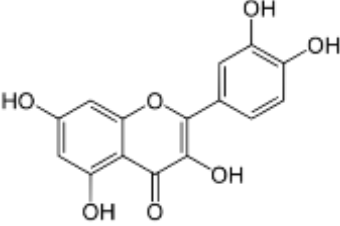
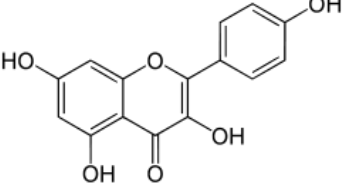
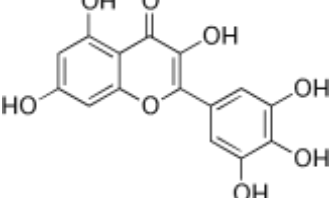
Рис. 1.3. Біосинтез арбутину

Іншими сполуками, які містяться у складі мучниці звичайної листя, є урсолова кислота, галова кислота, дубильні речовини, галотаніни (до 20%) та флавоноїди: глікозиди кверцетину, кемпферолу та мірицетину [152] (табл.1.1).

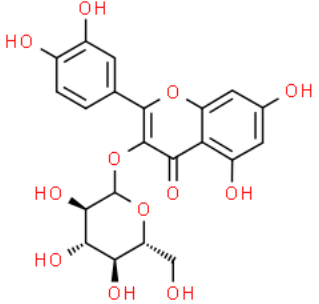
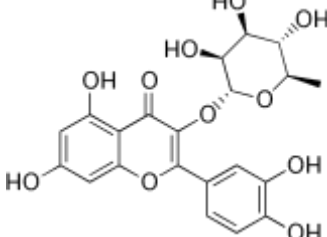
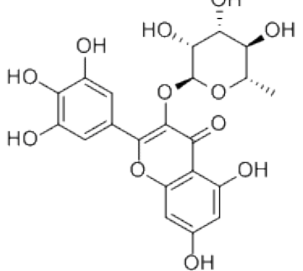
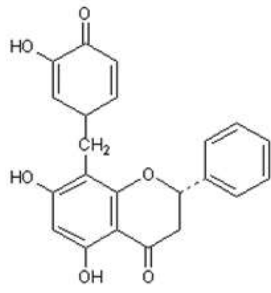
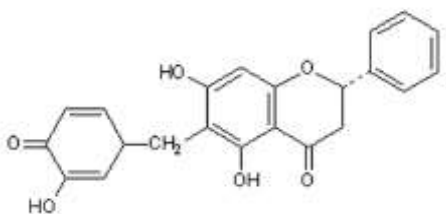
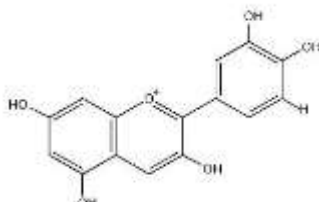
Хімічний склад мучниці звичайної листя

Назва	Хімічна формула	Кількість , %	Література
1	2	3	4
Фенольні сполуки та їх похідні			
Арбутин		5-10	18, 22, 32, 33, 89, 95, 101, 152
Метиларбутин	 O-D-Glucosa	4	89, 152
Гідрохінон		0,12-1	33, 152
Фенолкарбонові кислоти та їх похідні			
Галова кислота		6	20, 33, 92
Елагова кислота			20, 33
Гідроксикоричні кислоти			
Кофейна кислота			22, 92

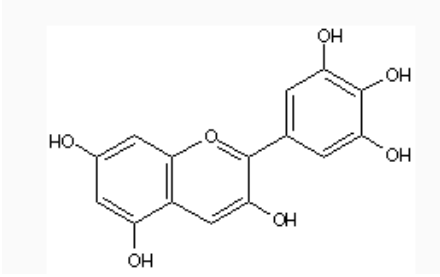
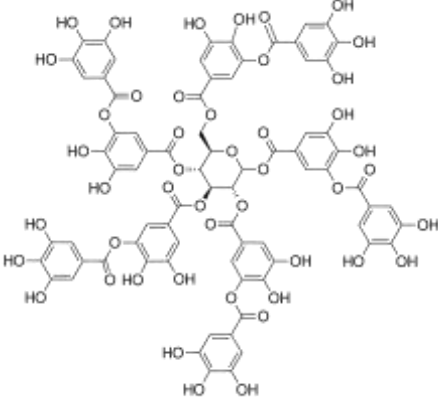
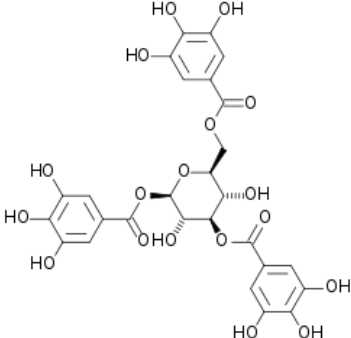
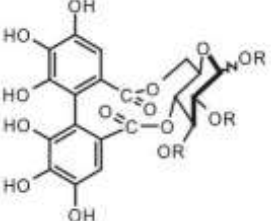
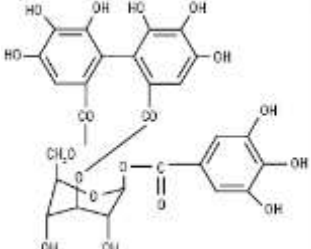
Продовж. табл. 1.1.

1	2	3	4
<i>n</i> -Кумарова кислота			22, 92
Хлорогенова кислота			92
Флавоноїди			
(+) -Катехін			19
(+) -Епікатехін			19
Лютеолін			19, 22
Кверцетин			20, 33, 126
Кемпферол			20, 33, 126
Мірицетин			20, 33, 126

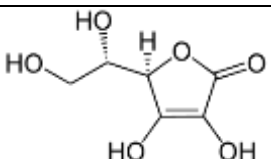
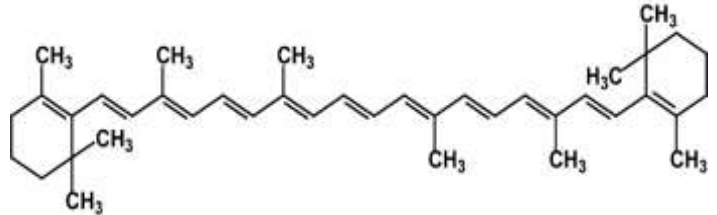
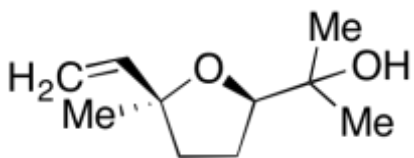
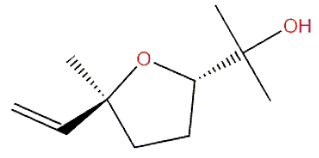
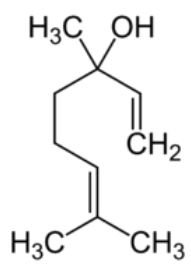
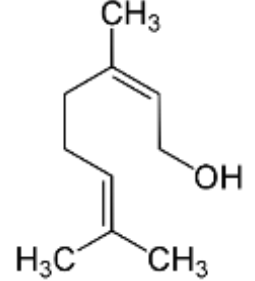
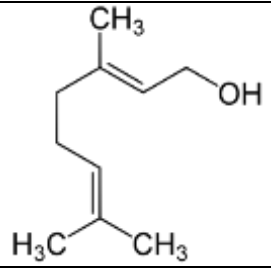
Продовж. табл. 1.1.

1	2	3	4
Гіперин			20, 33, 126
Кверцитрин			20, 21, 33, 126
Мірицитрин			33
Хаманетин			3
Ізохаманетин			3
Ціанідин			160

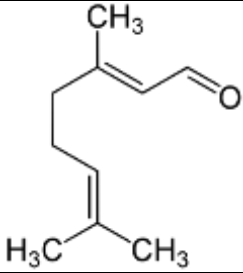
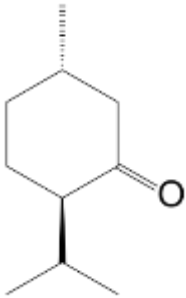
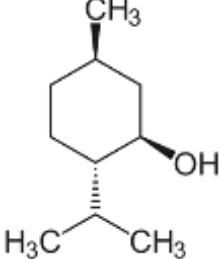
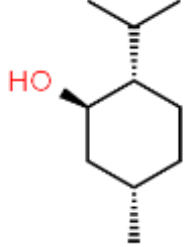
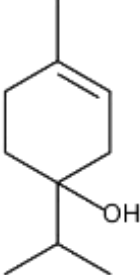
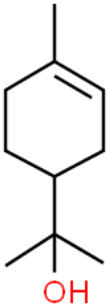
Продовж. табл. 1.1.

1	2	3	4
Дельфінідин			160
Дубильні речовини			
Танін		7	33, 101
Галотанін		17,1	33, 41
Елаготанін		0,75	33
Корилагін			33

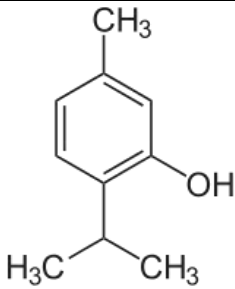
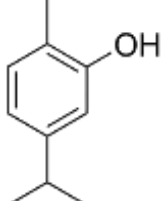
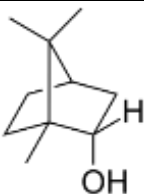
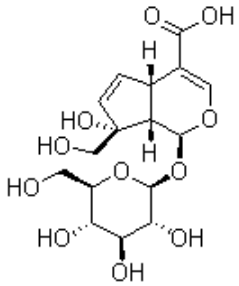
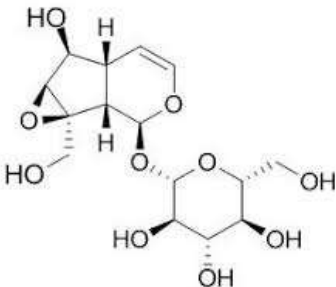
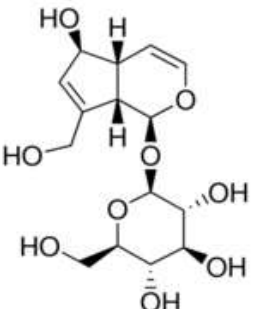
Продовж. табл. 1.1.

1	2	3	4
Вітаміни			
Аскорбінова кислота		629 мг%	33
β-Каротин			160
Монотерпеноїди			
<i>цис</i> -Ліналоолоксид		1,3	21, 140
<i>транс</i> -Ліналоолоксид		0,9	21, 140
Ліналоол		7,3	140
Нерол		0,8	140
Гераніол		3	21, 140

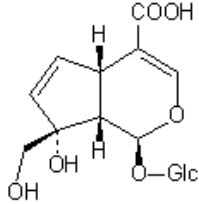
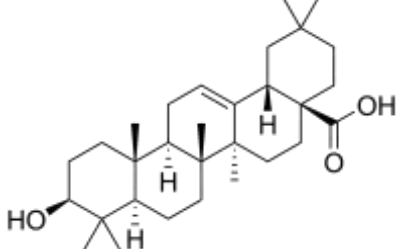
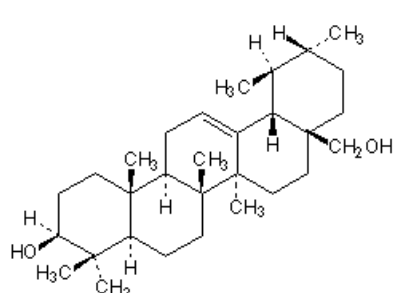
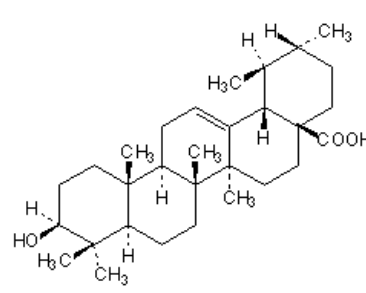
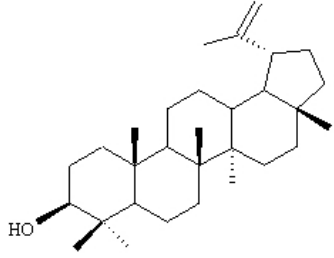
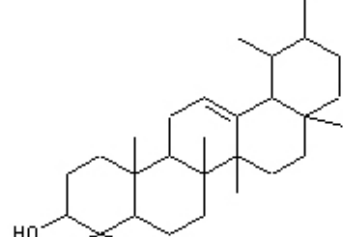
Продовж. табл. 1.1.

1	2	3	4
Гераніаль		1,3	140
Ментон		0,2	140
Менол		0,3%	140
Ізоментол		1,9	140
Терпінен-4-ол		1	140
α-Терпінеол		7,8	140

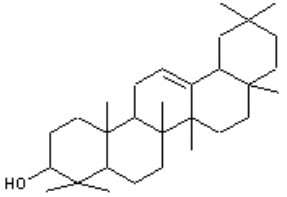
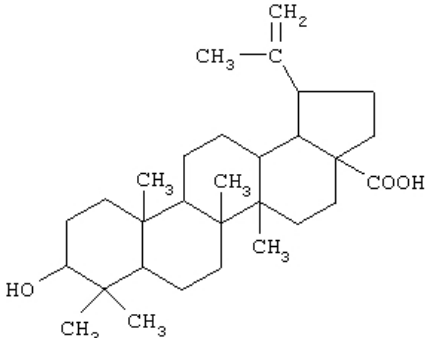
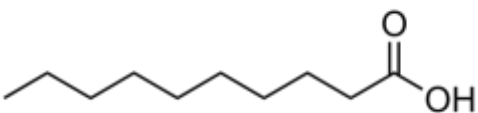
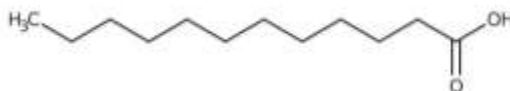
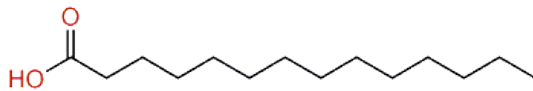
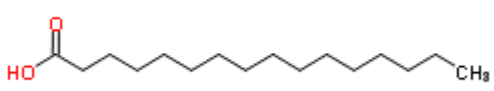
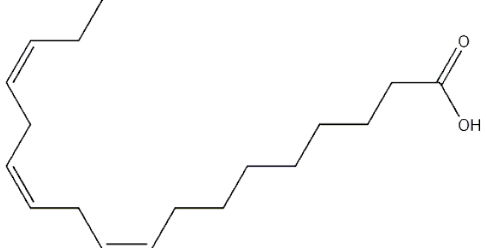
Продовж. табл. 1.1.

1	2	3	4
Тимол		2	140
Карвакрол		0,9	21, 140
Борнеол		1,4	21, 140
Іридоїди			
Монотропеїн			109
Каталпол			109
Аукубін			109

Продовж. табл. 1.1.

1	2	3	4
Унедозид			109
Тритерпеноїди			
Олеанолова кислота		0,4-0,75	33
Уваол			33
Урсолова кислота			33
Лупеол			111
α-Амірин			136

Продовж. табл. 1.1.

1	2	3	4
β-Амірин			108
Бетулінова кислота			108
Жирні кислоти			
Деканова кислота		0,8	140
Додеканова кислота		1,8	140
Тетрадеканова кислота		1,2	140
Гексадеканова кислота		4,5	140
Ліноленова кислота		1,2	21, 140

Також є дослідження, у якому розроблений штам бактерії *P. chlororaphis* міг накопичувати до 6,79 г/л арбутину з 54-кратним збільшенням вироблення арбутину порівняно з вихідним штамом на основі глюкози та 4-гідроксибензойної кислоти під дією ферментації. Ця робота корисна для зміцнення мікробного вторинного метаболізму для високорівневого

виробництва рослинних і природних продуктів навколишнього середовища у мікроорганізмах [95].

У надземній частині мучниці звичайної містяться дубильні речовини пірогалової групи – елаготаніни і галотаніни. Корилагін гідролізується з утворенням глюкози, елагової і галової кислот.

У склад мучниці звичайної листя входять органічні кислоти (галова (до 6%), елагова, хінна, протокатехова, яблучна та мурашина кислоти), флавоноїди (кверцетин, ізокверцитрин, міріцитрин, гіперозид, мірицитин), урсолова кислота (0,4-0,8 %) та уваол. Утворення фенольних сполук у мучниці звичайній проходить по шикиматному шляху. У період бутонізації та цвітіння у сировині мучниці звичайної накопичується аглікон гідрохінон, який при сушінні сировини піддається окислюванню до хінонів – темних пігментів, тому сировина, заготовлена у період цвітіння, чорніє. Тритерпенові сполуки виявлені у листі та коренях мучниці звичайної. У коренях мучниці звичайної містяться уваол, урсолова кислота, α - і β - амірин, олеанолова і бетулінова кислоти, стероїди - β -ситостерол і стигмастерол [33, 41, 103].

Чеськими вченими розроблено технологію культивування клітин мезофілу листя мучниці звичайної. При цьому встановлено, що у такій культурі арбутин і інші фенологлікозиди не накопичуються. Основними БАР, які утворюються при культивуванні клітин мучниці, є тритерпенові сполуки - похідні олеанолової кислоти. У листі мучниці звичайної виявлені іридоїдні глюкозиди монотропеїн і асперулозид [109], а в коріннях - унедозид [107]. Аглікони іридоїдних глюкозидів мучниці звичайної є нестабільними, особливо у кислому середовищі, з них утворюються полімерні сполуки, що зумовлюють потемніння листя рослини при сушінні. Встановлено, що вміст іридоїдних глюкозидів залежить від фази онтогенезу рослин і їх органів. Вони накопичуються у максимальній кількості у молодих тканинах під час їх інтенсивного зростання [33, 107, 109].

У листі мучниці звичайної містяться віск, смола, ефірна олія (0,01%), йод (2,1-2,7 мг/кг). Мучниця звичайна має здатність накопичувати марганець – до

2 мг% у перерахунку на абсолютно суху речовину, який бере безпосередню участь у біосинтезі БАР рослини, зокрема арбутину. Мучниця звичайна також накопичує цинк та купрум [33, 41, 103].

Листя мучниці звичайної містить прості феноли: арбутин, метиларбутин (у концентраціях у межах від 6 до 12 %), вільний гідрохінон, *n*-метоксифенол, пірокатехін, меквінол (4-гідроксианізол), гідрохінон, глікозиди гідрохінону, ванілінову кислоту; фенолкарбонові кислоти: елагову, галову, *n*-гідроксибензойну, хінну, *n*-кумарову та бузкову кислоти.

У листі мучниці звичайної виявлено флавоноїди групи флавону: катехін, епікатехін, епігалокатехін, епікатехіна галат; групи флавонолу: кверцетин, ізокверцетин, кверцетин-3-О-(6-О-галуол-галактозид), кверцетин-3-О-арабінофуранозид, кверцетин-3-О-арабінопіранозид, кверцетин-3-О-бета-D-(6-О-галуолгалактозид), кверцетин-диглюкозид, кверцетин-моноглюкозид, кемпферол, кверцитрин; біофлавоноїди: мірицетин, глікозид мірицетина, мірицетин-3-О-бета-D-галактозид, мірицетин-3-О-галактозид, мірицетрин (3-О-рамнозид мірицетину), а також гіперозид, уваретин, ізоуваретин.

У листі мучниці звичайної виявлено сапоніни: α -амірин, α -аміринацетат, урсолова, олеанова, бетулінова кислоти, уваол та лупеол.

Дубильні речовини представлені: таніном, таніновою кислотою, елаготаніном корілагіном, катехол-танінами, галотанінами: 2,3,6-галуол-D-глюкозою, гекса-О-галуол-бета-D-глюкозою, пента-О-галуол-бета-D-глюкозою, арбутиновим естером галової кислоти, 1,2,3,6-тетрагалуолглюкозою та тригалуол-глюкозою.

У листі *A. uva-ursi* L. містяться гідроксикоричні кислоти: кофейна, ферулова, гомопротокатехінова, *o*-протокатехінова кислота; іридоїди: асперулозид, монотропеїн; алантоїн, стероїди: бета-ситостерол, стигмастерол, антоціани дельфінідин та ціанідин, ерітродіол, мурашина кислота, рибофлавін, аскорбінова, нікотинова кислота, тіамін, саліцилова кислота, макро- та мікроелементи (хром, кобальт, алюміній, кальцій, залізо, магній, калій, фосфор, селен, кремній) [69, 79, 81, 99, 157, 161].

Таким чином, на основі критичного аналізу наукових першоджерел стосовно хімічного складу сировини мучниці звичайної, виявлено, що найбільш вивченими групами БАР є похідні гідрохінону, зокрема арбутин, метиларбутин, гідрохінон, фенолкарбонові кислоти, гідролізовані дубильні речовини [69, 79, 81].

1.4 Фармакологічні властивості та застосування у медичній та фармацевтичній практиці

Основними діючими речовинами мучниці звичайної листя є фенольні глікозиди, флавоноїди та дубильні речовини. Арбутин розщеплюється у організмі до гідрохінону, який проявляє подразнюючі та антибактеріальні властивості, внаслідок чого підвищується діурез, а сечовивідні шляхи очищаються від бактеріальної флори. Антибактеріальна дія БАР мучниці звичайної проявляється лише за умови лужної реакції сечі, оскільки при кислій реакції сечі гідроліз глікозидів не відбувається, вони руйнуються з утворенням полімерних комплексів, які зумовлюють потемніння листя. Антисептичний ефект проявляють і дубильні речовини мучниці звичайної. Він зумовлений їх здатністю утворювати комплексні сполуки з бактеріальними білками та від реакції сечі не залежить. Дубильні речовини мучниці звичайної проявляють протизапальну дію. Флавоноїди, які містяться у рослині, обумовлюють підвищення діурезу з одночасним посиленням виведення з організму іонів натрію та хлору. Одночасна наявність сечогінних, антибактеріальних та протизапальних властивостей робить сировину цієї рослини цінним засобом для лікування запальних процесів у сечовивідних шляхах та ниркової недостатності з порушенням водного та мінерального обмінів. Терапевтичне застосування арбутину є актуальним і сьогодні. Завдяки м'якій антимікробній, антиоксидантній і протизапальній дії він також широко застосовується у косметичній і медичній галузях по всьому світу, а також має важливе значення в харчовій промисловості. Наприклад, оскільки арбутин діє на процес

меланогенезу пригнічуючи тирозинази, він використовується як депігментуючий засіб для шкіри, запобігаючи та усуваючи появи темних плям. Можливий механізм інгібування тирозинази арбутином запропонований на основі обчислень молекулярної динаміки, який призводить до ідентифікації вирішальних взаємодій білок-арбутин, які відрізняються від тих, які демонструють інші інгібітори [71, 106, 119, 124, 141, 154, 166].

Екстракти мучниці звичайної листя здатні інгібувати ліпазу підшлункової залози, що відкриває перспективи їх використання при лікуванні ожиріння [149].

У народній медицині засоби мучниці звичайної листя приймають при нефролітазі, затримці сечі, гематурії, мимовільному сечовиділенні, ніктурії, сперматореї, малярії, туберкульозі легень, діареї, атонії кишок і при цукровому діабеті. Мучниці звичайної листя входить до складу сечогінних зборів та чаїв. Вживають мучниці звичайної листя у вигляді настою, відвару або порошоків листя. Болгарські вчені вважають, що найкраща лікарська форма мучниці – настій, і пояснюють це тим, що при кип'ятінні екстрагується значна кількість дубильних речовин, які подразнюють слизову оболонку шлунково-кишкового тракту. При надмірному та тривалому вживанні препарати мучниці звичайної можуть спричиняти подразнення нирок, нудоту, діарею, викидень у вагітних. У разі необхідності тривалого вживання мучниці звичайної її використовують у суміші з іншими лікарськими рослинами, які мають сечогінні і протизапальні властивості. Окремі автори рекомендують при вживанні мучниці одночасно приймати чайну ложку натрію гідрокарбонату для створення лужної реакції сечі. Зовнішньо настій мучниці звичайної листя застосовують для загоєння виразок та гнійних ран [5, 6, 16].

Пагони мучниці звичайної володіють антиоксидантними властивостями за рахунок фенольних сполук, які входять до складу листя рослини. Встановлено, що арбутин гальмує перекисне окиснення ліноленової кислоти, у дослідях з тваринами має виражену антиоксидантну активність. Вміст арбутину у мучниці звичайної листі перевищує цей показник у брусниці

звичайної листі у 1,5 рази, тоді як антиоксидантна активність мучниці звичайної листя перевищує антиоксидантну активність брусниці листя у 2 рази [49]. Це може бути обумовлено прямою антирадикальною активністю за рахунок вільних фенольних гідроксилів арбутину та флавоноїдів, вміст яких у листі мучниці звичайної набагато вищий, ніж у листі брусниці [1, 49, 67].

Виявлені виражені протизапальні властивості арбутину мучниці звичайної листя [115]. Він інгібує вироблення і активацію запальних факторів: запальних цитокінів, включаючи IL-1 β і фактор некрозу пухлин- α та інші пов'язані з запаленням гени, такі як MCP-1 та IL-6, циклооксигеназу-2, продукцію оксиду азоту, індуковану NO-синтазою.

Показано, що попереднє лікування арбутином виявляє виражену захисну дію щодо гіпертрофії серця у мишей, спричинену ізопротеренолом. Таким чином, арбутин може бути використаний як потенційний фармакологічний засіб у лікуванні гіпертрофії серця [75].

Результати іншого дослідження показали, що арбутин ефективно зменшує поведінковий дефіцит і послаблює окислювальний і нітрозативний стрес у МФТП-індукованій (1-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіридин) моделі хвороби Паркінсона у тварин. Однак необхідні подальші дослідження для вивчення точних молекулярних механізмів, за допомогою яких арбутин може захищати дофамінергічні нейрони у тварин, які вживають МФТП [74].

Також існують досить схожі дослідження, результати яких показали, що арбутин зменшує просторове вивчення і погіршення пам'яті у тварин у моделі хвороби Альцгеймера. Виявляється, що захисний вплив арбутину на продуктивність пам'яті частково опосередковується його інгібуючою активністю на окислювальний стрес у тварин, які отримують стрептозоцин. Однак точний механізм, за допомогою якого арбутин захищає нейрони гіпокампу від окислювального пошкодження, спричиненого стрептозоцином, потребує подальшого дослідження [76].

Екстракти з мучниці звичайної листя використовуються при лікуванні і профілактиці інфекційних захворюваннях сечовивідних шляхів. Було

проведено дослідження ефективності профілактичних курсів фітотерапії у групах пацієнтів з хронічним циститом з рецидивуючим перебігом і хронічним пієлонефритом [14, 15]. Згідно з отриманими результатами, профілактичні курси лікування з використанням сухого екстракту мучниці звичайної листя у хворих з хронічним циститом значно подовжували термін безрецидивного періоду, зменшували кількість рецидивів інфекції у віддаленому періоді [14, 15].

При вивченні впливу прийому «Нефрофіту», до склад якого входить екстракт мучниці звичайної листя, на моделі нефриту за участю лабораторних щурів, було показано, що при пошкодженні нирок імунної етіології фітозбір за рахунок складових екстрактів проявляє виражений нефропротекторний вплив, який супроводжується нормалізацією показників функціонального стану нирок, ліпідного складу крові, зниженням інтенсивності вільнорадикальних процесів, виразності імунних порушень, підвищенням активності ендогенної антиоксидантної системи [39]. Завдяки своїм сечогінним властивостям засоби мучниці звичайної листя попереджають виникнення сечових каменів.

Нещодавно встановлено, що корілагін – танін з листя мучниці звичайної – активізує активність бета-лактамних антибіотиків проти метицилінрезистентного золотистого стафілокока. Це надає деяку підтримку концепції використання цілих рослинних екстрактів на відміну від ізольованих арбутозидів, оскільки інші складові сировини можуть мати синергічний ефект один з одним [164].

Екстракт мучниці звичайної листя посилює антибактеріальну активність нізину – поліпептидного антибіотику [93].

Вживання екстрактів листя мучниці звичайної слід уникати під час вагітності і лактації, ниркової недостатності і диспепсії [164].

В Україні зареєстровано 19 лікарських засобів, функціональних та дієтичних добавок на основі БАР мучниці звичайної листя, з них 8 – вітчизняного виробництва (табл. 1.2) [23, 34, 35, 37, 48, 52]. У фармацевтичній

промисловості використовують, в основному, фенольні сполуки мучниці звичайної листя, що свідчить про перспективність вивчення БАР сировини для створення на їх основі нових лікарських засобів.

Таблиця 1.2

Препарати, які містять БАР мучниці звичайної листя

Лік. засіб, виробник	Склад препарату	Застосування
1	2	3
<i>Амажестин</i> Dragenopharm Apotheker Puschl GmbH, Німеччина	Сухий екстракт з листя мучниці звичайної (2,5-4,5:1) з вмістом похідних гідрохінону в перерахуванні на безводний арбутин 105 мг	Запальні захворювання нижніх сечовивідних шляхів.
<i>Гербіон сечогінний</i> KRKA, Словенія	1 мл (30 крапель) містить водно-спиртовий екстракт (1:2,8), виготовлений на основі лікарських рослин: коріння петрушки 0,1 г; трава хвоща польового 0,1 г; листя мучниці звичайної 0,08 г; листя берези 0,04 г; коріння вовчуга колючого 0,04 г;	Гостре та хронічне запалення нирок та/або сечового міхура бактеріальної природи (нефрити, піелонефрити, цистити).
<i>Детоксифіт</i> Науково-виробнича фармацевтична компанія «ЕЙМ», Україна	1 упаковка (100 г) містить суміш лікарської рослинної сировини: череди трави 6 г, аїру коренів 5 г, барвінку трави 5 г, буркуну трави 5 г, деревію трави 5 г, каштана кінського насіння 5 г, кукурудзи стовпчиків з приймочками 5 г, кульбаби лікарської коренів 5 г, лопуха коренів 5 г, мучниці листя 5 г, ромашки квіток 5 г, солодки коренів 5 г, сосни бруньок 5 г, хвоща трави 5 г, хмелю шишок 5 г, валеріани корені 4 г, звіробою трави 4 г, кропиви собачої трави 4 г, м'яти перцевої листя 4 г, чистотілу трави 4 г, шипшини плодів 4 г.	У складі комплексної терапії атеросклерозу; артеріальної гіпертензії; подагри у період ремісії; сечокам'яної хвороби; набряків; захворювань печінки та жовчовивідних шляхів (хронічний гепатит, хронічний холецистит, холангіт); I-II стадії варикозного розширення вен.

1	2	3
<p><i>Сечогінний збір</i> «Лубнифарм», Україна</p>	<p>1 г збору містить: бузини чорної квітки - 0,20 г; звіробою трава - 0,20 г; липи квітки - 0,20 г; мучниці листя - 0,20 г; хвоща польового трава - 0,20 г</p>	<p>Запальні захворювання нирок і сечовивідних шляхів, що супроводжуються зниженням сечовидільної та азотовидільної функції, сечокам'яна хвороба (у складі комплексної терапії); набряки, пов'язані з патологією серця і бронхолегеневої системи (в складі комплексної терапії) Запальні захворювання нирок і сечовивідних шляхів, що супроводжуються зниженням сечовидільної та азотовидільної функції, сечокам'яна хвороба (у складі комплексної терапії); набряки, пов'язані з патологією серця і бронхолегеневої системи (в складі комплексної терапії)</p>
<p><i>Нефрофіт</i> Науково-виробнича фармацевтична компанія «ЕЙМ», Україна</p>	<p>1 упаковка (50 г) містить суміш лікарської рослинної сировини: бузини квіток 4,5 г, подорожника великого листя 4,5 г, споришу трави 4,5 г, хвоща трави 4,5 г, грициків звичайних трави 4г, кукурудзи стовпчиків з приймочками 4 г, кульбаби лікарської коренів 4 г, лопуха коренів 4 г, мучниці листя 4 г, м'яти перцевої листя 4 г, ромашки квіток 4 г, череди трави 4 г.</p>	<p>Комплексне лікування та профілактика загострень запальних захворювань нирок та сечовивідних шляхів, які супроводжуються зниженням сечовидільної та азотовидільної функції, сечокам'яної хвороби, набряків.</p>

Продовж. табл. 1.2

1	2	3
<p><i>Збір урологічний</i> ЛЕРОС с.р.о. Чеська Республіка</p>	<p>27,5 % листя берези, 22,5 % листя мучниці, 11 % трави споришу звичайного, 10 % коріння вовчуга колючого, 10 % коріння петрушки, 10 % трави кропиви, 7 % трави деревію звичайного, 2 % квіток бузини чорної.</p>	<p>У комплексному лікуванні та профілактиці запальних захворювань нирок, сечовивідних шляхів та сечового міхура.</p>
<p><i>Листя мучниці</i> ПрАТ «Ліктрави», Україна</p>	<p>1 пачка містить мучниці листя (<i>Uvae ursi folia</i>) 50 г</p>	<p>Запальні захворювання нирок, сечового міхура і сечовивідних шляхів (пієліт, цистит, уретрит), ниркова недостатність з порушенням водного і мінерального обміну – у складі комплексної терапії.</p>
<p><i>Урокран</i> Австраліан Фармасьютикал Мануфактурерс Пті Лтд, Австралія</p>	<p>1 таблетка містить: журавлини великоплідної свіжих плодів сухого екстракту (34:1) 500 мг; чорниці свіжих плодів сухого екстракту (100:1) 7,5 мг; толокнянки листя сухого екстракту (4,3:1) 93,02 мг; кукурудзяних стовпчиків сухого екстракт (4:1) 62,5 мг; петрушки листя порошку 100 мг;</p>	<p>Дорослим у комплексній терапії як протизапальний та діуретичний засіб при лікуванні запальних захворювань нирок, сечового міхура і сечовивідних шляхів.</p>
<p><i>Урофлорс</i> ТОВ «Тернофарм», Україна</p>	<p>1 фільтр-пакет чаю містить бузини чорної квіток 0,3 г, звіробою трави 0,3 г, липи квіток 0,3 г, толокнянки листя 0,3 г, хвоща польового трави 0,3 г.</p>	<p>Як профілактика та у складі комплексного лікування запальних захворювань нирок і сечовивідних шляхів, що супроводжуються зниженням сечовивідної і азотовивідної функції, сечокам'яної хвороби, при набряках.</p>

1	2	3
<p><i>Фітонефрол</i> ПрАТ «Ліктрави», Україна</p>	<p>1 г збору містить: мучниці листя 400 мг, календули квіток 200 мг, кропу пахучого плодів 200 мг, елеутерококу колючого кореневищ з коренями 100 мг, м'яти перцевої листя 100 мг.</p>	<p>У комплексній терапії запальних захворювань нирок та сечовивідних шляхів.</p>
<p><i>Цистинол Акут</i> Шапер & Брюммер ГмБХ & Ко. КГ, Німеччина</p>	<p>1 таблетка містить: сухого екстракту листя мучниці звичайної (3,5-5,5:1) 238,7-297,5 мг, що відповідає 70 мг похідних гідрохінону, у перерахуванні на арбутин безводний; екстрагент: етанол 60 % (об/об)</p>	<p>Запальні захворювання нижніх сечовивідних шляхів.</p>
<p>Фурін-М Farmachim, Болгарія.</p>	<p>100 мл Розчину містить, 1% метронідазолу, 2% бензоату натрію, водну витяжку з 3 г Radix Symphyti off, 2 г Herba Hyperici perforati, 2 г Folium Uvae ursi, 2 г Folium Urticae dioici, 2 г Radix Urticae dioici, 1 г Radix Saponariae.</p>	<p>Геморагічні форми пародонтиту, гострі та хронічні гінгівіти і стоматити.</p>
<p>Harntee 400 TAD, Німеччина</p>	<p>100 г містить сухі водні екстракти листа берези - 510 мг, квіток календули (10:1) - 235 мг, трави хвоща (7:1) - 470 мг, плодів фенхелю (7:1) - 210 мг, кореневищ пирію (7 : 1) - 470 мг, плодів ялівцю (3:1) - 515 мг, кореня солодки - 470 мг, кореня стальника (8:1) - 425 мг, листа ортосифона (6:1) - 375 мг, насіння квасолі (8 : 1) - 425 мг, трави золотушника - 510 мг і листа мучниці - 605 мг.</p>	<p>Застосовується при гострих і хронічних інфекціях нирок і сечовивідних шляхів.</p>

1	2	3
Простаплекс Альтера Холдінг, Україна.	1 капсула містить: екстракт плодів карликової пальми (Со пальметто) 225 мг, олія насіння гарбуза 40 мг, екстракт африканської сливи (пігеума) 10 мг, екстракт мучниці 5 мг.	Рекомендується чоловікам для профілактики збільшення передміхурової залози, при запальних захворюваннях передміхурової залози (простатитах), при функціональних порушеннях сечовивідної системи, пов'язаних з гіперплазією передміхурової залози, а також чоловікам похилого віку для підтримки статевої функції.
Настоянка складна Панкова Панков и Ко, Україна	Містить спиртові настоянки арніки, безсмертника, звіробою, кори дуба, листя брусниці, листа кропиви, листків мучниці, листа шавлії, плодів чорниці, бруньок берези, трави деревію, суцвіть календули, суцвіть пижма і чаги.	При хронічних гастритах, хронічній виразковій хворобі шлунка та 12-палої кишки і в стадії переходу гострої фази захворювання в хронічну, а також як жовчогінний засіб при дисфункціях печінки і жовчних шляхів.
Cysto Fink Fink/Kade Німеччина	1 капсула містить: 227,3 мг олії гарбуза звичайної, 80 мг сухого водного екстракту кори сумаху ароматного (4,8-7,8:1), 50 мг сухого водного екстракту трави мучниці (2,2-8,8:1), 20 мг сухого водного екстракту шишок хмелю (5,5-6,5:1), 10 мг сухого спиртового екстракту кореня кава-кава (12,5-20:1).	При функціональних і органічних захворюваннях сечового міхура, енурезі.
Blasen - Nieren - Tee Uroflux S Nattermann, Німеччина	В 100 г цього лікувального чаю міститься: 40 г листя мучниці звичайної, 25 г листя берези і 20 г кореневищ пирію.	При запальних захворюваннях нирок і сечовивідних шляхів.

1	2	3
Hevert - Blasen - und Nierentee (Hevert, Німеччина)	Чай, в 100 г якого міститься: 15 г листя мучниці звичайної, 8 г листя ортосифона , 20 г плодів квасолі, 15 г листя берези , 15 г трави хвоща, 10 г кореню стальника, 10 г кореневищ пирію, 5,5 г квіток липи і 1,5 г квіток цінеї.	При гострих і хронічних інфекціях сечовивідних шляхів, сечокам'яної хвороби.
Blasen - Tee «Mayrhofer», Mayrhofer Pharmazeutika, Австрія	Чай, в 100 г якого міститься: 40 г листя мучниці звичайної, 40 г трави остудника, 5 г плодів ялівцю, 5 г кореню стальника, 5 г кореня петрушки і 5 г листя м'яти перцевої.	Як протизапальний , антисептичний і спазмолітичний засіб при запальних процесах у сечовивідних шляхах і сечовому міхурі.

Головним чином, листя мучниці звичайної та її лікарські засоби використовують для лікування інфекцій сечовивідних шляхів. Також застосовують як антиоксидантній та протизапальний засіб, у косметичній і медичній галузях як депігментуючий засіб для шкіри, запобігаючи та усуває появу темних плям.

Резюме

1. Мучниця звичайна поширена у субальпійській та лісотундровій зонах Середньої і Північної Європи, досягаючи широти 70 ° на півдні. У Південній та Центральній Європі зустрічається в Альпах, Апеннінах та на Балканах на висоті від 1500 до 2900 м над рівнем моря. На території України мучниця зустрічається у Карпатах, поширена на Поліссі. Райони збирання мучниці звичайної листя зосереджені у Львівській, Івано-Франківській, Рівненській, Волинській, Житомирській, Київській та Чернігівській областях.

2. Збір мучниці звичайної листя проводять у два строки: навесні – до цвітіння або на самому початку цвітіння (з кінця квітня до середини червня) і восени – з моменту дозрівання плодів до їх осипання (з кінця серпня до середини жовтня). Виявлено, що осінь є кращим періодом, ніж весна для збору

сировини цієї рослини для того, щоб отримати найбільший вихід арбутину.

3. На основі критичного аналізу наукових першоджерел стосовно хімічного складу сировини мучниці звичайної, виявлено, що найбільш вивченими групами БАР є похідні гідрохінону, зокрема арбутин, метиларбутин, гідрохінон, фенолкарбонові кислоти, гідролізовані дубильні речовини.

4. Головним чином, листя мучниці звичайної та її лікарські засоби використовують для лікування інфекцій сечовивідних шляхів. Також застосовують як антиоксидантний та протизапальний засіб, у косметичній і медичній галузях як депігментуючий засіб для шкіри, запобігаючи та усуваючи появи темних плям. В Україні зареєстровано 19 лікарських засобів, функціональних та дієтичних добавок на основі БАР мучниці звичайної листя, з них 8 – вітчизняного виробництва, які в основному представлені фасованою сировиною, зборами і комплексними настоянками. У фармацевтичній промисловості використовують, в основному, фенольні сполуки мучниці звичайної, що свідчить про перспективність вивчення БАР сировини для створення на їх основі нових лікарських засобів.

РОЗДІЛ 2

ВІДОМОСТІ ПРО МАТЕРІАЛИ, ПРИЛАДИ, РЕАКТИВИ ТА МЕТОДИКИ

Листя мучниці звичайної (*Arctostaphylos uva-ursi* L. (Spreng)) було заготовлено у ботанічному саду Львівського медичного університету ім. Данила Галицького, де також були зроблені гербарні зразки рослини, що зберігаються на кафедрі фармакогнозії НФаУ (зразки № 577–582). Ідентифікацію лікарської рослини проводили за консультативної допомоги завідувачки кафедри ботаніки Національного фармацевтичного університету, доктора фармацевтичних наук, професорки Т.М. Гонтової [91]. Крім того для аналізу використовувалась сировина промислового виробництва (виробник: ПрАТ «Ліктрави», Україна).

Для хроматографічних досліджень використовували різні марки паперу «Filtrak» (FN 1, 3, 7, 14) і пластинки Merck Silicagel F254. При дослідженнях застосовували методи висхідної ПХ і ТШХ. Значення R_f , які наведені у роботі, є середньою величиною п'яти визначень. Для приготування хроматографічних систем використані розчинники класифікацій «Чистий для аналізу» або «Хімічно чистий», пропорції розчинників, які вказані цифрами, взяті у об'ємних одиницях. Речовини на хроматограмах виявляли до та після обробки реактивами за флуоресценцією в УФ-світлі при 366 і 254 нм та забарвленням у денному світлі після обробки хромогенними реактивами.

3. Спектрофотометричні дослідження проводили методами прямої та диференційної спектрофотометрії. Оптичну густину розчинів вимірювали на спектрофотометрі Evolution TM 60S UV-Visible (Thermo Fisher Scientific, USA) у кюветах з товщиною шару 10 мм.

4. Вивчення складу і вмісту фенольних сполук проводили методом ВЕРХ на хроматографі Shimadzu LC20 Prominence у модульній системі, оснащених чотирьохканальним насосом LC20AD, автоматичним пробовідбірником SIL20A, термостатом колонок СТО20А, діодно-матричним детектором

SPDM20A та ChemStation LC20 за таких умов: колонка Phenomenex Luna C18(2), розміром 250 мм x 4,6 мм, розмір часток 5 мкм; температура колонки – 35 °C; довжина хвилі детектування – 330 нм (для гідроксикорчних кислот, глікозидів флавоноїдів), 370 нм (для агліконів флавоноїдів), 280 нм (для дубильних речовин), 340 нм (кумарини); швидкість потоку рухомої фази – 1 мл/хв; об'єм проби, який вводився – 5 мкл; Рухома фаза: Елюент А: 0.1 % розчин трифтороцтової кислоти у воді; Елюент Б: 0.1 % розчин трифтороцтової кислоти в ацетонітрилі. Час хроматографування (хв) – співвідношення елюентів А:Б: 0–5 хв – 95:5; 5–35 хв – 95 → 75:5 → 25; 35–40 хв – 75:25; 40–60 хв – 75 → 50:25 → 50; 60–65 хв – 50 → 20:50 → 80; 65–70 хв – 20:80; 70–85 хв – 95:5. Ідентифікацію компонентів проводили за часом утримування і за відповідністю УФ-спектрів речовинам-стандартам [25, 38].

5. Визначення якісного складу і кількісного вмісту тритерпенових сапонінів проводили методом ВЕРХ [25, 148] за допомогою хроматографа Shimadzu LC20 Prominence у модульній системі, оснащених чотирьохканальним насосом LC20AD, термостатом колонок СТО20А, автоматичним пробовідбірником SIL20А, діодно-матричним детектором SPDM20A та ChemStation LC20 у таких умовах: колонка X-Bridge C18, розміром 150*4,6 мм з розміром зерна 5 мкм (фірма Waters); температура колонки – 30 °C; довжина хвилі детектування – 205 нм; швидкість потоку рухомої фази – 1,0 мл/хв; об'єм проби, який вводився – 20 мкл. Рухома фаза для ВЕРХ: метанол та 0,2 % розчин амонію ацетату (рН 6,75) у співвідношенні (80:20). Режим елюювання: ізократичний. Ідентифікацію сапонінів проводили за часом утримування і за відповідністю УФ-спектрів стандартам (табл. 2.1). Спектри сапонінів мають максимум поглинання за довжини хвилі 200-210 нм, тому детектування цієї групи речовин проводили за 205 нм. Кількісне визначення індивідуальних речовин у метанольних витягах сировини проводили з використанням зовнішніх стандартів олеанолової та урсолової кислот, стандартизованих екстрактів сапонінвмісної рослинної сировини – кори берези повислої (*Betulae pendulae cortex extract*) і листя шавлії лікарської

(*Salviae off. foliae extract*). Ці екстракти характеризувались точним вмістом бетуліну, кислоти бетулінової та лупеолу [85, 116, 129].

Таблиця 2.1

Часи утримання стандартних речовин тритерпенових сапонінів

Назва речовини	Час утримання, хв	λ_{\max} , нм
Ескулін	1,88	213, 337
Есцин	2,15	205
Актеїн	2,68	204
Гедеракозид С	4,89	204, 245
Еускапова кислота	8,53	200
Торментинова кислота	12,68	200
Бетулін	14,57	200, 234, 322
Олеанолова кислота	16,34	200
Урсолова кислота	17,45	200
Еритродіол	22,59	200
Уваол	22,80	200
Бетулінова кислота	26,92	200,
Лупеол	48,13	203, 230

6. Визначення якісного складу та кількісного вмісту терпеноїдів у мучниці звичайної листях проводили методом ГХ-МС за допомогою хроматографа Agilent Technology 6890 (ГХ) з мас-спектрометричним детектором 5973 (МС). Для аналізу використовували колонку НР-5 довжиною 30 м та внутрішнім діаметром 0,25 мм. Аналіз проводили за наступних умов: температура термостата змінювалась від 50 °С до 250 °С зі швидкістю 4 °С/хв; температура інжектора – 250 °С; газ носій – гелій, швидкість потоку – 1 мл/хв.; перенесення від ГХ до МС прогрівалося до 230 °С; температура джерела підтримувалась на рівні 200 °С; електрона іонізація проводилась при 70 eV у

ранжуванні мас m/z 29 до 450. Ідентифікація речовин проводилась на основі порівняння отриманих мас-спектрів з даними бібліотеки NIST05-WILEY (близько 500000 мас-спектрів). Вміст речовин легкої фракції визначали за сумою усіх площ піків на хроматограмах у порівнянні зі стандартом – н-деканом [12, 25, 26, 65].

7. Визначення кількісного вмісту гідрокінонпохідних.

Пробопідготовка для екстрактів. До 0,1 г сухого екстракту додавали 50,0 мл води *P* та кип'ятили на водяному огрівнику зі зворотним холодильником протягом 30 хв. Після охолодження витяг за допомогою 50 мл води *P* кількісно переносили в мірну колбу ємністю 250 мл, доводили водою *P* до позначки і перемішували. Втримували до осадження частинок та використовували надосадову рідину.

Пробопідготовка для сировини. До 0,4 г здрібненої на порошок листя мучниці звичайної (ДФУ 2.9.12) додавали 50,0 мл води *P* і кип'ятили на водяному огрівнику зі зворотним холодильником протягом 30 хв. Після охолодження суміш за допомогою 50,0 мл води *P* кількісно переносили у мірну колбу ємністю 250,0 мл, доводили водою *P* до позначки та перемішували. Втримували до осадження частинок та використовували надосадову рідину.

Випробовуваний розчин. 5,0 мл розчину витягу поміщали у ділильну лійку, додавали 45 мл води *P*, 1 мл розчину 2 % амінопіразолону *P* (м/об), 0,5 мл розчину аміаку розведеного *P* і 1 мл розчину 8 % калію фуроціаніду *P* (м/об), ретельно перемішували після кожного додавання. Втримували протягом 5 хв, одержаний водний шар струшували з 3 порціями хлороформу *P* (по 25 мл кожна), хлороформний шар кожний раз фільтрували крізь попередньо промитий хлороформом *P* фільтр в мірну колбу ємністю 100,0 мл, доводили об'єм розчином хлороформу *P* до позначки і перемішували.

Розчин порівняння. 0,015 г ФСЗ арбутину (точна наважка) розчиняємо у 50,0 мл води *P* та доводили об'єм розчину тим самим розчинником до 100,0 мл. 5,0 мл одержаного розчину вмішували у ділильну лійку і додавали

45,0 мл води *P*, 1 мл розчину 2 % амінопіразолону *P* (м/об), 0,5 мл розчину аміаку розведеного *P* і 1 мл розчину 8 % калію фероціаніду *P*(м/об), ретельно переміщуємо після кожного додавання. Витримували протягом 5 хв, одержаний водний шар струшували із 3 порціями хлороформу *P* (по 25 мл кожна), хлороформний шар кожний раз фільтрували крізь попередньо промитий хлороформом *P* фільтр в мірну колбу ємністю 100,0 мл, доводили об'єм розчином хлороформу *P* до позначки і перемішували.

Вимірювали оптичну густину випробовуваного розчину за довжини хвилі 455 нм, використовуючи як компенсаційний розчин хлороформ *P*. Паралельно вимірювали оптичну густину розчину порівняння.

Вміст гідрокінонпохідних, у перерахунку на арбутин, у відсотках, обчислювали за формулою:

$$\frac{A \cdot m_0 \cdot 2,5 \cdot P}{A_0 \cdot m} \quad (2.1),$$

де *A* – оптична густина досліджуваного розчину (455 нм),

*A*₀ – оптична густина розчину порівняння (455 нм),

*m*₀ – маса наважки ФСЗ арбутину, у г,

P – вміст арбутину безводного у ФСЗ арбутину, у %,

m – маса наважки сухого екстракту, у г.

8. Вміст похідних гідроксикоричних кислот у сировині та екстрактах визначали спектрофотометричним методом у перерахунку на хлорогенову кислоту [10, 38].

Пробопідготовка для сировини: 1,5 г здрібненого на порошок листя мучниці звичайної (точна наважка) (350) поміщали у колбу ємністю 200,0 мл, додавали 90 мл етанолу *P* (50 % об/об), нагрівали зі зворотним холодильником на водяному огрівнику протягом 30 хв, охолоджували до кімнатної температури і фільтрували у мірну колбу ємністю 100,0 мл крізь ватний тампон. Тампон промивали 10 мл етанолу *P* (50 % об/об), елюат фільтрували

у туж саму мірну колбу. Доводимо об'єм розчину етанолом $P(50\% \text{ об/об})$ до позначки та перемішуємо. Одержаний розчин фільтруємо крізь паперовий фільтр «синя стрічка», відкидаючи перші 10 мл фільтрату (розчин А).

Пробопідготовка для екстрактів: 0,1 г сухих екстрактів мучниці звичайної листя (точна наважка) розчиняли у колбі ємністю 100,0 мл, доводили об'єм розчину етанолом $P(50\% \text{ об/об})$ до позначки та перемішували. Одержаний розчин фільтрували крізь паперовий фільтр «синя стрічка», відкидаючи перші 10 мл фільтрату (розчин Б).

Випробовуваний розчин: 1,0 мл розчину А (розчину Б) поміщали у мірну колбу ємністю 10,0 мл, послідовно додавали, перемішуючи після кожного додавання, 2,0 мл 0,5 М розчину кислоти хлористоводневої, 2,0 мл свіжоприготованого розчину 10 г натрію нітриту P та 10 г натрію молібдату P у 100 мл води P , 2,0 мл розчину натрію гідроксиду розведеного P , доводили об'єм розчину водою P до позначки і перемішували.

Компенсаційний розчин. 1,0 мл вихідного розчину поміщали у мірну колбу ємністю 10,0 мл, послідовно додавали, перемішуючи після кожного додавання, 2,0 мл 0,5 М розчину кислоти хлористоводневої P та 2,0 мл розчину натрію гідроксиду розведеного P , доводили об'єм розчину водою P до позначки і перемішували.

Одразу вимірювали оптичну густину випробовуваного розчину за довжини хвилі 525 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи як розчин порівняння компенсаційний розчин.

Вміст суми гідроксикоричних кислот, в перерахунку на кислоту хлорогенову, у %, обчислювали за формулою:

$$X = \frac{A \cdot 1000}{188 \cdot m} \quad (2.2),$$

де A – оптична густина випробовуваного розчину при 525 нм;

m – маса наважки сировини, у г.

Використовували питомий показник поглинання кислоти хлорогенової, який дорівнює 188.

9. Вміст флавоноїдів визначали диференціальним спектрофотометричним методом в перерахунку на рутин [13, 25, 46].

Пробопідготовка для сировини: близько 5,0 г листя мучниці звичайної (точна наважка), подрібненої до розміру часток 1-2 мм, поміщали у колбу зі шліфом ємністю 200,0 мл, додавали 50,0 мл 50 % етанолу *P*. Колбу приєднували до зворотного холодильника і нагрівали на водяному огрівнику протягом 30 хв, періодично збовтуючи для змивання часток сировини зі стінок. Гарячу витяжку фільтрували крізь ватний тампон так, щоб частки сировини не потрапляли на фільтр. Ватний тампон переносили у колбу для екстрагування та додавали нову порцію екстрагенту. Екстракцію проводимо ще двічі за описаними вище умовами, фільтруючи витяжки у ту саму колбу. Об'єднані витяжки упарювали до чверті попереднього об'єму. Сконцентрований екстракт кількісно переносили у мірну колбу ємністю 50,0 мл, охолоджували і доводили об'єм 70 % етанолом *P* до мітки (розчин В).

Пробопідготовка для екстрактів: близько 0,25 г сухого екстракту мучниці звичайної листя (точна наважка) вносили в мірну колбу ємністю 25,0 мл, розчиняли у 70 % етанолі *P* при перемішуванні, доводили об'єм розчину в колбі до мітки цим же розчинником та перемішували (розчин Г).

2,0 мл розчину В (розчину Г) вносили у мірну колбу ємністю 25,0 мл, додавали 2,0 мл 3 % алюмінію хлориду *P* у 96 % етанолі *P*, доводили об'єм 70 % етанолом *P* до мітки та перемішували.

Через 30 хв розчин фільтрували крізь паперовий фільтр «синя стрічка», відкидаючи перші порції фільтрату, і вимірювали оптичну густину отриманого комплексу за довжини хвилі 417 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Розчином порівняння був розчин, що містить 2,0 мл розчину В (розчину Г), доведений у мірній колбі ємністю 25,0 мл до мітки 70 % етанолом *P*.

Паралельно у тих самих умовах проводили дослід з розчином ФСЗ

рутину. До 1,0 мл розчину ФСЗ рутину додавали 1,0 мл 3 % спиртового розчину алюмінію хлориду P та доводили 70 % етанолом P до 25,0 мл. Як розчин порівняння використовували розчин ДСЗ рутину, доведений у мірній колбі ємністю 25,0 мл до мітки 70 % етанолом P .

Вміст суми флавоноїдів у перерахунку на рутин у об'єктах дослідження обчислювали у % за формулою:

$$\text{для сировини: } X = \frac{A_1 \cdot a_0 \cdot 50 \cdot 1 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot a_1 \cdot 25 \cdot 2 \cdot 25 \cdot (100 - w)} \quad (2.3),$$

$$\text{для екстрактів: } X = \frac{A_1 \cdot a_0 \cdot 25 \cdot 1 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot a_1 \cdot 25 \cdot 2 \cdot 25 \cdot (100 - w)} \quad (2.4),$$

- де A_1 – оптична густина досліджуваного розчину;
 A_0 – оптична густина комплексу ДСЗ рутину з алюмінію хлоридом;
 a_1 – наважка сировини, у г;
 a_0 – наважка ДСЗ рутину, у г;
 w – втрата в масі при висушуванні, у %.

Приготування розчину ФСЗ рутину. Близько 0,01 г рутину (ФС 42-2508-87) (точна наважка), висушеного до постійної маси при температурі 135 °С, вносили у мірну колбу ємністю 25,0 мл, розчиняли у 96 % етанолі P , доводили об'єм розчину до мітки та перемішували.

Приготування 3 % розчину алюмінію хлориду P у 96 % етанолі P . 3,0 г алюмінію хлориду P (х.ч., ч.д.а за ДСТ 3759-85) розчиняли у 50 мл 96 % етанолі P у мірній колбі ємністю 100,0 мл, об'єм розчину доводили тим же розчинником до позначки і перемішували.

Вміст флавоноїдів визначали також у сухих екстрактах у відповідності до ДФУ спектрофотометричним методом у перерахунку на гіперозид [10, 25].

0,100 г екстракту мучниці звичайної листя поміщали у колбу ємністю 100,0 мл, додавали 1,0 мл розчину гексаметилентетраміну *P* (5 г/л), 20,0 мл ацетону *P* та 2,0 мл кислоти хлористоводневої *P*, кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 30 хв та фільтрували крізь ватний тампон у колбу ємністю 100,0 мл. Ватний тампон додавали до залишку в круглодонну колбу і екстрагували 2 порціями ацетону *P* (по 20 мл кожна), кожний раз проводячи кип'ятіння зі зворотним холодильником протягом 10 хв, охолоджували до кімнатної температури, фільтрували кожний екстракт крізь ватний тампон у колбу. Охолоджені об'єднані ацетонові витяжки фільтрували крізь паперовий фільтр у мірну колбу на 100 мл, доводили об'єм розчину ацетоном *P* до мітки. 20,0 мл одержаного розчину поміщали у ділильну лійку, додавали 20,0 мл води *P* та екстрагували суміш 15 мл, а потім 3 порціями по 10 мл кожна, етилацетатом *P*. Одержані етилацетатні витяжки об'єднували у ділильній лійці, промивали 2 порціями води *P* (по 50 мл кожна), фільтрували над 10 г натрію сульфату безводного *P* у мірну колбу ємністю 50,0 мл і доводили об'єм розчину етилацетатом *P* до мітки (розчин Д).

Випробовуваний розчин. До 10,0 мл розчину Д додавали 1,0 мл реактиву алюмінію хлориду *P* і доводили розчином 5 % кислоти оцтової льодяної *P* у метанолі *P* (об/об) до об'єму 25,0 мл.

Компенсаційний розчин. 10,0 мл вихідного розчину доводили розчином 5 % кислоти оцтової льодяної *P* у метанолі *P* (об/об) до об'єму 25,0 мл. Через 30 хв вимірювали оптичну густину (2.2.25) випробовуваного розчину у порівнянні з компенсаційним розчином при 425 нм. Вміст флавоноїдів в перерахунку на гіперозид, у %, обчислювали за формулою:

$$X = \frac{A \cdot 1,25}{m} \quad (2.5),$$

де *A* – оптична густина випробовуваного розчину (425 нм);

m – маса наважки екстракту, у г.

Використовували питомий показник поглинання гіперозиду, який дорівнює 500.

10. Вміст суми фенольних сполук визначали спектрофотометричним методом у перерахунку на галову кислоту [13, 25, 46].

Пробопідготовка для сировини: 1,0 г подрібненого листа мучниці звичайної (точна наважка) поміщали в колбу ємністю 200,0 мл та додавали 30 мл 40 % розчину етанолу *P*. Колбу приєднували до зворотного холодильника і нагрівали на водяному огрівнику протягом 15 хв. Екстракцію проводили ще двічі. Витяжки об'єднували, охолоджували і фільтрували крізь паперовий фільтр в мірну колбу ємністю 100,0 мл та доводили об'єм розчину 40 % етанолом *P* до позначки (розчин *E*).

Пробопідготовка для екстрактів: близько 0,05 г сухого екстракту мучниці звичайної листа (точна наважка) розчиняли, постійно перемішуючи, в 10 мл 40% розчину етанолу *P*. Процес повторювали тричі з новою порцією розчинника. Розчини об'єднуємо, фільтрували крізь паперовий фільтр і кількісно вносимо в мірну колбу ємністю 50,0 мл, доводили об'єм розчину у колбі до мітки цим же розчинником, перемішували (розчин *Ж*).

1,0 мл розчину *E* (розчину *Ж*) вносили в мірну колбу ємністю 25,0 мл, доводимо об'єм 40 % розчином етанолу *P* до мітки і перемішували. 2,0 мл отриманого розчину вносили в мірну колбу ємністю 25,0 мл і доводили тим же розчинником до мітки. Вимірювали оптичну густину при 270 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Як розчин порівняння використовували 40 % розчин етанолу *P*.

Вміст суми фенольних сполук (*X*) у перерахунку на галову кислоту у об'єктах обчислювали у % за формулою:

$$\text{для сировини:} \quad X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 100}{540 \cdot m \cdot 1 \cdot 2 \cdot (100 - w)} \quad (2.6),$$

$$\text{для екстракту: } X = \frac{A \cdot 50 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 100}{540 \cdot m \cdot 1 \cdot 2 \cdot (100 - w)} \quad (2.7),$$

де A – оптична густина розчину витягу (270 нм);

m – маса наважки сировини (екстракту), у г;

540 – коефіцієнт питомого поглинання розчину галової кислоти у 40 % етанолі P за довжини хвилі 270 нм;

w – втрата в масі при висушуванні сировини (екстракту), %.

11. Для кількісного визначення іридоїдів [151] 1,0 мл витяжки з листя мучниці звичайної переносили у мірну колбу ємністю 25,0 мл, додавали 5,0 мл лужного розчину гідроксиламіну P і залишавали на 20 хвилин. Через 20 хв додавали 10,0 мл 1 М розчину кислоти хлористоводневої P і 5,0 мл 1 % розчину хлориду заліза (III) P у 0,1 М розчині кислоти хлористоводневої P , перемішували (розчин 3). Після перемішування вимірювали оптичну густина розчину 3 на спектрофотометрі за довжини хвилі 512 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм.

Як розчин порівняння використовували суміш з 1,0 мл витяжки, 5,0 мл води P , 10,0 мл 1 М розчину кислоти хлористоводневої P і 5,0 мл 1 % розчину хлориду заліза (III) P у 0,1 М розчині кислоти хлористоводневої P .

Вміст суми іридоїдів у перерахунку на гарпагід та абсолютно суху сировину у (%) вимірювали за формулою:

$$X = \frac{A \cdot V \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot 5 \cdot (100 - W)} \quad (2.8),$$

де A – оптична густина випробуваного розчину;

m – наважка сировини, у г,

A_0 – питомий показник поглинання продуктів реакції гарпагіду з гідроксиламіном та хлоридом заліза (III);

W – втрата в масі під час висушування, у %.

12. *Визначення гострої токсичності* проводилось на безпородних мишах масою 20-26 г, які утримувались у віварії Центральної науково-дослідної лабораторії НФаУ під керівництвом проф. Кіреєва І. В. у стандартних умовах на звичайному раціоні при вільному доступі до води і їжі. Дослідження проводили на 11 групах тварин по 5 мишей у кожній. Кожна група тварин отримувала перорально через шлунковий зонд одноразово водний розчин досліджуваного екстракту у дозі 3000 мг/кг. Загальна тривалість спостереження за тваринами після введення екстрактів складала 14 днів. У ході дослідження реєстрували такі показники: зовнішній вигляд, поведінку тварин, стан шерсті, видимих слизових оболонок, відношення до корму, ритм, частоту дихання, час виникнення і характер інтоксикації, її важкість, перебіг, час загибелі тварин чи їх одужання. Протягом всього часу спостережень дослідні тварини залишались активними, рухливими, з нормальною координацією рухів, стандартною реакцією на зовнішні подразники, нормальним зовнішнім виглядом, як і група контрольних тварин.

13. *Діуретична активність*. Визначення діуретичної активності екстрактів проводили за методом Берхіна Е. Б. [4, 50, 54] на безпородних щурах масою 150-220 г на базі ЦНДЛ НФаУ під керівництвом професора Кіреєва І. В. Тварин утримували у стандартних умовах на звичайному раціоні при вільному доступі до води і їжі. Тварини були розділені на три групи по 5 щурів в кожній. Діуретичну дію екстрактів оцінювали за кількістю виділеної сечі через 4 години від початку експерименту. До початку експерименту тварин витримували протягом 2 годин без їжі з вільним доступом до води. Досліджувані екстракти вводили перорально у вигляді водних розчинів у дозі 50 мг/кг за 60 хвилин до початку експерименту. Дослідження проводили з водним навантаженням – 3 % від маси тіла тварини. Контролем виступали щурі, які отримували відповідний об'єм фізіологічного розчину. Догляд за тваринами відповідав положенням Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною і іншими науковими цілями (Страсбург, 1986) [96].

14. *Антимікробна активність*. Вивчення антибактеріальної активності екстрактів мучниці звичайної проводили методом дифузії в агар у лабораторії біохімії мікроорганізмів та живильних середовищ Інституту мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова під керівництвом к.біол.н. Осолодченко Т. П. Згідно з рекомендаціями ВООЗ для оцінки активності препаратів використовували референс-штами *Staphylococcus aureus* 25923 ATCC, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Basillus subtilis* ATCC 6633 і *Candida albicans* 653/885 ATCC. Для дослідження використовували 1 % розчини екстрактів [25, 45, 50]. Метод дифузії екстрактів у агар проводили з використанням методу «колодязів». Для дослідження використовували чисті культури мікроорганізмів, які попередньо вирощували при температурі 37 °С протягом 24 годин на м'ясопептонному агарі. Бактеріальну суспензію готували на стерильному 0,9 % розчині натрію хлориду *P*. На агар, що застив, за допомогою піпетки у стерильних умовах у чашки Петрі вносили по 1,0 мл суспензії мікроорганізмів. Після рівномірного розподілу мікроорганізмів по всій поверхні агару чашки інкубували при кімнатній температурі протягом 15-20 хв. Далі у чашках робили лунки діаметром 6 мм, в які вносили розчини досліджуваних екстрактів (об'ємом 0,25-0,3 мл). Чашки підсушували 30-40 хв. при кімнатній температурі та ставили у термостат на 18-24 години. Після закінчення інкубації чашки поміщували догори дном на темну матову поверхню так, щоб світло падало на них під кутом в 45 ° (облік у відбитому світлі). Діаметр зон затримки росту вимірювали з точністю до 1 мм, користуючись штангенциркулем. При вимірюванні зон затримки росту орієнтувалися на зону повного придушення видимого росту. Оцінку результатів проводили за наявності або відсутності росту мікроорганізму навколо лунки, враховуючи шляхом вимірювання діаметру навколо лунки у міліметрах. Антибактеріальну активність оцінювали за критеріями: відсутність зон затримки росту мікроорганізмів навколо лунки, а також зони затримки до 10 мм вказує на те, що мікроорганізм не чутливий до внесеного у

лунку екстракту; зони затримки росту діаметром 10-15 мм вказують на низьку чутливість культури мікроорганізмів до випробуваної концентрації екстракту; зони затримки росту діаметром 15-25 мм розцінюють як показник чутливості мікроорганізму до випробуваного засобу; зони затримки росту більше 25 мм свідчать про високу чутливість мікроорганізмів до препарату [10, 142].

15. *Протизапальна активність.* Визначення протизапальної активності одержаних екстрактів проводили згідно з методичними рекомендаціями дослідження лікарських засобів за редакцією Стефанова О. В. [50] на білих щурах масою 180-220 г на базі ЦНДЛ НФаУ під керівництвом професора Кіреєва І. В. Досліджуваний екстракт вводили перорально у вигляді водного розчину в дозах 25, 50, 75 та 100 мг/кг за 60 хвилин до початку експерименту. Контролем виступали тварини, яким вводили відповідний об'єм фізіологічного розчину. Препаратом порівняння був диклофенак натрію в ефективній дозі 8 мг/кг. Гостре асептичне запалення відтворювали введенням 1 %-ного розчину карагеніну, який вводили щурам субплантарно у об'ємі 0,1 мл на тварину через 1 годину після введення досліджуваних препаратів. Вимірювання величини набряку лап у щурів при гострому ексудативному запаленні проводили за допомогою механічного онкометра за О. С. Захаревським у динаміці при карагеніновому набряку – через 1, 2, 3, 4 години. Антиексудативну активність досліджуваних екстрактів визначали за здатністю зменшувати розвиток набряку у порівнянні з групою контрольної патології, яку розраховували та виражали у відсотках [50].

16. *Гіпоглікемічна активність.* Первинний фармакологічний скринінг гіпоглікемічних властивостей нових екстрактів, одержаних з мучниці звичайної листя, з додаванням амінокислот проводили на інтактних тваринах на базі ЦНДЛ НФаУ під керівництвом доцента Кравченко Г.Б. та аспіранта М. Мазена. Для скринінгу гіпоглікемічної активності використовували інбредних самців-альбіносів щурів (віком приблизно 14 тижнів) вагою 180-200 г. Тварини утримувалися у стандартних умовах віварію та отримували раціон, рекомендований для цього виду тварин та мали вільний доступ до

води. За 16 годин до початку експерименту тварин позбавляли їжі, але зберігали вільний доступ до води. Для оцінки гіпоглікемічної активності екстрактів було проведено два експерименти – первинний скринінг та оральний тест толерантності до глюкози (ОТТГ) [50]. Тварини були розділені на групи ($n = 4$) у залежності від мети експерименту: 1 – інтактний контроль (ІК) – здорові тварини, яким вводили фізіологічний розчин; 2– тварини, яким внутрішньошлунково вводили екстракт мучниці звичайної у дозі 100 мг / кг (ПЕ) [112]; 3– тварини, яким внутрішньошлунково вводили екстракти мучниці звичайної з додаванням амінокислот у дозі 100 мг/кг. Відповідно до номерів груп з додаванням: 4 – цистеїну (ПЕЦ), 5 – фенілаланіну (ПЕФ), 6 – валіну (ПЕВ), 7 – гліцину (ПЕГ), 8 – аланіну (ПЕА), 9 – лейцину (ПЕЛ), 10 – гістидину (ПЕГі), 11 – лізину (ПЕЛі), 12 – аргініну (ПЕАр), 13 – глютамінової кислоти (ПЕГлу); 14 – тварини, яким вводили відвар арфазетину (АІ) у рекомендованій дозі, яка перерахована для щурів (18 мл/кг). Концентрацію глюкози у крові визначали за допомогою глюкометра «One Touch Select» (LifeScan, США) через 0, 2, 4, 6 і 8 годин після введення екстрактів, зразки крові збирали шляхом надрізу ясен у щурів [50, 90].

Оральний тест толерантності до глюкози (ОТТГ) у здорових щурів. Для вивчення гіпоглікемічної активності за допомогою ОТТГ використовували інбредних самців-альбіносів щурів (віком приблизно 16 тижнів) вагою 200-240 г. Для аналізу брали екстракти ПЕ, ПЕЦ, ПЕАр та ПЕГлу, які показали найбільшу активність у попередньому тесті. Тварини були розділені на групи ($n = 6$) в залежності від мети експерименту: 1 - інтактний контроль (ІК) – здорові тварини, яким вводили фізіологічний розчин; 2 – тварини, яким вводили розчин глюкози у дозі 3 г/кг маси тіла *per os* (навантаження на глюкозу, для іншої групи тварин через 30 хв після введення препарату); 3 – тварини після завантаження глюкози та введення ПЕ; 4 – тварини після завантаження глюкози та введення ПЕЦ; 5 – тварини після завантаження глюкози та введення ПЕАр; 6 – тварини після завантаження глюкози та введення ПЕГлу; 7 – тварини після глюкози завантажують АІ (18 мл/кг); 8 –

тварини після глюкози завантажують метформін (15 мг/кг). Тестові екстракти вводили вночі живим поживним тваринам перорально за допомогою шлункового катетера з рукавом шприца у дозі 100 мг/кг. Концентрацію глюкози у крові визначали за допомогою глюкометра «One Touch Select» (LifeScan, США) в інтервалі 0, 15, 30, 60 90 та 120 хвилин після навантаження на глюкозу, зразки збирали шляхом надрізу ясен у щурів [90].

17. *Панкреопротекторну активність* екстрактів досліджували на базі ЦНДЛ НФаУ під керівництвом доцента Кравченко Г.Б. та аспіранта Мазена М. Самців статевозрілих безпородних щурів-альбіносів тримали на стандартній дієті та вводили екстракти в звичайних умовах з вільним доступом до води. Щоб змодельовати експериментальну інсулінорезистентність (ІР), використовували ін'єкції низьких доз дексаметазону (Dex) (4 мг/л мл, KRKA, A 76532) [70]. В експерименті тварин поділили на такі групи (6 тварин у групі): 1 – інтактний контроль тварин (ІК); 2 – ІР тварини, яким щодня внутрішньочеревинно вводили дексометазон (KRKA, Словенія) 15 мкг/кг маси тіла протягом 7 тижнів (Dex); 3 – ІР тварини (див. групу Dex), яким починаючи з 5-го тижня експерименту вводили *per os* екстракт мучниці звичайної листя (PE50) у дозі 100 мг/кг маси тіла протягом 2 тижнів (Dex_PE); 4 - ІР тварини (див. групу Dex), яким починаючи з 5-го тижня досліду вводили *per os* екстракт мучниці звичайної модифікований цистеїном (ПЕЦ) у дозі 100 мг/кг маси тіла протягом 2 тижнів (Dex_ПЕЦ); 5 – ІР тварини (див. групу Dex), яким починаючи з 5-го тижня експерименту вводили *per os* цистеїн (L-Cysteine, Sigma-Aldrich) у дозі 100 мг/кг маси тіла протягом 2 тижнів (Dex_cys); 6 – ІР тварини (див. групу Dex), яким починаючи з 5-го тижня експерименту вводили *per os* метформін у дозі 100 мг/кг маси тіла протягом 2 тижнів (Dex_met); 7 – ІР тварини (див. групу Dex), яким починаючи з 5-го тижня експерименту перорально вводили настій «Арфазетин» у дозі 18 мл/кг маси тіла протягом 2 тижнів (Dex_arph).

В останній день експерименту після голодування протягом 12 год щурів умертвляли шляхом обезголовлення та відбирали зразки крові для отримання

сироватки крові. Підшлункову залозу вирізали, перфузували та промивали охолодженим фізіологічним розчином. 10 % (мас./об.) гомогенатів (10 мМ Tris–HCl-буфер рН 7,4) готували за допомогою гомогенізатор Potter Elvehjem з пластиковим покриттям. Оцінювали окислювальний стрес у гомогенатах тканини підшлункової залози за реакційною здатністю з тіобарбітуровою кислотою (TBARS) [84], дієновими кон'югатами (DC) [139] і відновленням глутатіону (GSH) [123], а також активністю супероксиддисмутази (SOD) тканин [121], глутатіонпероксидази (GSH-Rx) [102] і каталаза (CAT) [135]. Концентрацію білка в гомогенатах визначали за методом Лоурі J.Y Lowry в Модифікація G.L. Miller [122], використовуючи як стандарт бичачий сироватковий альбумін. У гомогенаті підшлунковій залозі загальної JNK було визначено за допомогою комерційного набору Людина/Миша/Щур Total JNK Pan Specific DuoSet IC ELISA (R&D Systems, Inc., США). Phospho-JNK1/2 (p-JNK) в підшлунковій залозі визначали за допомогою комерційних наборів [pTr183/Tyr185] Набір JNK1/2 EIA (Enzo Life Sciences). Рівень глюкози в крові натщесерце (FBR) та концентрацію імунореактивного інсуліну (IRI) визначали за допомогою використання наявних комплектів («Felicity Diagnostics», Україна та «DRG», Німеччина відповідно). А потім за допомогою калькулятора розраховували індекс оцінки моделі гомеостазу (НОМА). (<https://www.dtu.ox.ac.uk/homacalculator/>: $\text{НОМА-IR} = (10 \times \text{G0}) / 22,5$, де G—FBG в ммоль/л).

18. Статистичні розрахунки.

Статистичні властивості випадкових величин з n-мірним нормальним розподілом задаються їх кореляційними матрицями, які можна розрахувати з вихідних матриць. Статистична оцінка всіх фармакологічних результатів представлені як середнє значення $\pm \Delta$ та були проаналізовані за допомогою програмного забезпечення STATISTICA 6,0 з одностороннім дисперсійним аналізом. Р значення менше 0,05 вважалося статистично значущим [10, 84, 113].

РОЗДІЛ 3

ФІТОХІМІЧНИЙ СКРИНІНГ ОСНОВНИХ ГРУП БАР У МУЧНИЦІ ЗВИЧАЙНОЇ ЛИСТІ ТА ОДЕРЖАННЯ ГАЛЕНОВИХ ЕКСТРАКТІВ НА ЇХ ОСНОВІ

Мучниці звичайної листя – один з найбільш широко використовуваних видів лікарської рослинної сировини з діуретичною та уроантисептичною діями, які наукові першоджерела приписують арбутину та іншим гідрокінонпохідним. Більшість наукових досліджень була присвячена саме дослідженню арбутину, тоді як ця сировина багата і на інші БАР фенольної природи.

Головними діючими речовинами мучниці звичайної листя та її лікарських засобів є прості феноли, гідроксикоричні кислоти, флавоноїди та дубильні речовини. Гідрокінон похідні представлені арбутином, метиларбутином та кавоїларбутином [126]. У листі мучниці звичайної містяться фенолокислоти (галова та елагова – до 6 %) [140], флавоноїди (мірицетин, гіперозид та кверцетин), іридоїдні глюкозиди (асперулозид, монотропеїн і унедозид) [73, 117].

Однак, фармацевтичною промисловістю, в основному, використовується дія гідрокінонпохідних цієї рослини, у той час як вона багата і на інші фенольні сполуки, які потенційно мають протизапальну, гіпоглікемічну та гіполіпідемічну дію. Тому дослідження інших груп БАР мучниці звичайної листя та одержання з них нових екстрактів із сконцентрованим їх вмістом є актуальним завданням сучасної фармацевтичної науки.

3.1 Хроматографічний скринінг основних груп БАР у мучниці звичайної листі

Для приготування витягів для аналізу суху сировину (мучниці звичайної листя), подрібнену до розміру часток 2-3 мм, заливали 70 % розчином етанолу

і настоювали при кімнатній температурі протягом 24 годин. Отримані витяги фільтрували крізь складчастий фільтр, упарювали та готували 1 % спиртові розчини, які в подальшому і досліджували.

3.1.1 Ідентифікація арбутину

Ідентифікацію арбутину у досліджуваних витягах мучниці звичайної листя проводили методом ТШХ у порівнянні з достовірним зразком арбутину згідно ДФУ [10].

На лінію старту ТШХ пластинки смугами окремо наносили 20 мкл досліджуваного витягу і 10 мкл розчину порівняння. ТШХ пластинку поміщали у камеру із сумішшю розчинників кислота мурашина безводна *P* - вода *P* - етилацетат *P* (6:6:88). Коли фронт розчинників пройшов 15 см від лінії старту, пластинку виймали з камери, сушили при температурі від 105 °С до 110 °С до видалення розчинників (рухомої фази), обприскували розчином 10 г/л дихлорхінонхлоріміду *P* у метанолі *P*, потім розчином 20 г/л натрію карбонату безводного *P* та переглядали при денному світлі.

На хроматограмі розчину порівняння у нижній частині виявили світло-голубу пляму, яка відповідала арбутину. На хроматограмі випробуваного розчину виявилася зона арбутину відповідна за забарвленням. На хроматограмі випробовуваних розчинів виявилось також 3 блакитні смуги та 2 коричневі смуги.

3.1.2 Ідентифікація фенолкарбонових кислот

Фенолкарбонові кислоти у витягах мучниці звичайної листя досліджували методом паперової хроматографії висхідним способом у 2 % оцтовій кислоті *P*. Виявлення кислот проводили в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм [2, 9].

При детектуванні фенолкарбонових кислот в УФ-світлі виявлено кілька плям із сірою, блакитною, блакитно-зеленою та блакитно-фіолетовою

флуоресценцією, що після проявлення хроматограми реактивом Паулі набували забарвлення у видимому світлі. За хроматографічною поведінкою (забарвленням плям в УФ-світлі, значенням R_f при порівнянні зі стандартними зразками) було ідентифіковано галову, елагову та протокатехову кислоти.

3.1.3 Ідентифікація гідроксикоричних кислот

Для виявлення похідних гідроксикоричної кислоти у витягах мучниці звичайної листя досліджували методом двомірної хроматографії з достовірними зразками гідроксикоричних кислот у системах: I напрям – *n*-бутанол *P* - оцтова кислота *P* - вода *P* (4:1:2) і II напрям – 15 % оцтова кислота *P* з наступним проявленням хроматограм парами аміаку *P* і діазореактивом [2, 9]. Встановили, що у сировині містяться хлорогенова і *n*-кумарова кислоти.

3.1.4 Ідентифікація кумаринів

Для виявлення кумаринів водний залишок у витягах мучниці звичайної листя фракціонували сумішшю хлороформу *P* та спирту *P* (9:1). Отриманий хлороформно-спиртовий (9:1) витяг хроматографували у системах – хлороформ *P* (формахід *P* 25 %) і гексан *P* (формахід *P* 25 %) після попереднього імпрегнування хроматографічного паперу. При перегляді хроматограм в УФ-світлі, при обробці розчином діазореактиву та 10 % спиртовим розчином калію гідроксиду. Виявлено 4 речовини кумаринової природи.

Для диференціації виявлених кумаринів від похідних гідроксикоричної кислоти проведена реакція відщиплення замісників у кумариновому кільці йодистоводневою кислотою у середовищі рідкого фенолу та оцтового ангідриду [24, 31].

Для цього брали 150,0 мл хлороформно-спиртового (9:1) витягу, випарювали до видалення розчинників, залишок змішували з 3 мл суміші

кислоти йодистоводневої P , рідкого фенолу P та оцтового ангідриду P (6:1:1). Колбу зі зворотним холодильником нагрівали на гліцериновій бані до 130-135 °C протягом двох годин. Після цього реакційну суміш охолоджували, додавали водою P до об'єму 5 мл, вносили у ділильну лійку, фракціонували по 0,1 мл етилацетату два рази і хроматографували на папері у системі хлороформ P (формахід P 25 %) паралельно з достовірним зразком кумарину. Після хроматограму висушували та обробляли діазореактивом та 10 % спиртовим розчином калію гідроксиду. В УФ-світлі на хроматограмі досліджуваного витягу було виявлено кумарин.

3.1.5 Ідентифікація флавоноїдів

Флавоноїди у витягах мучниці звичайної листя визначали загальновідомими якісними реакціями: ціанідиною пробою за Бріантом, реакцією з 3 % розчином хлориду заліза. За результатами реакцій виявили присутність глікозидів та агліконів флавоноїдної природи [13, 46].

Після обробки двомірної хроматограми (I напрям – н-бутанол P - оцтова кислота P - вода P (4:1:2) і II напрям – 15 % оцтова кислота P) парами аміаку P та 2 % спиртовим розчином алюмінію хлориду P плями агліконів мали яскраво-жовту флуоресценцію, а темно-коричневі плями стали жовто-зеленими, що характерно для агліконів флавонолів та 3-О-глікозидів флавонолів. У спиртовому витязі було ідентифіковано не менше 6 речовин флавоноїдної природи. Для встановлення їх природи проводили гідроліз 8 % кислотою хлористоводневою.

Моноцукри, які утворилися при гідролізі флавоноїдних глікозидів, аналізували методом ПХ у системі розчинників: ацетон P - н-бутанол P - оцтова кислота P - вода P (7:2:2:2). Проявлення вуглеводних компонентів проводили бутанольним розчином анілінфталату при прогріванні хроматограм при 105 °C до прояву плям [2, 9]. Були ідентифіковані глюкоза та рамноза.

За кольором флуоресценції, забарвленням плям та величиною R_f на хроматограмі після обробки парами аміаку P та спиртовим розчином алюмінію хлориду P у порівнянні з достовірними зразками, серед флавоноїдів було ідентифіковано кверцетин, рутин та гіперозид.

Катехіни у витязі мучниці звичайної листя визначали методом ТШХ, у відповідності з методикою ДФУ [10], у системі розчинників: кислота оцтова льодяна P – ефір P – гексан P – етилацетат P (20:20:20:40). Для порівняння використовували стандартні зразки катехіну та епігалокатехіну розчинених у метанолі у концентрації 0,1 %. Наносили по 20 мкл випробуваного розчину та розчину порівняння. Хроматограму з нанесеними речовинами вміщували у камеру з розчинниками. Коли фронт розчинників пройшов близько 10 см, пластинку виймали з камери, висушували на повітрі до видалення слідів розчинників. Потім хроматограму обробляли свіжоприготованим розчином 5 г/л міцного синього P . У витязі було виявлено катехін.

3.1.6 Ідентифікація дубильних речовин

Виявлення дубильних речовин у витязі з мучниці звичайної листя проводили за допомогою якісної реакції з залізоамонійними галунами. Розчин витягу набував темно-синього забарвлення, що свідчить про вміст у сировині дубильних речовин, що гідролізуються.

У результаті хроматографічного вивчення спиртового витягу з мучниці звичайної листя та продуктів його гідролізу (5 % сірчаною кислотою P) за допомогою ПХ у системах: н-бутанол P - кислота оцтова P - вода P (4:1:2), 5 %, 30 % та 60 % кислота оцтова P з використанням 1 % спиртового розчину заліза хлориду (III) P , як хромогенного реактиву, встановили наявність галової та елагової кислот. При кількісному нанесенні площа плям галової та елагової кислот збільшується після гідролізу, що вказує на наявність гало- та елаготанінів [2, 9].

3.1.7 Ідентифікація тритерпенових сапонінів

У 1 % спиртовому розчині витягу з мучниці звичайної листя при інтенсивному струшуванні утворювалась стійка піна. При цьому інтенсивність піни не змінювалась при додаванні кислоти або лугу, що вказує на присутність тритерпенових сапонінів [2, 9].

3.2 Дослідження фенольних сполук мучниці звичайної листя методом ВЕРХ

Для дослідження фенольних сполук у мучниці звичайної листі 5 г сухої сировини (точна наважка), подрібнену до розміру часток 2-3 мм, заливали 50,0 мл етанолу *P*, настоювали при кімнатній температурі протягом доби, фільтрували крізь паперовий фільтр у мірну колбу ємністю 50,0 мл та доводили розчинником до мітки. Одержаний витяг з мучниці звичайної листя використовували для аналізу.

Вивчення складу фенольних сполук проводили методом ВЕРХ на хроматографі Shimadzu LC20 Prominence (табл. 3.1 та рис. 3.1).

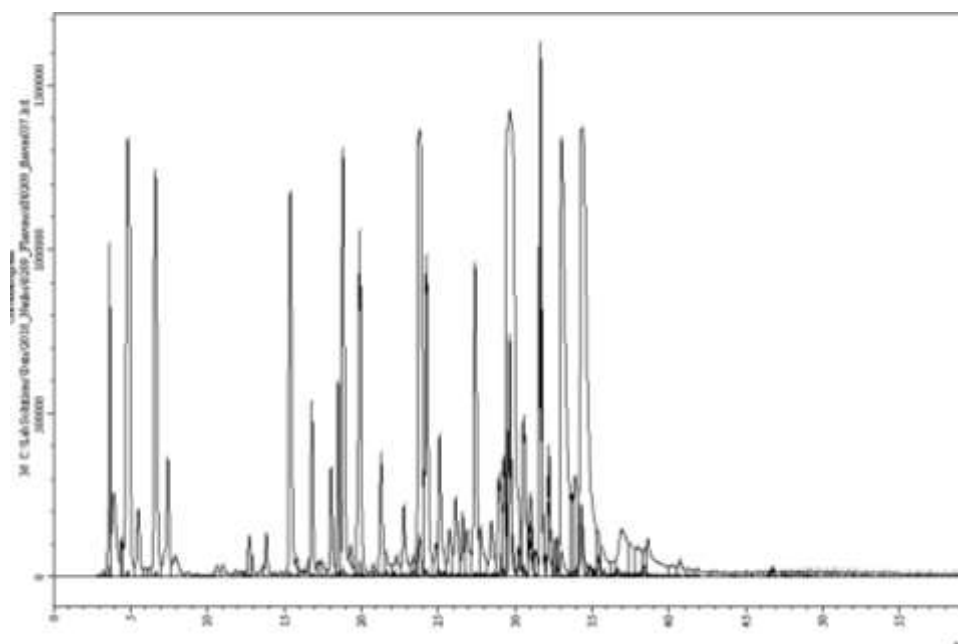


Рис 3.1 Типова хроматограма фенольних сполук мучниці звичайної листя

Ідентифіковано 8 речовин, серед яких домінуючими були арбутин, гіперозид та катехін. Значну кількість речовин ідентифікувати не вдалось, оскільки були відсутні стандартні речовини.

Таблиця 3.1

**Результати дослідження фенольних сполук мучниці звичайної
листя**

Речовина	Вміст у сировині, %
Галова кислота	0,094±0,003
Арбутин	2,956±0,021
Рутин	0,010±0,002
Елагова кислота	0,044±0,005
Гіперозид	0,382±0,009
Кверцитрин	0,014±0,003
Кверцетин	0,002±0,001
Катехін	0,230±0,005

У мучниці звичайної листі спостерігався значний вміст фенольних сполук, однак з усього різноманіття ідентифіковані тільки арбутин, 2 фенолкарбонові кислоти: галову та елагову, та 5 флавоноїдів. Так вміст арбутину у сировині був 2,96 %. Домінуючим флавоноїдом був гіперозид, тому при розробці параметрів стандартизації екстрактів на основі цієї сировини саме ці речовини доцільно брати за стандарт для перерахунку.

3.3 Дослідження тритерпенових сапонінів мучниці звичайної листя методом ВЕРХ

Для дослідження тритерпенових сапонінів мучниці звичайної листі 5 г сухої сировини (точна наважка), подрібненої до розміру часток 2-3 мм, заливали 50,0 мл метанолу *P*, настоювали при кімнатній температурі протягом

добу, фільтрували крізь паперовий фільтр у мірну колбу ємністю 100,0 мл, доводити метанолом *P* до мітки. Одержаний витяг мучниці звичайної листя використовували для аналізу.

Аналіз складу тритерпенових сапонінів у мучниці звичайної листі було проведено методом ВЕРХ за допомогою хроматографа Shimadzu LC20 Prominence (табл. 3.2 та рис. 3.2, 3.3). Ідентифікацію компонентів проводили за часом утримування та за відповідністю УФ-спектрів речовинам-стандартам. Спектри тритерпенових сапонінів мають максимум поглинання при (200-210) нм, тому детектування даної групи сполук проводили при 205 нм.

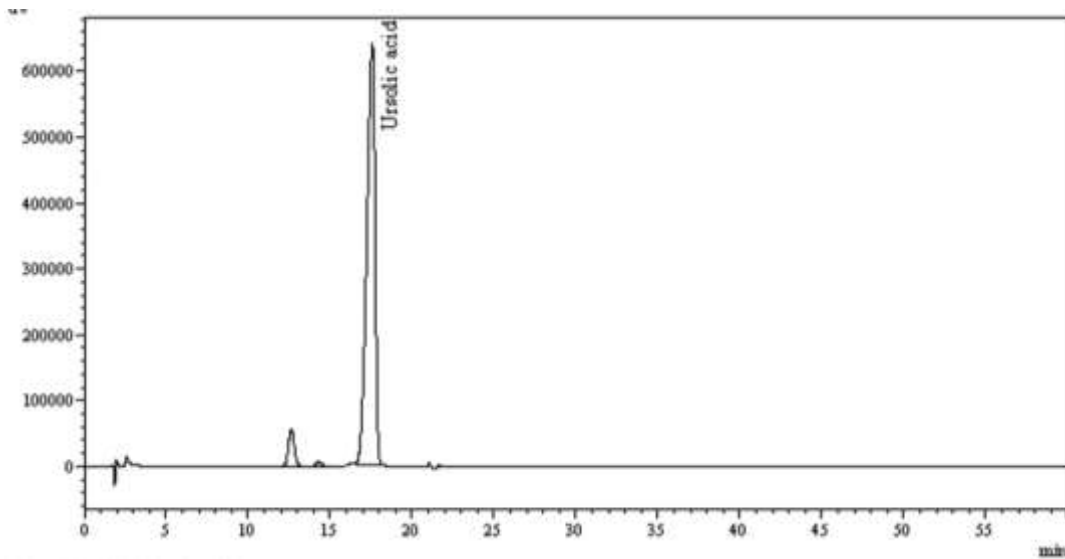


Рис. 3.2 Хроматограма стандарту урсолової кислоти

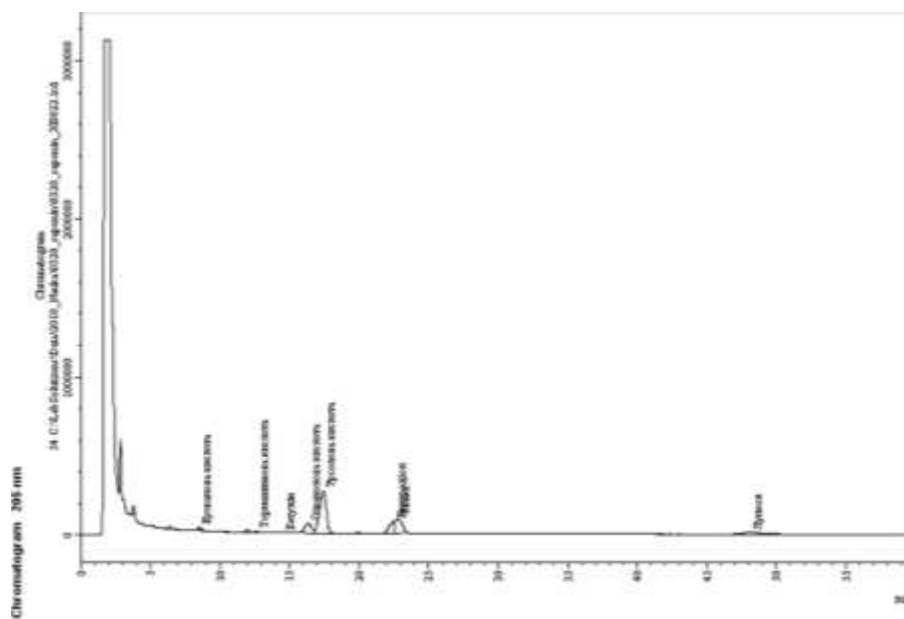


Рис. 3.3 Типова хроматограма сапонінів мучниці звичайної листя

Таблиця 3.2

Результати дослідження тритерпенових сапонінів мучниці звичайної листя

Речовина	Вміст у сировині, %
Урсолова кислота	1,067±0,011
Еускапова кислота	0,038±0,003
Торментинова кислота	0,017±0,004
Уваол	0,348±0,002
Олеанолова кислота	0,165±0,006
Еритродіол	0,160±0,005
Бетулін	0,131±0,004
Лупеол	0,370±0,007

Методом ВЕРХ було ідентифіковано та визначено кількісний вміст 8 сапонінів у мучниці звичайної листі: урсолової кислоти (1,07 %), еускапової кислоти (0,04 %), торментинової кислоти (0,02 %), уваолу (0,35 %), олеанолової кислоти (0,16 %), еритродіолу (0,16 %), бетуліну (0,13 %) та лупеолу (0,37 %). Домінуючими речовинами були урсолова кислота, уваол та лупеол [62].

Таким чином, тритерпенові сапоніни листя мучниці звичайної представлені похідними урсану, олеанану та лупану, серед яких домінують похідні урсану (майже 1,5 %), які, безперечно, мають вплив на загальний діуретичний та антимікробний ефект цієї сировини.

3.4 Дослідження сполук леткої (гексанової) фракції мучниці звичайної листя методом ГХ-МС

Для концентрації речовин леткої фракції 10,0 г мучниці звичайної листя (точна наважка) екстрагували н-гексаном тричі порціями по 50,0 мл. Витяги об'єднували, фільтрували та випарювали розчинник. Сухий залишок розчиняли у 10 мл метанолу *P*. Одержаний розчин використовували для аналізу.

Дослідження сполук леткої фракції мучниці звичайної листя проводили методом ГХ-МС на газовому хроматографі Agilent Technology 6890 з мас-спектрометричним детектором 5973 (табл. 3.3 та рис. 3.4).

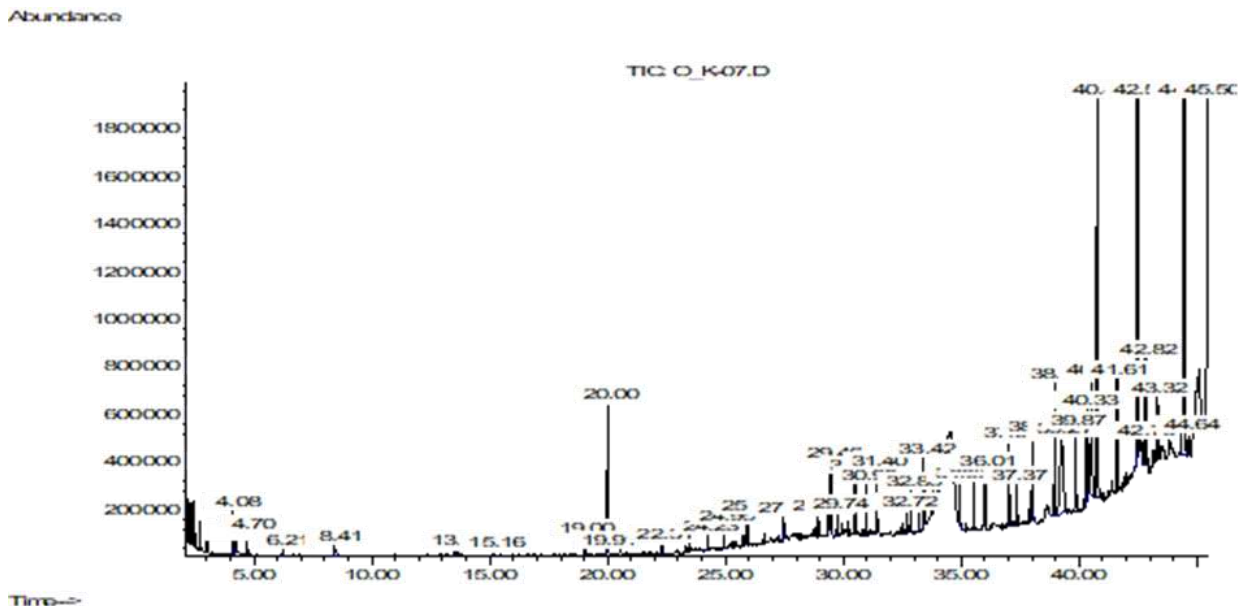


Рис. 3.4 Типова хроматограма леткої фракції мучниці звичайної листя

Вміст речовин леткої фракції був незначний, всього 14,46 мг/100 г сировини, при цьому було виявлено 42 речовини, з яких тільки 26 вдалося ідентифікувати.

Таблиця 3.3

**Результати дослідження сполук леткої (гексанової) фракції мучниці
звичайної листя**

Речовина	Вміст, мг/100 г
1	2
Октан	0,07
Гексаналь	0,02
Нонаналь	0,03
Камфора	0,04
2-Деценаль	0,01
2,4-Декадісналь	0,04
Тетрадекан	0,01
Пентадекан	0,06
Дигідроактинідіолід	0,01
Гексадекан	0,29
Гептадекан	0,02
Октадекан	0,03
Гексагідрофарнезилацетон	0,05
Етилпальмітат	0,05
Фітол	0,04
Етиллінолеат	0,04
4,8,12,16-Тетраметилгептадекан-4-олід	0,11
Тетракозан	0,05
Пентакозан	0,09
Гексакозан	0,09
Гептакозан	0,1
Октакозан	0,06
Нонакозан	0,09
Унтриаконтан	0,12
Тритриаконтан	0,07

Продовж. табл. 3.3

1	2
Нор-олеан-12-ен	0,1
Неідентифіковані речовини (16 речовин)	12,77
Всього (42 речовини)	14,46

Основними речовинами були октан, камфора, 2,4-декадієналь, гексадекан, гексагідрофарнезилацетон, фітол, етилпальмітат, етиллинолеат, 4,8,12,16-тетраметилгептадекан-4-олід, пентакозан, гексакозан, нонакозан, унтриаконтан та тритриаконтан. Домінуючими речовинами є нор-олеан-12-ен, унтриаконтан, нонакозан та фітол. Наявність виявлених летких речовин посилює уроантисептичну дію сировини [142].

3.5 Вибір оптимального екстрагенту для екстракції БАР з мучниці звичайної листя

Для вибору оптимального екстрагенту для екстракції БАР з мучниці звичайної листя було отримано п'ять сухих екстрактів з використанням води, 30, 50, 70 та 96 % етанолу.

Для отримання екстрактів 50 г мучниці звичайної листя, подрібненого до розміру часток 2-3 мм, поміщали у колбу, заливали 250 мл розчину етанолу відповідної концентрації (30, 50, 70 і 96 %), екстрагували протягом доби при кімнатній температурі. Екстракцію повторювали ще раз з новою порцією екстрагенту (250,0 мл). Одержані витяги об'єднували, відстоювали протягом доби, відфільтровували, стерилізували і упарювали за допомогою ротаційного вакуум-випарного апарата до сухих екстрактів. Відповідно були одержані сухі екстракти 2, 3, 4 та 5. З мучниці звичайної листя за відомою класичною технологією отримували відвар [10], який в подальшому висушували у вакуум-ротаційному апараті до сухого екстракту (екстракт 1) (рис 3.5).

Мучниці звичайної листя екстракти сухі були аморфними гігроскопічними порошками від світло-коричневого до коричневого кольору зі слабким запахом. При цьому вихід сухих екстрактів у залежності від екстрагенту склав $16,72 \pm 0,32$ %; $13,12 \pm 0,63$ %; $11,84 \pm 0,41$ %; $10,09 \pm 0,28$ % та $6,72 \pm 0,76$ % відповідно.

На ТШХ хроматограмах екстрактів мучниці звичайної листя у системі розчинників кислота мурашина безводна *P* – вода *P* – етилацетат *P* (6 : 6 : 88) при перегляді у денному світлі ідентифікували коричневі зони на рівні зони галової кислоти та червоні плями на рівні зони арбутину. Таким чином, у екстрактах мучниці звичайної листя було виявлено галову кислоту та арбутин. У системі розчинників етилацетат *P* – вода *P* – кислота мурашина безводна *P* – кислота оцтова безводна *P* (72 : 14 : 7 : 7) у середній частині хроматограми проявляється зона у вигляді жовто-помаранчевої флуоресценції, що відповідає рутину. На хроматограмі випробовуваного розчину проявились також й інші зони, які давали відповідну флуоресценцію.



Рис. 3.5 Схема одержання екстрактів з листя мучниці звичайної

Методом ВЕРХ в одержаних сухих екстрактах мучниці звичайної листя визначено вміст основних БАР фенольної природи і сапонінів (табл. 3.4).

В екстрактах мучниці звичайної листя було визначено арбутин, 2 фенолкарбонові кислоти, 6 флавоноїдів та 8 сапонінів [62]. З одержаних результатів видно, що арбутин та сапоніни, краще екстрагується водою та слабкими розчинами етанолу, тоді як фенолкарбонові кислоти та флавоноїди – 50-70 % етанолом.

Таблиця 3.4

Результати дослідження фенольних сполук сухих екстрактів з мучниці звичайної листя методом ВЕРХ

Речовина	Вміст речовини у екстрактах, мг/100 г				
	1	2	3	4	5
1	2	3	4	5	6
Арбутин	2956,72±	2833,81±	2819,81±	1811,35±	1319,48±
	57,91	43,14	37,62	42,73	44,20
Фенолкарбонові кислоти					
Галова кислота	147,31±	151,62±	160,49±	157,31±	141,11±
	4,25	3,25	3,94	5,23	3,81
Елагова кислота	64,33±	62,32±	65,19±	61,67±	59,39±
	1,22	1,92	1,16	1,54	1,68
Флавоноїди					
Рутин	11,82±	13,42±	14,23±	15,34±0,0	12,54±
	0,03	0,05	0,07	,08	0,04
Гіперозид	446,23±	457,08±1	535,57±	545,57±	479,57±
	13,2	0,9	12,7	13,1	14,2
Кверцитрин	14,55±	24,87±	39,87±	42,06±	38,87±
	0,51	0,72	0,73	0,98	1,01
Кверцетин	3,58±	3,64±	4,44±	4,56±	3,76±
	0,01	0,07	0,02	0,09	0,04

Продовж. табл. 3.4

1	2	3	4	5	6
Ізокверцитрин	0,01	0,01	0,04	0,05	0,03
Катехін	277,57±	281,44±	294,72±	305,11±	272,34±
	5,52	6,33	5,81	5,32	6,22
Сапоніни					
Урсолова кислота	1067,47±	1043,54±	1058,06±	1007,11±	973,18±
	83,22	69,33	73,8	70,22	62,41
Еускапова кислота	38,53±	32,17±	37,74±	37,24±	38,11±
	0,72	0,57	0,63	0,54	0,33
Торментинова кислота	17,49±	17,11±	17,68±	16,26±	14,52±
	0,05	0,03	0,04	0,05	0,07
Уваол	347,63±	351,32±	371,54±	365,25±	361,54±
	10,41	8,41	9,62	7,32	9,63
Олеанолова кислота	164,52±	162,34±	166,90±	154,67±	142,78±
	5,7	7,53	5,76	6,48	7,34
Еритродіол	160,34±	170,23±	172,91±	176,99±	159,01±
	8,11	7,59	6,95	7,43	8,06
Бетулін	130,82±	134,82±	144,76±	140,63±	131,46±
	5,87	4,92	4,51	5,52	4,57
Лупеол	369,52±	362,49±	392,41±	352,87±	339,34±
	11,57	10,91	12,47	9,51	12,09

В одержаних екстрактах було проведено визначення вмісту основних груп БАР методом спектрофотометрії (табл. 3.5 та рис. 3.6).

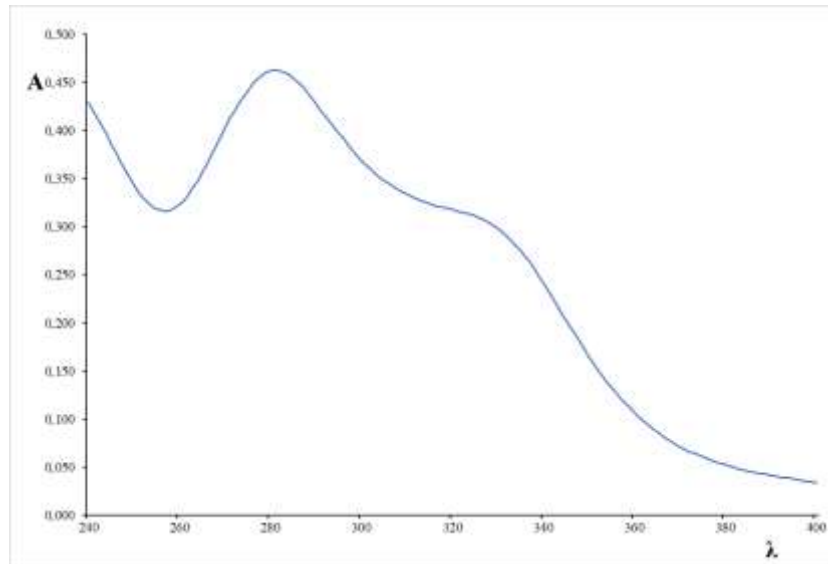


Рис. 3.6 Типовий спектр поглинання сухого екстракту мучниці звичайної.

Таблиця 3.5

Вміст основних груп БАР у сухих екстрактах з мучниці листя

Група БАР	Вміст групи БАР у екстрактах, %				
	1	2	3	4	5
Гідрохінонпохідні	6,98 ±	6,52 ±	5,16 ±	4,52 ±	2,67 ±
	0,05	0,07	0,04	0,05	0,03
Гідроксикоричні кислоти	2,88 ±	3,31 ±	3,25 ±	3,05 ±	2,91 ±
	0,02	0,06	0,07	0,05	0,02
Флавоноїди	4,30 ±	4,86 ±	5,05 ±	5,32 ±	4,65 ±
	0,06	0,07	0,03	0,09	0,05
Сума фенольних сполук	17,68 ±	19,75 ±	19,80 ±	20,01 ±	15,72 ±
	0,09	0,08	0,06	0,08	0,04

Результати досліджень кількісного вмісту основних груп БАР показали, що з листя мучниці звичайної водою та 30 % розчином етанолу забезпечується найкраще екстракція гідрохінонпохідних; гідроксикоричні кислоти краще екстрагуються водно-спиртовими розчинами у концентраціях 30-50 %, флавоноїди – у концентраціях 50-70 %. Враховуючи вихід екстрактів, вміст різних груп фенольних сполук та економічний чинник, встановлено, що 50 %

спирт етиловий є оптимальним екстрагентом для одержання лікарських засобів на основі фенольних сполук із мучниці звичайної листя [53, 64, 134, 158].

Також для підтвердження цього було проведено вивчення діуретичної та антимікробної активності одержаних сухих екстрактів мучниці звичайної листя.

Результати дослідження діуретичної активності екстрактів наведені в табл. 3.6.

Таблиця 3.6

Діуретична активність сухих екстрактів мучниці звичайної листя

Досліджуванні групи тварин	Доза, мг/кг	Середній об'єм діурезу, мл	Збільшення діурезу по відношенню до контролю, %
Група 1 (контрольна, n = 6)	–	2,07 ± 0,16*	0
Група 2 (сухий екстракт 1, n = 6)	50	3,10 ± 0,08*	50
Група 3 (сухий екстракт 2, n = 6)	50	3,25 ± 0,10*	57
Група 4 (сухий екстракт 3 n = 6)	50	3,51 ± 0,30*	70
Група 5 (сухий екстракт 4 n = 6)	50	3,05 ± 0,10*	47
Група 6 (сухий екстракт 5 n = 6)	50	2,75 ± 0,30*	33
Група 7 (препарат порівняння гіпотіазид, n = 6)	25	3,98 ± 0,17*	92

Примітка. * – достовірність результатів при $p < 0,05$ у порівнянні з контролем.

У результаті дослідження діуретичної активності екстрактів мучниці звичайної листя було встановлено, що найбільшою діуретичною активністю володіє екстракт, одержаний 50 % етанолом у дозі 50 мг/кг, збільшуючи діурез на 70 %, що на 22 % менше, ніж активність лікарського засобу гіпотіазиду у дозі 25 мг/кг. Діуретична активність екстракту отриманого 96 % спиртом, у дозі 50 мг/кг становила 33 % і була на 59 % менша, ніж активність препарату

порівняння [53].

Результати досліджень антимікробної активності екстрактів з листя мучниці звичайної наведені у таблиці 3.7.

Таблиця 3.7

Результати вивчення антимікробної активності сухих екстрактів з листя мучниці звичайної

Мікроорганізм	Зона затримки росту, мм					
	Екстракт 1	Екстракт 2	Екстракт 3	Екстракт 4	Екстракт 5	Хлорофіл іпт
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	21,3±0,6	20,7±0,9	22,3±1,0	21,3±1,0	18,7±0,7	20 ± 0,2
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	20,0±1,6	19,0±1,3	20,7±0,6	20,6±1,3	20,0±1,5	14 ± 0,2
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 4636	22,0±0,7	21,3±1,0	20,0±1,5	21,0±0,5	Ріст	Ріст
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	22,6±1,0	21,6±1,0	23,7±0,6	22,0±0,6	22,0±0,7	Ріст
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	20,3±1,3	19,3±1,0	20,3±1,5	20,0±1,3	Ріст	Ріст
<i>Candida albicans</i> ATCC 885/653	23,5±1,5	23,0±1,0	23,3±1,5	20,0±0,3	19,3±1,5	Ріст

З результатів дослідження видно, що сухі екстракти мучниці звичайної листя виявили активність по відношенню до *St. aureus*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* та *C. albicans* на рівні з екстрактом з відвару листя мучниці. Отриманні екстракти виявляють більш широкий спектр антимікробної активності в порівнянні з референс-препаратом Хлорофіліптом. Сухий екстракт мучниці звичайної, отриманий 50 % етанолом, виявив

найвищу активність по відношенню до *P. aeruginosa* та *C. albicans*.

Таким чином, враховуючи вихід екстрактів, вміст різних груп фенольних сполук та економічний чинник, встановлено, що 50 % спирт етиловий є оптимальним екстрагентом для одержання лікарських засобів на основі фенольних сполук із листя мучниці звичайної, а вода очищена оптимальний екстрагент для одержання екстрактів багатих на гідрохінонпохідні.

В результаті проведених фітохімічних та фармакологічних досліджень встановлено, що сухий екстракт з мучниці звичайної листя, отриманий 50 % розчином етанолу, є найбільш перспективною субстанцією з діуретичною та уроантисептичною дією.

3.6 Визначення оптимальної кратності екстракції при одержанні екстрактів

3.6.1 Екстракція водою очищеною

На сьогоднішній час актуальним є одержання субстанцій зі значним вмістом арбутину та гідрохінонпохідних, а вода очищена для них є найкращим екстрагентом, тому було визначено оптимальну кратність водної екстракції мучниці звичайної листя.

50 г (точна наважка) подрібненого листя мучниці звичайної поміщали у колбу об'ємом 750 мл, додавали 660 мл киплячої води очищеної. Потім кип'ятили на водяній бані протягом 30 хв. Після охолодження витяг фільтрували та упарювали до 50 мл. Екстракцію проводили 5 разів.

При хроматографічному визначенні арбутину в витяжках з мучниці звичайної листя спостерігалась світло-голуба пляма ($R_f = 0,32$) у нижній частині хроматограми, що відповідає арбутину на хроматограмі розчину порівняння. Також на хроматограмах розчинів витягів з мучниці звичайної листя виявилось дві коричневі зони та три блакитні.

При хроматографічному дослідженні фенольних сполук витяжок з листя мучниці звичайної методом двовимірної ПХ було виявлено 10 речовин фенольної природи (рис 3.7).

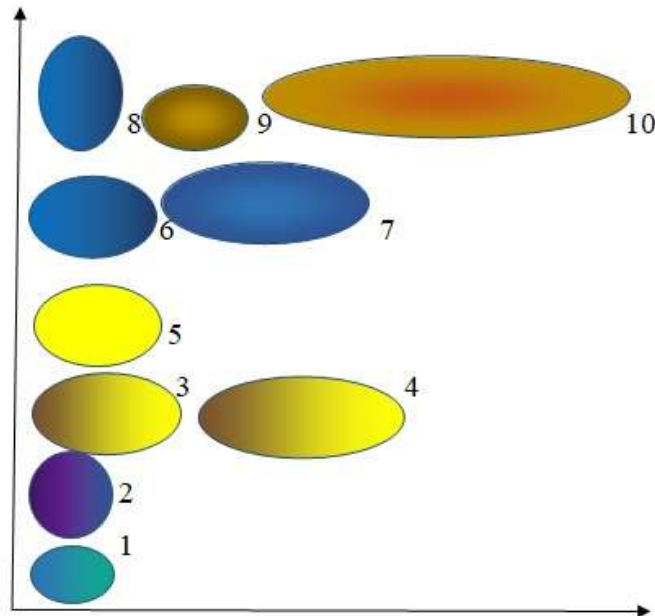


Рис. 3.7 Схема двовимірної ПХ першого водного екстракту з мучниці звичайної листя у системах розчинників етилацетат *P* – кислота мурашина *P* – вода *P* (10:2:3) (I) і 15 % кислота оцтова *P* (II).

Хромогенними реактивами при денному світлі, флуоресценції в УФ-світлі речовини 3-5, 9-10 були попередньо віднесені до флавоноїдів, речовини 1-2, 6-8 – до гідроксикоричних кислот.

При виявленні дубильних речовин у водних витягах з мучниці звичайної листя після додавання залізо-амонійних галунів розчини стали синього кольору, випав темно-синій осад, що свідчить про наявність танінів, що гідролізуються.

Хроматографічне дослідження іридоїдів у витяжках проводили методом ТШХ у системі розчинників: мурашина кислота *P* - оцтова кислота *P* - вода *P* - етилацетат *P* (11:11:27:100). Хроматограми переглядали при денному світлі, в УФ-світлі та після обробки реактивом Шталя. При ТШХ аналізі іридоїдів після обробки реактивом Шталя з'являлися сіро-сині плями речовин, які за

величиною R_f та характером флуоресценції відповідали аукубіну ($R_f = 0,42$) та каталполу ($R_f = 0,13$).

Результати кількісного визначення основних груп БАР у п'яти водних витяжках з листя мучниці звичайної наведені в таблиці 3.8.

Таблиця 3.8

Вміст основних груп БАР у витягах з листя мучниці звичайної

Показники	Кількісний вміст у сухому залишку витягу, %				
	1	2	3	4	5
Сухий залишок	14,79± 0,06	9,95± 0,05	1,61± 0,02	0,45± 0,03	0,18± 0,02
Арбутин	13,42± 0,03	15,64± 0,02	0,78± 0,04	1,28± 0,01	1,60± 0,01
Сума гідроксикоричних кислот	2,40± 0,06	1,60± 0,01	0,25± 0,06	0,15± 0,01	0,12± 0,03
Сума флавоноїдів	1,66± 0,03	1,68± 0,02	0,43± 0,05	0,13± 0,03	0,08± 0,02
Сума фенольних сполук	8,88± 0,02	5,73± 0,03	1,02± 0,01	0,60± 0,02	1,00± 0,02
Сума іридоїдів	0,30± 0,01	0,18± 0,02	0,05± 0,01	-	-

Встановлено кількісний вміст основних груп фенольних сполук та іридоїдів у витягах з мучниці звичайної листя. Одержані витяги багаті на похідні арбутину, гідроксикоричні кислоти, флавоноїди та дубильні речовини.

З таблиці 3.8 видно, що найбільше вилучення основних діючих речовин з сировини забезпечують саме перші дві стадії екстракції, що становить майже 98 % за всіма показниками, тому доцільно екстракцію водою очищеною з цієї сировини проводити двічі, а подальша екстракція призводить до перевитрати енергетичних та трудових ресурсів.

Таким чином, у витяжках з мучниці звичайної листя було виявлено та встановлено кількісний вміст похідних гідрохінону, гідроксикоричних кислот, флавоноїдів і поліфенолів. Встановлено, що оптимальна кратність водної

екстракції з цієї сировини складає два рази, що буде використано при розробці технології одержання нових сухих екстрактів з мучниці звичайної листя.

3.6.2 Екстракція 50 % розчином етанолу

Для визначення оптимальної кратності екстракції БАР з мучниці звичайної листя 50 % розчином етанолу суху сировину, подрібнену до частинок розміром 2-3 мм, заливали 50 % розчином етанолу у співвідношенні 1:5 з урахуванням коефіцієнту поглинання і настоювали протягом доби. Екстракцію повторювали ще три рази з новими порціями екстрагенту. Витяги на кожній стадії збирали окремо. Після приготування витяги профільтрували крізь складчастий фільтр і визначали якісний склад та кількісний вміст основних груп БАР (Розділ 2, п. 7-10).

У витягах мучниці звичайної листя було виявлено такі класи БАР як: прості феноли, гідроксикоричні кислоти, кумарини, флавоноїди та дубильні речовини.

В одержаних екстрактах визначали кількісний вміст основних груп БАР, які були виявлені у екстрактах з мучниці звичайної листя (табл. 3.9). Кількісне визначення гідрокінонпохідних, гідроксикоричних кислот, флавоноїдів та суми фенольних сполук у витяжках з мучниці звичайної листя проводили спектрофотометричними методами (Розділ 2, п. 7-10). Вміст гідроксикоричних кислот у витяжках визначали в перерахунку на хлорогенову кислоту за довжини хвилі 525 нм, вміст флавоноїдів – у перерахунку на рутин – за довжини хвилі 417 нм після утворення комплексу з алюмінію хлоридом *P*, вміст суми фенольних сполук у перерахунку на кислоту галову – за довжини хвилі 270 нм.

Для вибору оптимальної кратності екстракції гідрокінонпохідних з мучниці звичайної листя було розраховано коефіцієнт масовіддачі кожної стадії ($m_{\text{екстракту}}/m_{\text{іспирту}}$) та за допомогою пакету прикладних програм «Statistika» виведено залежність вмісту гідрокінонпохідних від кратності

екстракції та визначено оптимальну кратність екстракції.

Таблиця 3.9

Вміст різних груп БАР у водно-спиртових витягах з мучниці звичайної листя

Витяг		Вміст групи БАР, %				
		Сухий залишок	Гідрохінон-похідні	Гідрокси-коричні кислоти	Флавоноїди	Сума фенольних сполук
1	Рідкий екстракт	5,67	0,27± 0,04	0,72± 0,03	0,09± 0,01	0,41± 0,03
	Сухий залишок		1,51± 0,01	11,63± 0,02	1,24± 0,04	14,63± 0,02
2	Рідкий екстракт	5,01	0,34± 0,03	0,56± 0,02	0,08± 0,01	0,38± 0,03
	Сухий залишок		1,91± 0,02	8,34± 0,09	1,87± 0,03	15,29± 0,08
3	Рідкий екстракт	2,32	0,12± 0,03	0,42± 0,04	0,04± 0,01	0,18± 0,02
	Сухий залишок		1,35± 0,04	6,75± 0,06	1,61± 0,03	12,60± 0,11
4	Рідкий екстракт	0,65	0,07± 0,01	0,18± 0,01	0,02± 0,01	0,05± 0,01
	Сухий залишок		0,56± 0,02	1,89± 0,03	0,56± 0,05	4,63± 0,08

Враховуючи одержані результати за допомогою пакету прикладних програм «Statistika» в інтервалі кратності екстракції від 1 до 4 разів було виведено рівняння залежності кратності екстракції (t) від рентабельності процесу екстракції гідрохінонпохідних (y). Графіки залежності кратності екстракції за виходом гідрохінонпохідних для мучниці звичайної листя наведені на рис. 3.8.

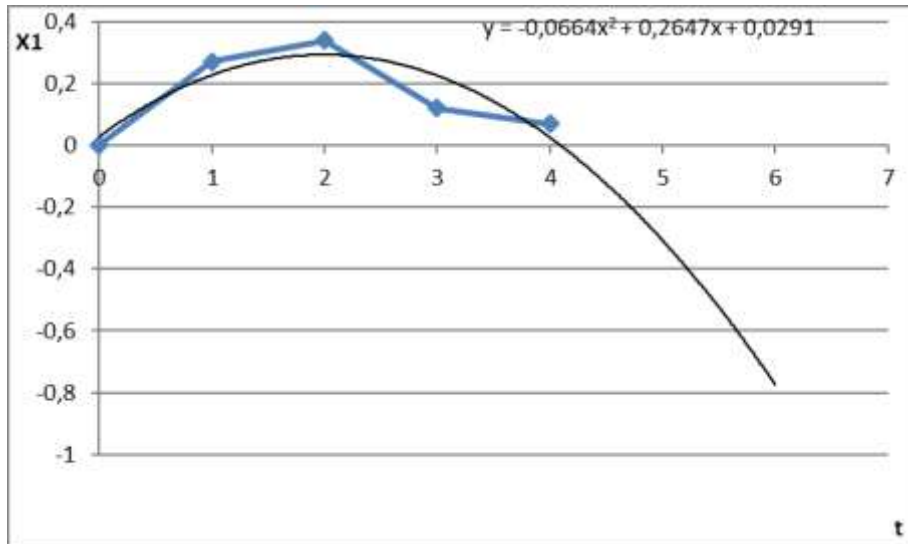


Рис. 3.8 Графік динаміки екстракції гідрохінонпохідних

Для екстракції гідрохінонпохідних з мучниці звичайної листя виведена функція досягає максимуму при $t = 1,99$, тобто, враховуючи цей показник, раціональна кратність екстракції складає 2 рази. Подальша екстракція мучниці звичайної листя з новими порціями 50 % розчину етанолу значно не збільшує вихід гідрохінонпохідних, а призводить лише до перевитрати екстрагенту, енергетичних, трудових ресурсів і зменшення рентабельності процесу.

Для екстракції суми гідроксикоричних кислот з мучниці звичайної листя виведена функція досягає максимуму при $t = 2,02$, тобто, враховуючи цей показник, раціонально проводити екстракцію двічі (рис. 3.9). Подальше настоювання сировини з новими порціями екстрагенту 50 % етанолу значно не збільшує вихід суми гідроксикоричних кислот, а призводить лише до перевитрати екстрагенту, часових, енергетичних і трудових ресурсів.

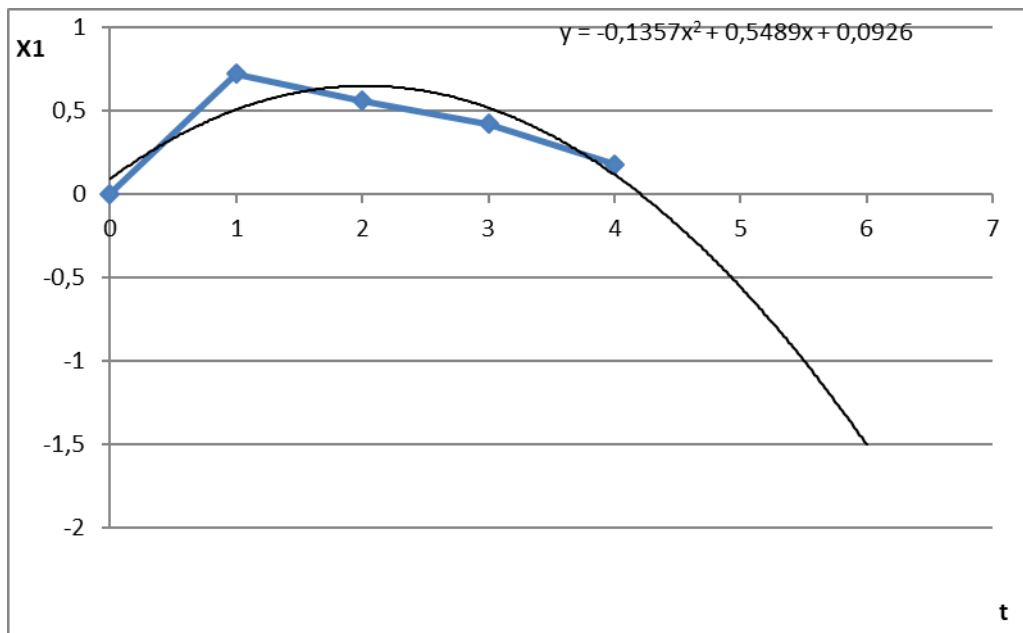


Рис. 3.9 Графік динаміки екстракції гідроксикоричних кислот

Для екстракції флавоноїдів з мучниці звичайної листя виведена функція досягає максимуму при $t = 1,94$, тобто, враховуючи цей показник, раціональна кратність екстракції складає два рази (рис. 3.10). Подальше настоювання сировини з новими порціями 50 % етанолу значно не збільшує вихід флавоноїдів, а призводить лише до перевитрати екстрагенту і інших ресурсів.

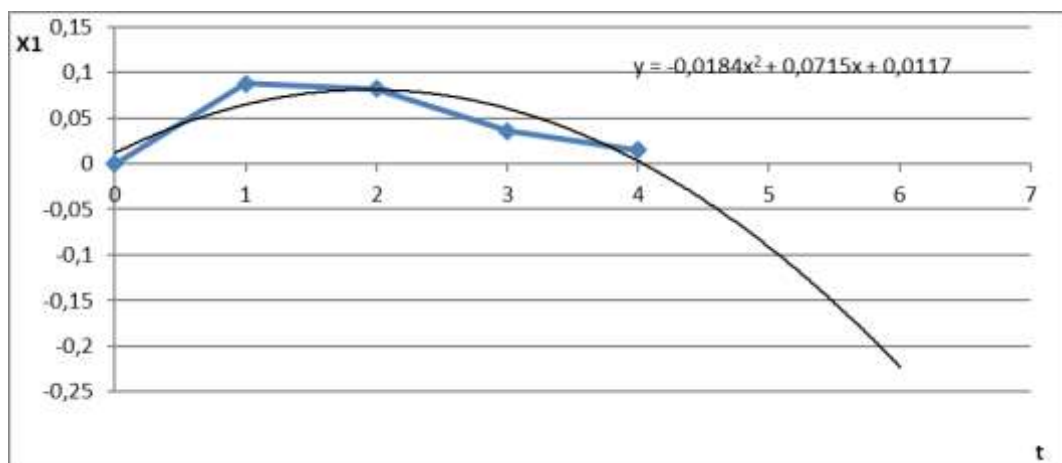


Рис. 3.10. Графік динаміки екстракції флавоноїдів

Для екстракції суми фенольних сполук з мучниці звичайної листя виведена функція досягає максимуму при $t = 1,93$, тобто, враховуючи цей

показник, раціональна кратність водно-спиртової екстракції складає 2 рази (рис. 3.11). Подальша екстракція мучниці звичайної листя з новими порціями 50 % розчину етанолу значно не збільшує вихід суми фенольних сполук, а призводить лише до перевитрати екстрагенту та інших ресурсів.

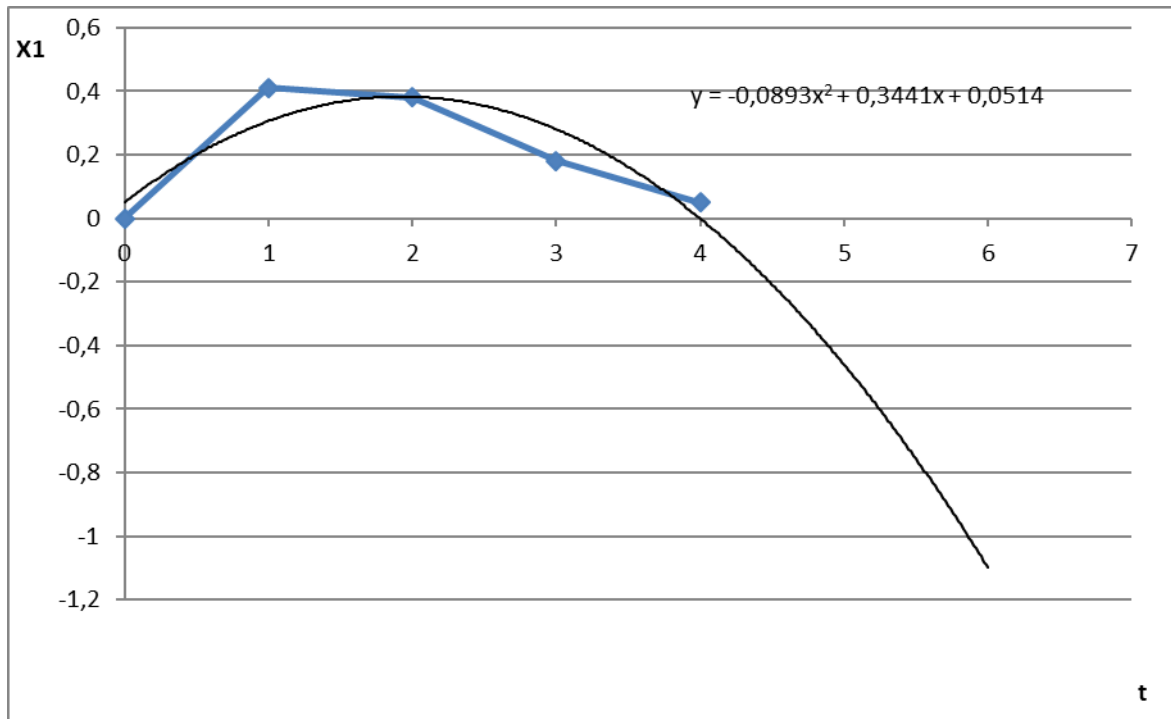


Рис. 3.11 Графік динаміки екстракції суми фенольних сполук

Таким чином, у водно-спиртових витяжках з мучниці звичайної листя встановлено вміст гідрокінонпохідних, гідроксикоричних кислот, флавоноїдів, суми фенольних сполук і математичним шляхом встановлено, що раціональна кратність екстракції 50 % розчином етанолу за цими показниками становить два рази [11].

Висновки до розділу 3

1. Фітохімічний скринінг основних груп БАР у мучниці звичайної листі показав наявність похідних гідрокінону, фенолкарбонів та гідроксикоричних кислот, кумаринів, флавоноїдів, дубильних речовин та

тритерпенових сапонінів. При цьому, методом ТШХ були ідентифіковані такі речовини, як арбутин, галова, елагова, протокатехова, хлорогенова та *n*-кумарова кислоти, кверцетин, рутин, гіперозид, гало- та елаготаніни. Встановлено кількісний вміст основних груп фенольних сполук у сировині.

2. У мучниці звичайної листі спостерігався значний вміст фенольних сполук, однак з усього різноманіття методом ВЕРХ ідентифіковано тільки арбутин, 2 фенолкарбонові кислоти: галову та елагову, та 5 флавоноїдів. Так, вміст арбутину у сировині складає 2,96 %. Домінуючим флавоноїдом був гіперозид.

3. Методом ВЕРХ було ідентифіковано та визначено кількісний вміст 8 сапонінів у мучниці звичайної листі: урсолової кислоти (1,07 %), еускапової кислоти (0,04 %), торментинової кислоти (0,02 %), уваолу (0,35 %), олеанолової кислоти (0,16 %), еритродіолу (0,16 %), бетуліну (0,13 %) та лупеолу (0,37 %). Домінуючими речовинами були урсолова кислота, уваол та лупеол.

4. Вміст речовин леткої фракції листя мучниці звичайної був незначний, всього 14,46 мг/100 г сировини, при цьому методом ГХ-МС було виявлено 42 речовини, з яких тільки 26 вдалося ідентифікувати. При цьому, основними речовинами були октан, камфора, 2,4-декадієналь, гексадекан, гексагідрофарнезилацетон, фітол, етилпальмітат, етиллинолеат, 4,8,12,16-тетраметилгептадекан-4-олід, пентакозан, гексакозан, нонакозан, унтриаконтан і тритриаконтан. Домінуючими речовинами є нор-олеан-12-ен, унтриаконтан, нонакозан і фітол.

5. Для вибору оптимального екстрагенту для екстракції БАР з мучниці звичайної листя було визначено п'ять сухих екстрактів з використанням води очищеної, 30, 50, 70 та 96 % етанолу. Результати досліджень кількісного вмісту основних груп БАР показали, що з листя мучниці звичайної водою і 30 % розчином етанолу забезпечується найкраща екстракція гідрокінонпохідних; гідроксикоричні кислоти краще екстрагуються водно-спиртовими розчинами у концентраціях 30-50 %,

флавоноїди – у концентраціях 50-70 %. Враховуючи вихід екстрактів, вміст різних груп фенольних сполук та економічний чинник, встановлено, що 50 % спирт етиловий є оптимальним екстрагентом для одержання лікарських засобів на основі фенольних сполук із мучниці звичайної листя. Також для підтвердження цього було проведено вивчення діуретичної та антимікробної активності одержаних сухих екстрактів мучниці звичайної листя.

6. У водних і водно-спиртових (50 % розчин етанолу) витяжках з мучниці звичайної листя було визначено кількісний вміст гідроксінонпохідних, гідроксикоричних кислот, флавоноїдів і поліфенолів. Встановлено, що оптимальна кратність водної та водно-спиртової екстракції з цієї сировини складає два рази, що буде використано при розробці технології одержання нових сухих екстрактів з мучниці звичайної листя.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Чайка Н. Б., Комісаренко М. А., Кошовий О. М., Ковальова А. М., Бородіна Н. В. Дослідження динаміки екстрагування біологічно активних речовин з листя мучниці звичайної. *Фітотерапія. Часопис.* 2019. № 4. С. 64-68. <https://doi.org/10.33617/2522-9680-2019-4-64>.
2. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Комісаренко М. А., Бородіна Н. В., Кіреєв І. В. Фітохімічний профіль і діуретична активність сухих екстрактів із мучниці звичайної листя. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики.* 2021. Т. 14. № 1 (35). С. 45-51. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2021.1.226761>.
3. Vinakova A.E., Chayka N.B., Koshovyi O.M. Research of the dry alcoholic extract from bearberry leaves. *Topical issues of new drugs development: Abstracts of XXIV International Scientific And Practical Conference of Young Scientists and Students (April 20, 2017).* Vol. 1. Kh.: Publishing office NUPh, 2017. P. 140.
4. Polozova A.V., Chayka N.B., Koshovyi O.M. Research in biological active

substances of the bearberry leaves extract, which was obtained with 50 % ethanol. *Topical issues of new drugs development: Abstracts of XXIV International Scientific And Practical Conference of Young Scientists and Students (April 20, 2017)*. Vol. 1. Kh.: Publishing office NUPh, 2017. P. 117.

5. Чайка Н.Б., Голембіовська О.І., Кошовий О.М. Дослідження сапонінового складу листя мучниці. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів: Матеріали VII науково-практичної конференції з міжнародною участю (27 - 28 вересня 2018 р.)*. Тернопіль: ТДМУ «Укрмедкнига», 2018. С. 50-51.
6. Чайка Н.Б., Рааль А., Кошовий О.М., Кіреєв І.В. Визначення оптимального екстрагента для екстракції БАР з листя мучниці звичайної. *Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, м. Харків, 19 вересня 2019 р.* Х.: НФаУ, 2019. Том. 1, С. 294-296.

РОЗДІЛ 4

ФІТОХІМІЧНЕ ТА ФАРМАКОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ НОВИХ НОВОГАЛЕНОВИХ ЕКСТРАКТІВ МУЧНИЦІ ЗВИЧАЙНОЇ ЛИСТЯ

У третьому розділі було показано, що оптимальними екстрагентами для одержання галенових лікарських засобів з мучниці звичайної листя є вода очищена, яка найкраще екстрагує гідрохінонпохідні, та 50 % розчин етанолу, який оптимально вилучає комплекс фенольних сполук. При цьому доведено, що оптимальна кратність екстракції для цих двох екстрагентів складає два рази.

Останні часи у фармацевтичній практиці спостерігається тенденція одержання новогаленових лікарських засобів, яка полягає у очищенні екстрактів, концентрації певних груп БАР або їх хімічній модифікації. Тому, враховуючи сучасні тенденції, актуальним було з галенових екстрактів мучниці звичайної листя розробити схеми одержання нових новогаленових лікарських засобів.

4.1 Одержання та дослідження новогаленових екстрактів мучниці звичайної листя з високим вмістом арбутину

На сьогоднішній час актуальним є одержання субстанцій зі значним вмістом арбутину та гідрохінонпохідних, тому було розроблено дві схеми одержання екстрактів зі значним вмістом арбутину.

4.1.1 Одержання та дослідження новогаленового екстракту фракціонуванням етилацетатом

Для одержання новогаленового екстракту 10,0 г сухого екстракту мучниці звичайної листя, одержаного водою очищеною, за раніше запропонованою технологією (розділ 3, п. 3.6.1), розчиняли у 200,0 мл води

очищеної та фракціонували етилацетатом у співвідношенні 1:1 тричі, після цього об'єднану етилацетату фракцію випарювали у вакуум-циркулярному апараті до сухого екстракту (Екстракт 6). З одержаного сухого екстракту 6 готували 5 % спиртовий розчини (50 % етанол), якій у подальшому і досліджували (рис. 4.1).

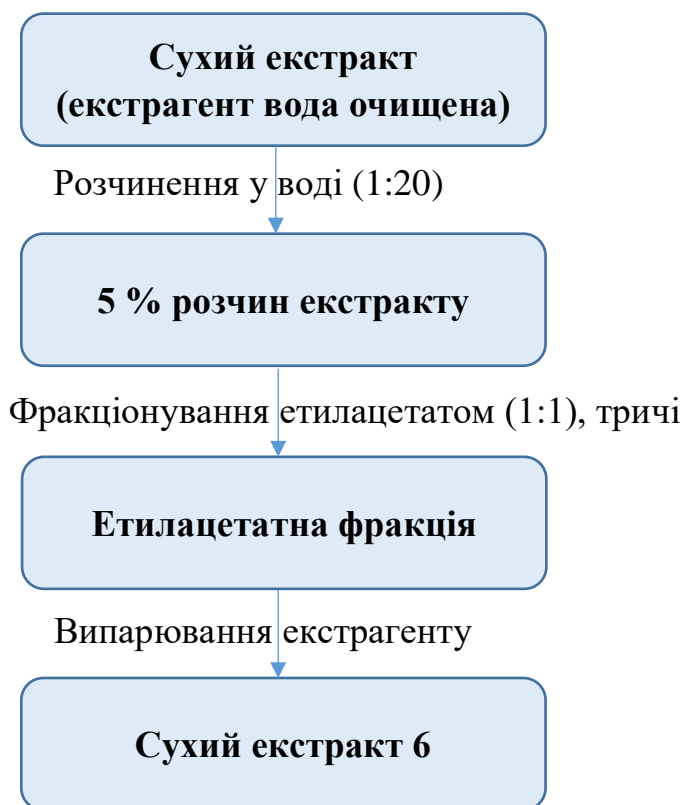


Рис. 4.1 Принципова схема одержання новогаленового екстракту 6 з мучниці звичайної листя

Для встановлення якісного складу одержаного екстракту використовували ТШХ аналіз (Розділ 3, п. 3.1).

У вихідному сухому екстракті 1 мучниці звичайної листя та новогаленовому екстракті 6 були ідентифіковані такі класи БАР: гідрокінонпохідні, гідроксикоричні кислоти, флавоноїди та дубильні речовини.

В одержаних екстрактах проводили визначення кількісного вмісту основних груп БАР, які були попередньо ідентифіковані (табл. 4.1). Кількісне визначення гідрокінонпохідних, гідроксикоричних кислот, флавоноїдів та

суми фенольних сполук проводили спектрофотометричним методом (Розділ 2, п. 7-10).

Таблиця 4.1

Кількісний вміст основних груп БАР у екстрактах мучниці звичайної

Група БАР Метод визначення	Вміст, %	
	Сухий екстракт 1	Сухий екстракт 6
Гідрохінонпохідні		
Спектрофотометричний метод у перерахунку на арбутин	12,08±0,06	19,11±0,05
Похідні гідроксикоричної кислоти		
Спектрофотометричний метод у перерахунку на хлорогенову кислоту	1,66±0,06	3,18±0,06
Флавоноїди		
Спектрофотометричний метод у перерахунку на рутин	4,76±0,07	8,09±0,04
Фенольні сполуки		
Спектрофотометричний метод у перерахунку на галову кислоту	17,14±0,07	33,91±0,05

Використовуючи запропоновану схему одержання новогаленового екстракту, вдалося сконцентрувати гідрохінонпохідні у екстракті 6, збільшивши їх вміст на 58 % у порівнянні сухим екстрактом 1, та збільшити вміст суми фенольних сполук майже удвічі.

4.1.2 Одержання та дослідження новогаленового очищеного екстракту

При екстрагуванні мучниці звичайної листя водою очищеною *P* за технологією відвару, до сухого екстракту з гарячою водою потрапляє частина

ліпофільних речовин, яка погіршує технологічні властивості екстракту та впливає на сорозчинність інших сполук, зокрема фенольної природи. Враховуючи це, доцільно провести очистку екстракту.

Амінокислоти та інші катіони, утворюючи солі та кон'юганти з іншими речовинами, впливають на їх розчинність та фізико-хімічні властивості, тому видаливши їх з розчину, іноді вдається легше сконцентрувати чи виділити індивідуальні речовини, зокрема арбутин. Тому для очистки вихідного екстракту було використано катіоніт КУ2.

Враховуючи ці підходи була розроблена та експериментально опрацьована схема концентрації гідрохінонпохідних для одержання новогаленового екстракту (Рис. 4.2, 4.3).

Для одержання новогаленового екстракту 20,0 г сухого екстракту 1 мучниці звичайної листя (екстрагент вода очищена) (Розділ 3, п.3.6.1), розчиняли у 200,0 мл води очищеної та фракціонували хлороформом у співвідношенні 1:1 тричі, після цього водний залишок пропускали через катіоніт КУ2, елюат випарювали у ротаційному вакуум-випарноому апараті до сухого залишку. Сухий залишок розчиняли у 96 % етanolі, фільтрували крізь паперовий фільтр та випарювали у вакуум-циркулярному апараті до сухого екстракту (Екстракт 7).



Рис. 4.2 Колба з сухим новогаленовим екстрактом 7 з мучниці звичайної листя



Рис. 4.3 Принципова схема одержання новогаленового екстракту 7

Ідентифікацію арбутину у одержаному екстракті 7 мучниці звичайної листя проводили методом ТШХ у системі розчинників: кислота мурашина безводна *P* - вода *P* - етилацетат *P* (6:6:88) у порівнянні з достовірним зразком згідно з ДФУ [10].

Кількісне визначення гідрокінонпохідних у одержаному екстракті проводили спектрофотометричним методом (Розділ 2, п. 7).

Після статистичної обробки результатів вимірювань встановили, що у сухому екстракті 7 мучниці звичайної листя міститься $31,25 \pm 0,07$ % гідрокінонпохідних у перерахунку на арбутин, тобто запропонована схема

дозволила збільшити концентрацію цих речовин в екстракті в 2,5 рази у порівнянні з вихідним екстрактом.

4.2 Схеми одержання новогаленових екстрактів мучниці звичайної листя, модифікованих амінокислотами

Амінокислоти здатні утворювати кон'юганти, комплекси, амідни та іміди з іншими речовинами, у тому числі з фенольними сполуками. Такі взаємодії призводять до зміни фізико-хімічних властивостей, зокрема розчинності, біодоступності цих речовин, посилення та виникнення нових аспектів фармакологічної дії. Так, було показано, що додавання амінокислот до настойки собачої кропиви призводить до виникнення анксиолітичної дії [131], аргініну до екстракту чорниці звичайної – до посилення гіпоглікемічної та гіполіпідемічної дії [97, 133]. Враховуючи це, доцільно було модифікувати екстракт мучниці звичайної листя різними амінокислотами та провести скринінг гіпоглікемічної активності цих субстанцій для визначення найбільш перспективних агентів з гіпоглікемічною дією.

200,0 г сухого екстракту 3 мучниці звичайної листя, одержаного 50 % розчином етанолу, розчиняли у 2000,0 мл 50 % етанолу. До кожної з 10 порцій по 200,0 мл розчину екстракту 3 мучниці звичайної листя додавали відповідну амінокислоту (цистеїн, фенілаланін, валін, гліцин, аланін, лейцин, гістидин, лізин, аргінін, глютамінову кислоту) у трикратній еквімолярній кількості по відношенню до загальної суми фенольних сполук у перерахунку на галову кислоту [147, 156] та настоювали протягом доби, після чого розчини упарювали за допомогою ротаційного вакуум-випарного апарата до сухих екстрактів та розтирали (рис. 4.4).



Рис. 4.4 Схеми отримання модифікованих амінокислотами сухих екстрактів мучниці звичайної листя

З мучниці звичайної листя були розроблені способи одержання сухих екстрактів, модифікованих 10 різними амінокислотами. Вихід сухих модифікованих екстрактів становив від 28,6 % до 36,2 % у залежності від амінокислоти, вихід сухого екстракту, одержаного 50 % розчином етанолу - 12,7 %. Принципові схеми одержання сухих модифікованих екстрактів були запропоновані вперше та захищені 10 патентами України: 5 патентами на винахід 123476, 123477, 123380, 124042, 124043 та 5 патентами на корисну модель 141184, 140872, 140486, 142210 та 142930 [27-30, 56-61].

4.3 Фітохімічне дослідження БАР модифікованих екстрактів мучниці звичайної листя

Прості феноли у модифікованих екстрактах мучниці звичайної листя

визначали методом ТШХ у системі розчинників: кислота мурашина безводна P – вода P – етилацетат P (6:6:88) висхідним способом. Для цього 0,05 г досліджуваних екстрактів мучниці звичайної листя розчиняли у 5,0 мл суміші рівних об'ємів метанолу P та води P . Отримані розчини екстрактів використовували у подальших ТШХ аналізах. Для порівняння використовували стандартні зразки кислоти галової і арбутину (Sigma Chemical Company, США), розчинених у метанолі P у концентрації 0,25 %. Наносили по 10 мкл випробовуваного розчину та по 10 мкл розчину порівняння. Хроматограму з нанесеними речовинами поміщували у камеру з розчинниками. Коли фронт розчинників пройшов близько 15 см, пластинку виймали з камери, висушували при 100–105 °С до видалення слідів розчинників. Потім хроматограму обробляли розчином 10 г/л 4-амінопіразолону P , потім розчином 20 г/л калію феріціаніду P і проявляли у парах аміаку [10, 32].

При ТШХ аналізу простих фенолів на хроматограмі при перегляді у денному світлі ідентифікували коричневі зони на рівні зони галової кислоти та помаранчеві плями на рівні зони арбутину. Таким чином, у всіх екстрактах мучниці звичайної листя було виявлено кислоту галову і арбутин.

Гідроксикоричні кислоти і флавоноїди виявляли ТШХ у системі органічних розчинників етилацетат P – вода P – кислота мурашина безводна P – кислота оцтова льодяна P (72:14:7:7) у порівнянні з вірогідними зразками гідроксикоричних кислот (Sigma Chemical Company, США). Наявність даної групи сполук виявляли за голубою флуоресценцією в УФ-світлі після обробки хроматограм реактивами 10 г/л амілового етеру дифенілборної кислоти у метанолі P і 50 г/л макроголу 400 у метанолі P [10, 146].

При ТШХ аналізі гідроксикоричних кислот і флавоноїдів у екстрактах з мучниці звичайної листя було виявлено не менше 3 сполук гідроксикоричної природи, з яких у порівнянні зі стандартними зразками були ідентифіковані кофеїна та хлорогенова кислоти, та не менше 5 речовин флавоноїдної природи, з яких ідентифіковано рутин та гіперозид.

Катехіни у екстрактах визначали методом ТШХ згідно з монографією ДФУ [10], у системі розчинників: кислота оцтова льодяна *P* – ефір *P* – гексан *P* – етилацетат *P* (20:20:20:40). Для порівняння використовували стандартні зразки катехіну та епігалокатехіну (Sigma Chemical Company, США), розчинених у метанолі *P*, у концентрації 0,1 %. Наносили по 20 мкл випробуваного розчину та розчину порівняння. Хроматограму з нанесеними речовинами вміщували у камеру з розчинниками. Коли фронт розчинників пройшов близько 10 см, пластинку виймали з камери, висушували на повітрі до видалення слідів розчинників. Потім хроматограму обробляли свіжоприготованим розчином 5 г/л міцного синього.

На ТШХ хроматограмах екстрактів мучниці звичайної листя, при перегляді у денному світлі, ідентифікували червоні зони на рівні зони катехіну, на рівні зони епігалокатехіну - зон не виявлено. Таким чином, у всіх екстрактах мучниці звичайної виявлено катехін.

Методом ВЕРХ (Розділ 2, п. 4) у одержаних модифікованих екстрактах мучниці звичайної листя визначено вміст основних БАР фенольної природи (табл. 4.2).

В одержаних екстрактах мучниці звичайної листя методом ВЕРХ було ідентифіковано 1 фенологлікозид (арбутин), 1 фенолкарбонову кислоту (галову кислоту), 5 флавоноїдів та 4 гідроксикоричні кислоти, встановлено їх кількісний вміст. Серед флавоноїдів домінуючими були гіперозид та катехін, серед гідроксикоричних кислот – кофейна та хлорогенова кислоти. Вміст усіх ідентифікованих фенольних сполук у модифікованих екстрактах був нижчий у порівнянні з нативним екстрактом, отриманим 50 % розчином етанолу. Щодо ідентифікованих фенольних сполук, то вони і раніше були виявлені у екстрактах з цієї сировини [73, 117], проте їх наявність та кількість будуть мати вирішальне значення у подальшому при розробці методів контролю якості.

Таблиця 4.2

Результати ВЕРХ аналізу сухих модифікованих екстрактів мучниці звичайної листя

Речовина	Вміст речовини, мг/100г										
	ПЕ	ПЕЦ	ПЕФ	ПЕВ	ПЕГ	ПЕА	ПЕЛ	ПЕГі	ПЕЛі	ПЕАр	ПЕГлу
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Арбутин	2956,72 ±57,9	2689,89 ±65,6	2819,81 ±49,8	2661,12 ±62,3	2778,65 ±58,1	2720,17 ±64,1	2837,70 ±65,9	2542,78 ±65,0	2546,62 ±61,5	2572,35 ±60,9	2551,12 ±63,1
Фенолкарбонові кислоти											
Галова кислота	147,31 ±4,2	135,52 ±3,6	140,49± 3,9	131,11 ±3,3	123,25 ±3,6	135,51 ±5,1	139,91 ±3,7	127,01 ±4,8	125,31 ±3,9	128,16 ±5,2	126,68 ±4,4
Гідроксикоричні кислоти											
Кофейна	87,12 ±3,6	79,26 ±2,9	81,03 ±2,9	78,44 ±3,2	81,89 ±4,1	80,15 ±3,0	83,63 ±3,1	74,92 ±5,6	75,14 ±4,4	75,79 ±4,6	74,62 ±5,1
<i>n</i> - Кумаров а	42,36 ±2,8	38,13 ±2,6	39,42 ±3,1	38,54 ±2,4	39,83 ±2,5	39,83 ±2,5	40,66 ±2,5	36,42 ±3,2	36,02 ±2,5	37,02 ±3,2	36,16 ±2,7
Хлоро- генова	214,23 ±3,8	194,84 ±4,3	194,92 ±8,6	192,91 ±3,5	201,35 ±3,0	197,23 ±3,8	205,54 ±4,0	184,24 ±3,0	182,09 ±3,5	186,38 ±4,1	184,24 ±5,3
Прото- катехова	14,01 ±1,2	12,88 ±1,8	13,32 ±1,9	12,64 ±1,5	13,17 ±1,1	12,88 ±1,0	13,44 ±1,8	12,05 ±1,5	11,90 ±0,7	12,19 ±1,6	12,05 ±1,9

Продовж. табл. 4.2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Флавоноїди											
Рутин	11,82 ±0,03	10,99 ±0,05	11,23 ±0,02	10,65 ±0,06	11,11 ±0,06	10,87 ±0,05	11,34 ±0,04	10,16 ±0,03	10,05 ±0,06	10,29 ±0,08	10,16 ±0,06
Гіперозид	446,23 ±13,2	412,21 ±10,9	425,57 ±12,7	405,36 ±16,5	419,4 6±13,8	410,53 ±14,1	428,38 ±10,5	384,03 ±10,9	379,23 ±13,2	388,30 ±22,7	383,76 ±18,7
Кверцитрин	14,55 ±0,5	13,41 ±0,6	13,87 ±0,02	13,12 ±0,4	13,67 ±0,4	13,38 ±0,3	13,97 ±0,4	12,51 ±0,8	12,37 ±0,5	12,65 ±0,7	12,35 ±0,6
Кверцетин	3,58 ±0,01	3,28 ±0,03	3,44 ±0,02	3,23 ±0,04	3,36 ±0,02	3,29 ±0,03	3,44 ±0,05	3,08 ±0,03	3,05 ±0,01	3,11 ±0,05	3,00 ±0,06
Катехін	277,57 ±5,5	258,25 ±6,3	264,72 ±6,3	249,97 ±5,8	260,91 ±5,1	255,37 ±5,3	266,47 ±6,1	240,07 ±5,2	235,93 ±5,0	241,50 ±5,1	238,77 ±3,5

В одержаних модифікованих екстрактах мучниці звичайної листя було проведено визначення вмісту основних груп БАР методом спектрофотометрії (Розділ 2, п. 7-10) (табл. 4.3).

При розчиненні сухих модифікованих екстрактів мучниці звичайної листя у воді утворюються прозори темно-коричневий розчин, на відміну від вихідного екстракту, отриманого 50 % етанолом, у якому спостерігається опалесценція і незначна кількість осаду. Це свідчить про те, що розчинність фенольних сполук при додаванні амінокислоти збільшується у наслідок утворення більш гідрофільних кон'югантів і комплексів. Крім того, з загальних УФ-спектрів екстрактів (рис. 4.5 та 4.6) видно, що у межах спектру ароматичних груп відбуваються гіпо- та гіперхромні зсуви, що також свідчить про утворення кон'югантів і комплексів. Але ці комплекси не стійкі, оскільки при ВЕРХ хроматографувані у кислому середовищі вони не виявляються.

Таблиця 4.3

Вміст основних груп БАР у сухих екстрактах з мучниці звичайної листя

Екстракт	Вміст, %			
	Сума гідрокінон-похідних	Гідрокси-коричні кислоти	Флавоноїди	Сума фенольних сполук
ПЕ	6,98 ± 0,05	2,88 ± 0,02	4,30 ± 0,06	17,68 ± 0,09
ПЕЦ	6,35 ± 0,07	2,67 ± 0,05	3,91 ± 0,04	15,92 ± 0,13
ПЕФ	5,06 ± 0,04	3,15 ± 0,02	3,05 ± 0,03	19,80 ± 0,06
ПЕВ	6,29 ± 0,06	2,59 ± 0,04	3,87 ± 0,05	15,90 ± 0,08
ПЕГ	6,57 ± 0,07	2,43 ± 0,05	4,04 ± 0,04	16,62 ± 1,10
ПЕА	6,42 ± 0,05	2,65 ± 0,03	3,96 ± 0,05	16,26 ± 0,77
ПЕЛ	6,70 ± 0,04	2,76 ± 0,05	4,13 ± 0,05	16,98 ± 1,06
ПЕГі	6,04 ± 0,06	2,48 ± 0,03	3,71 ± 0,06	15,22 ± 0,75
ПЕЛі	5,95 ± 0,07	2,45 ± 0,07	3,66 ± 0,03	15,03 ± 1,11
ПЕАр	6,07 ± 0,06	2,50 ± 0,05	3,74 ± 0,09	16,08 ± 1,05
ПЕГлу	6,01 ± 0,09	2,46 ± 0,03	3,70 ± 0,05	15,23 ± 0,75

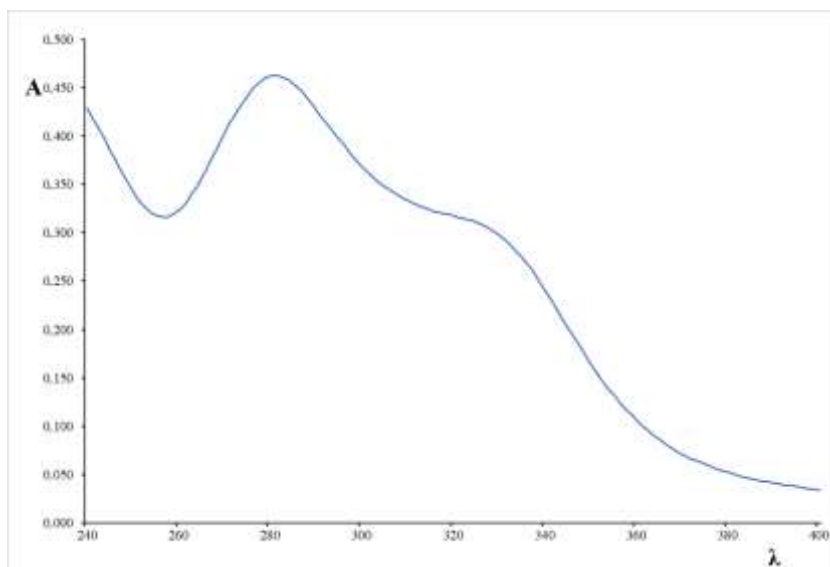


Рис. 4.5 Типовий спектр поглинання вихідного екстракту мучниці звичайної листя

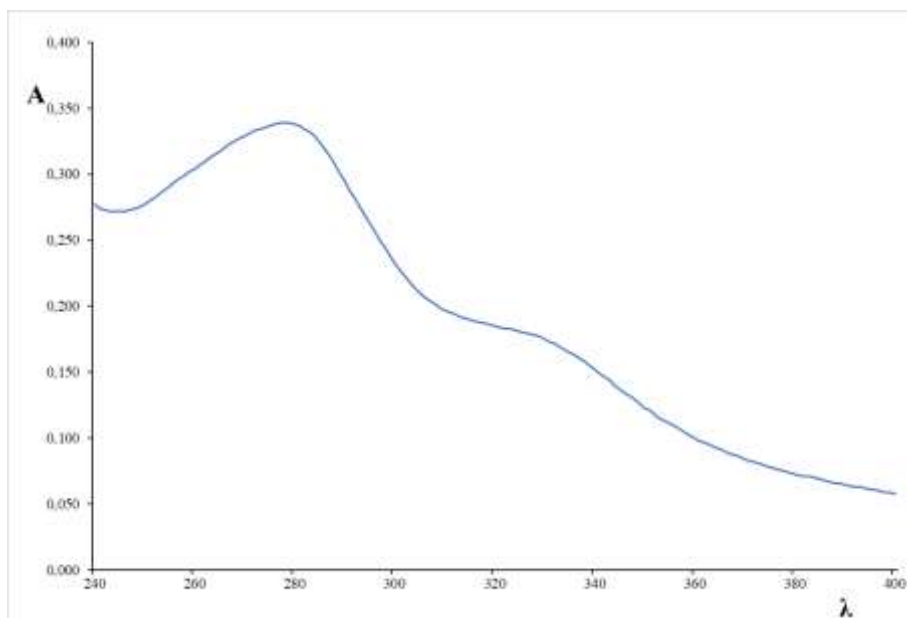


Рис. 4.6 Типовий спектр поглинання екстракту мучниці звичайної листя, модифікованого фенілаланіном

В одержаних модифікованих екстрактах мучниці звичайної листя методом СФ встановлено вміст гідрокінонпохідних (у перерахунку на арбутин), гідрокисоричних кислот (у перерахунку на хлорогенову кислоту), флавоноїдів (у перерахунку на рутин) та суми фенольних сполук (у перерахунку на галову кислоту). Як видно з одержаних результатів, у модифікованих екстрактах вміст всіх зазначених груп БАР нижчій за екстракт

з відвару, тоді як їх гіпоглікемічна дія перевищує екстракт, одержаний 50 % розчином етанолу. Це говорить про те, що додавання амінокислот потенціює дію фенольних сполук мучниці звичайної листя [77, 132, 145].

4.4 Дослідження токсичності

Важливою характеристикою екстрактів є їх низька токсичність і висока ефективність. При вивченні токсикологічних характеристик одержаних екстрактів мучниці звичайної листя визначення гострої токсичності було першим етапом для одержання інформації щодо безпечності використання екстрактів в умовах короткотривалого застосування. Ці дані використовуються при визначенні класу токсичності. Для дослідження токсичності екстрактів одноразово ввели максимальну дозу екстрактів (Розділ 2, п. 12) [36, 50].

Таким чином, протягом 14 діб спостережень у групах тварин, яким вводили досліджувані екстракти у дозі 3000 мг/кг, загибелі мишей не спостерігалось, що дозволяє вважати ці екстракти мучниці звичайної листя нетоксичними у обраних дозах. Оскільки дози 3000 мг/кг не призвели до смерті дослідних тварин в усіх групах, можна зробити висновок, що $LD_{50} > 1000$ мг/кг і згідно з класифікацією Сидорова К. К. модифіковані екстракти мучниці звичайної листя можна віднести до IV класу токсичності (малотоксичні сполуки).

4.5 Скринінг протизапальної активності

Визначення протизапальної активності модифікованих екстрактів мучниці звичайної листя з амінокислотами проводили на моделі карагенінового набряку за умов гострого введення під керівництвом проф. Кіреєва І. В. на базі ЦНДЛ НФаУ. Дослідження проводилось на білих щурах масою 180-220 г, які утримувались у стандартних умовах на звичайному

раціоні при вільному доступі до води і їжі. Тварини були розділені на 12 груп по 4 щурі у кожній (Розділ 2, п.15) [50].

Досліджувані екстракти мучниці звичайної листя вводили перорально у вигляді водних розчинів у дозах 25, 50, 75 і 100 мг / кг за годину до початку експерименту. Вимірювання величини набряку лап у щурів при гострому ексудативному запаленні проводили за допомогою механічного онкометра за А. С. Захаревським у динаміці через 1, 2, 3 і 4 години. Антиексудативну активність екстрактів визначали за здатністю зменшувати розвиток набряку у порівнянні з групою контрольної патології, яку розраховували і виражали у відсотках.

На рис. 4.7 показані результати скринінгового дослідження протизапальної активності модифікованого екстракту мучниці звичайної листя з лізином. У дозах 50, 75 і 100 мг/кг через 4 години від початку експерименту набряк кінцівки щурів зменшувався, у порівнянні з контрольною групою, на 53 %, 76 % в 70 % відповідно.

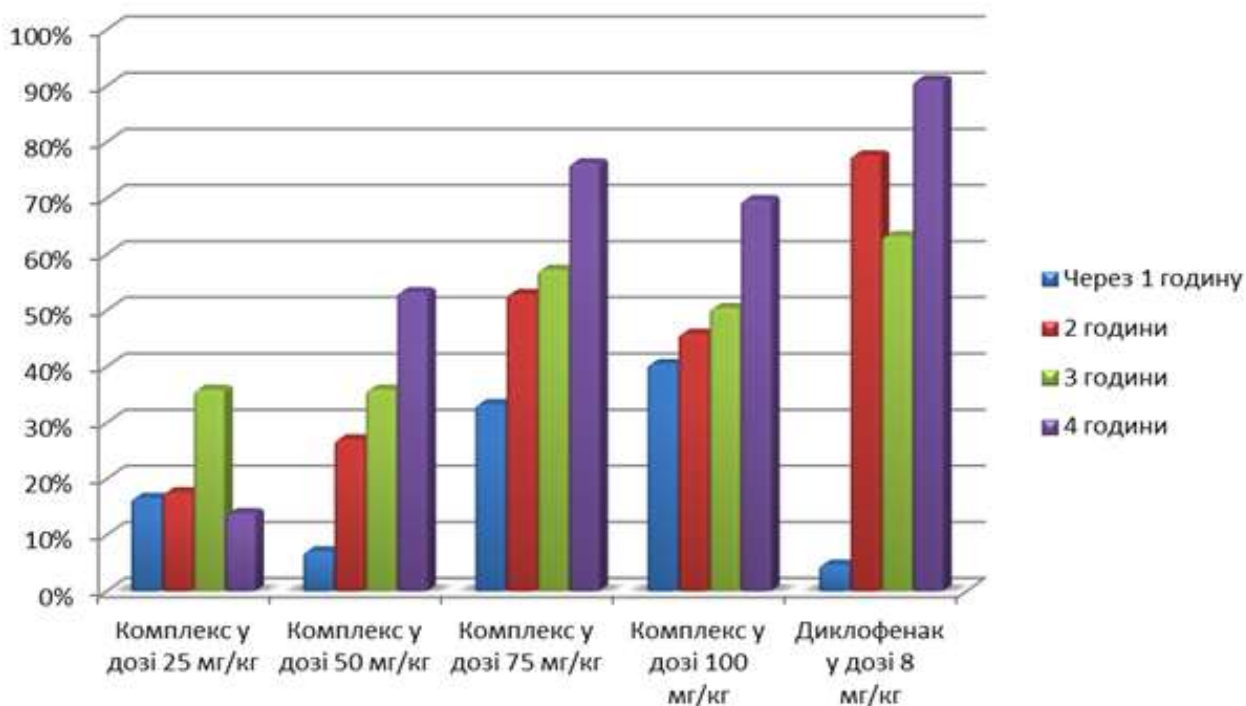


Рис 4.7 Протизапальна активність модифікованого екстракту мучниці звичайної листя з лізином (ПЕЛі) у досліджуваних дозах (%)

Відомо, що гістидин не проявляє вираженої протизапальної активності, у той же час надлишок гістидину призводить до розвитку запальних процесів. Шляхом декарбоксілювання амінокислоти отримується біогенний амін – гістамін, який у вільному стані бере участь у розвитку запального процесу [105]. Як видно на рис. 4.8, протизапальна активність модифікованого екстракту мучниці звичайної листя з гістидином була найвищою при введенні комплексу у дозі 100 мг/кг через 4 години від початку експерименту, і становила 61 %. При введенні екстракту у дозі 75 мг/кг через 4 години від субплантарного введення карагеніну досліджувана активність становила 56 %.

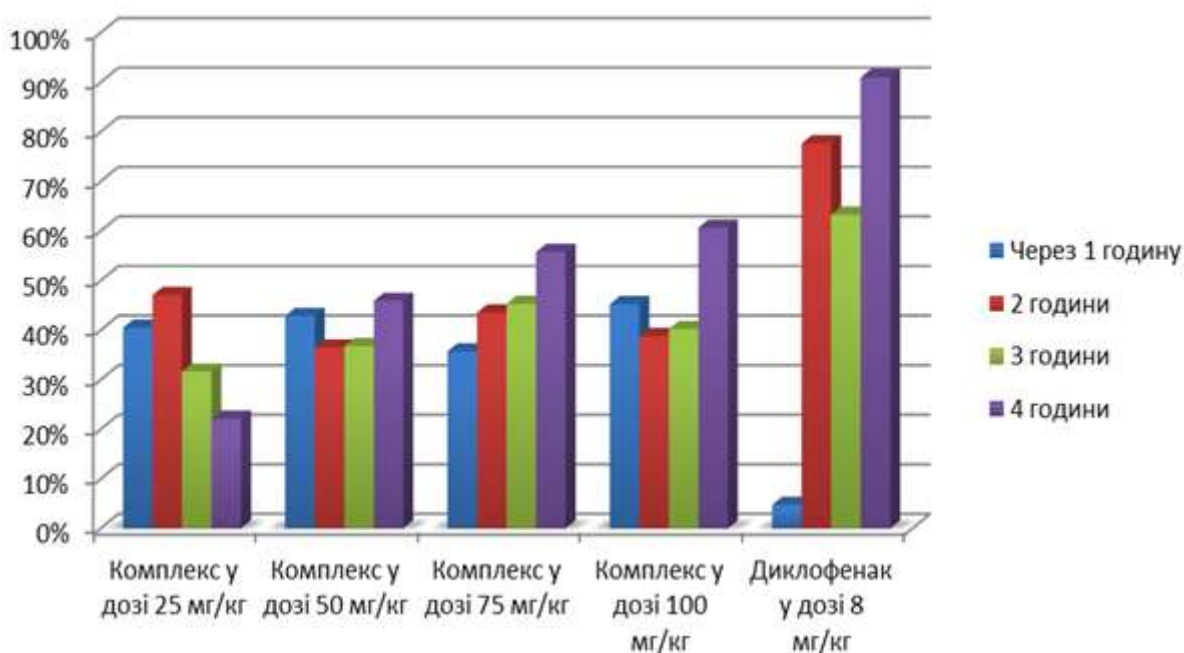


Рис 4.8 Протизапальна активність модифікованого екстракту мучниці звичайної листя з гістидином (ПЕГі) у досліджуваних дозах (%)

Гліцин є центральним нейромедіатором, який регулює обмін речовин; нормалізує та активує процеси захисного гальмування у ЦНС, покращує метаболічні процеси у тканинах мозку, чинить антидепресивну і седативну дію. Гліцин має також ГАМК-ергічну, α_1 - адреноблокуючу, антиоксидантну, антитоксичну дію; регулює діяльність глутаматних (NMDA) рецепторів, за рахунок чого зменшує психоемоційне напруження, агресивність та

конфліктність; підвищує соціальну адаптацію, покращує настрій; полегшує засинання та нормалізує сон, підвищує розумову працездатність та зменшує виразність вегето-судинних порушень. Таким чином, гліцин має вплив на ЦНС, вираженого впливу на запальні процеси не встановлено [40]. У модифікованому екстракті мучниці звичайної листя з гліцином у всіх досліджуваних дозах (рис. 4.9) через 4 години від початку розвитку запальної реакції у лабораторних щурів набряк лапок зменшувався; протизапальна активність у дозах 25, 50, 75 і 100 мг/кг становила 50 %, 70 %, 73 % і 75 % відповідно у порівнянні з контрольною групою.

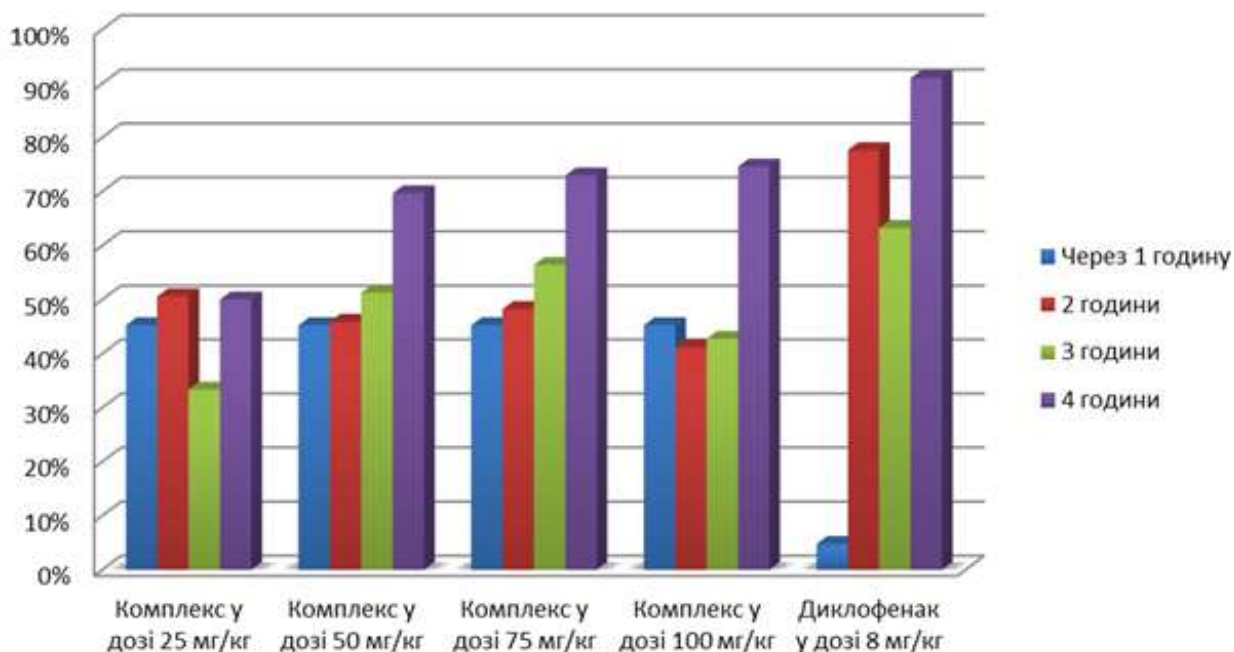


Рис 4.9 Протизапальна активність модифікованого екстракту мучниці звичайної листя з гліцином (ПЕГ) у досліджуваних дозах (%)

Цистеїн є одним з найсильніших антиоксидантів, сприяє знешкодженню деяких токсичних речовин і захищає організм від шкідливої дії радіації. Цистеїн є попередником глутатіону – речовини, яка має захисну дію на клітини печінки та головного мозку від пошкодження алкоголем, деякими лікарськими препаратами та токсичними речовинами. Він прискорює одужання після операцій, опіків, зв'язує важкі метали і розчинне залізо [114].

Як видно з рис. 4.10 модифікований екстракт мучниці звичайної листя з цистеїном у всіх досліджуваних дозах проявляє протизапальну активність. Найвищий антиексудативний ефект спостерігався через 4 години від початку розвитку запалення у дозах 50, 75 та 100 мг/кг, і становив 70 %, 75 % і 75 % відповідно.

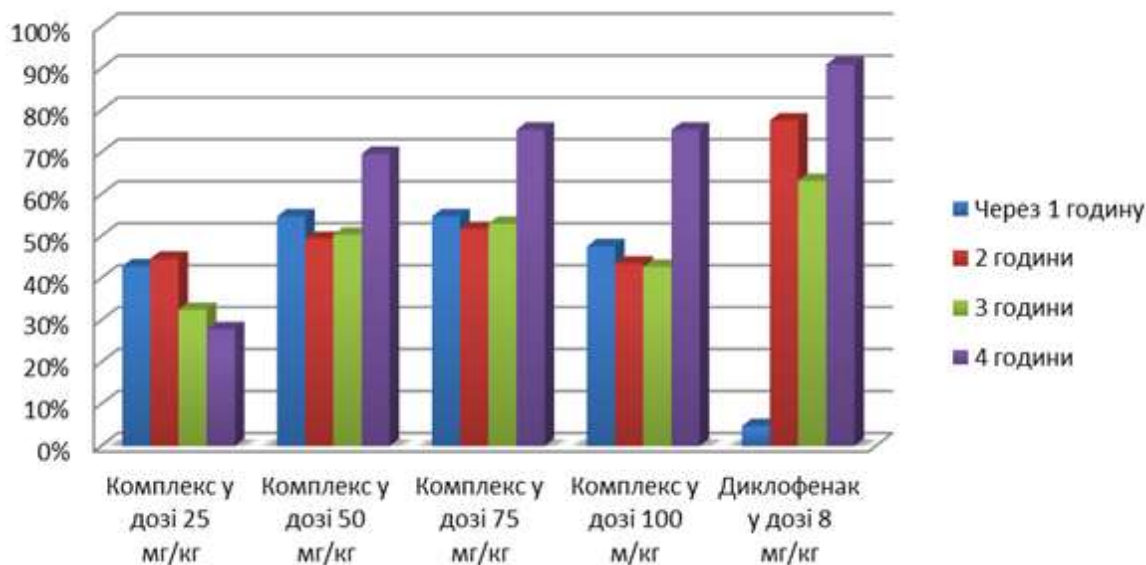


Рис 4.10 Протизапальна активність модифікованого екстракту мучниці звичайної листя з цистеїном (ПЕЦ) у досліджуваних дозах (%)

На рис. 4.11 відображені результати дослідження протизапальної активності модифікованого екстракту мучниці звичайної листя з лейцином. Згідно з отриманими даними, екстракт проявляє антиексудативну активність, яка у дозах 50, 75 і 100 мг/кг істотно не змінювалась, і через 4 години від початку розвитку запалення була 68 %, 70 % та 71 % відповідно, у порівнянні з групою контролю.

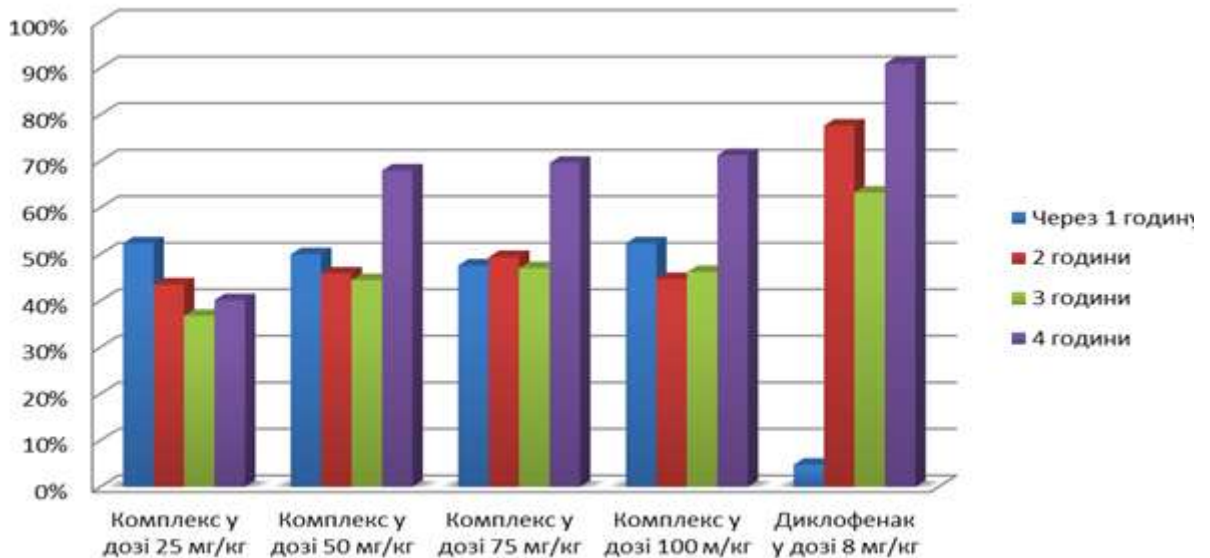


Рис 4.11 Протизапальна активність модифікованого екстракту мучниці звичайної листя з лейцином (ПЕЛ) у досліджуваних дозах (%)

Аланін бере участь у процесі глюконеогенезу у печінці. За деякими даними, підвищений вміст аланіну у крові асоційований з підвищенням артеріального тиску, холестерину, індексу маси тіла та АЛТ. У роботі [68] говориться про препарат ребапамід, що представляє собою N-(4-хлорбензоїл)-3-(2-оксо-1,2-дигідрохінолін-4-їл) аланін, який стимулює синтез ендогенних простагландинів E2 і GI2, забезпечуючи фізіологічний захист слизової оболонки кишківника, запобігаючи запаленню, ерозії, виразці, сприяючи репарації вже пошкодженої слизової оболонки стравоходу, шлунку, тонкої кишки. Дані щодо протизапальних властивостей аланіну не описані. На рис. 4.12 видно, що найбільша протизапальна активність спостерігалась через 4 години від початку експерименту у дозах 50, 75 і 100 мг/кг та становила 68 %, 68 % і 70 % відповідно.

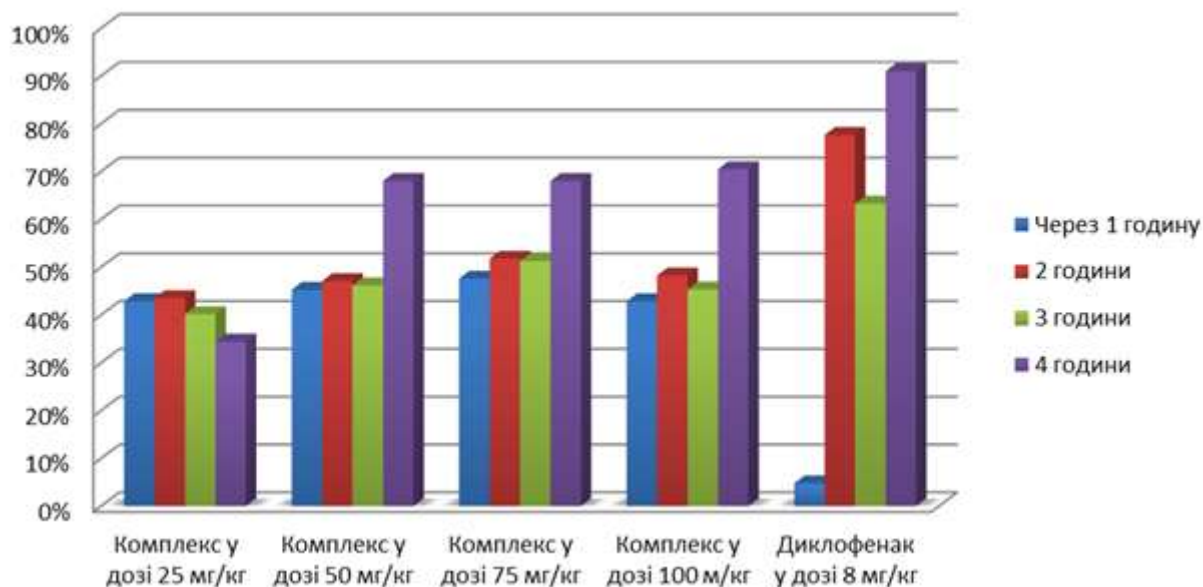


Рис 4.12 Протизапальна активність модифікованого екстракту мучниці звичайної листя з аланіном (ПЕА) у досліджуваних дозах (%)

Валін має стимулюючий ефектом і чинить позитивний вплив на ЦНС, виступає у ролі регенератора пошкоджених тканин та м'язів, підвищує загальну витривалість організму при важких фізичних та розумових навантаженнях, зміцнює імунітет, допомагає боротися з алкогольною і наркотичною залежністю, депресією та стресами. Проведені дослідження показали, що присутність валіну у організмі знижує його чутливість до високих та низьких температур, знижує больовий поріг. Амінокислота відповідає за низку гормональних процесів у організмі людини: збільшує синтез гормону росту, гормонів щитоподібної залози та надниркових залоз, відповідає за роботу опорно-рухового апарату та бере участь у виробленні гемоглобіну [80]. Модифікований екстракт мучниці звичайно листя з валіном проявляє протизапальну активність у всіх досліджуваних дозах, так через 4 години після початку експерименту вона становила 40 %, 61 %, 65 % і 70 % відповідно (Рис. 4.13).

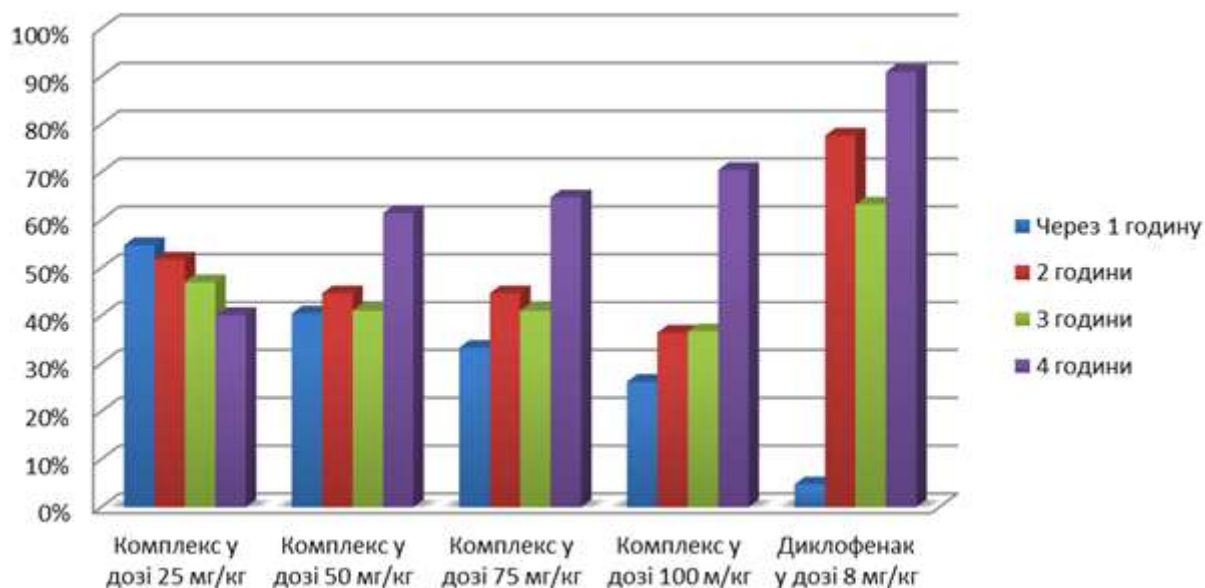


Рис 4.13 Протизапальна активність модифікованого екстракту мучниці звичайної листя з валіном (ПЕВ) у досліджуваних дозах (%)

Аргінін є необхідним попередником для синтезу білків та багатьох біологічно важливих молекул, таких як орнітин, пролін, поліамін, креатин та агматин. Головна роль аргініну в організмі людини бути субстратом для синтезу оксиду азоту (NO), який, у свою чергу, окрім низки властивостей, відповідальний за протизапальні ефекти, такі як інгібування експресії молекул клітинної адгезії ICAM-1 (intercellular adhesion molecules 1), VCAM-1 (vascular cellular adhesion molecules 1) та тканинного фактору; інгібування вивільнення хемокінів, таких як MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) [82, 159, 163]. На рис. 4.14 відображена протизапальна активність модифікованого екстракту мучниці звичайної листя з аргініном. Екстракт має активність у всіх досліджуваних дозах, найбільший антиексудативний ефект був через 4 години у групі тварин, які отримували екстракт у дозі 75 мг/кг, та становив 72 %.

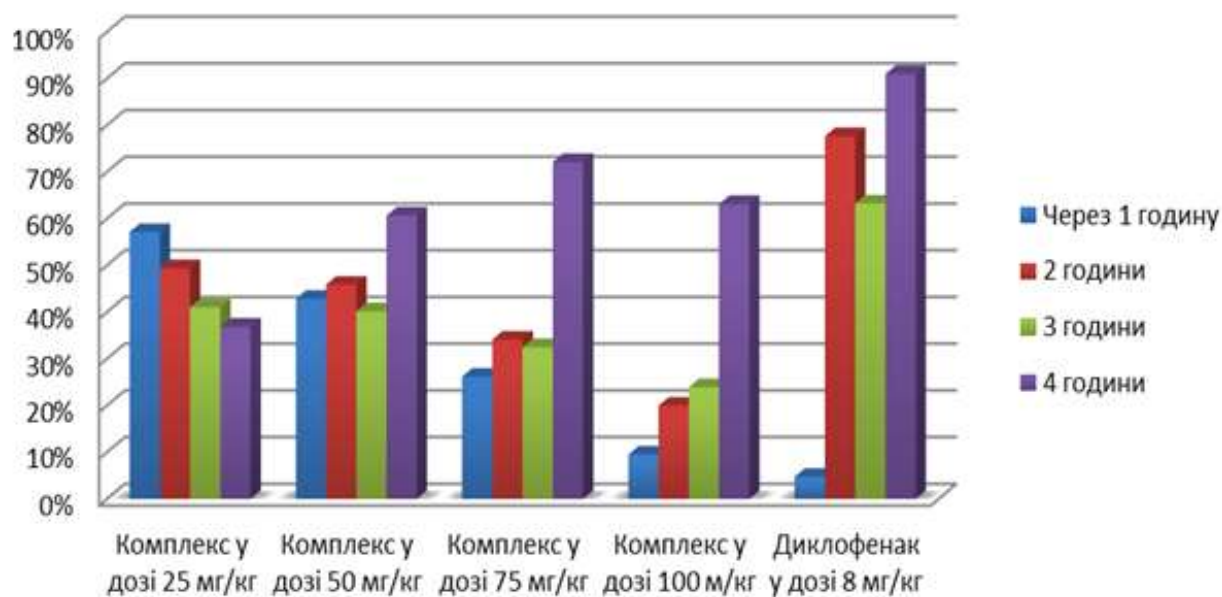


Рис 4.14 Протизапальна активність модифікованого екстракту мучниці звичайної листя з аргініном (PEArg) у досліджуваних дозах (%)

Фенілаланін має ключову роль у гормональних процесах, які впливають на роботу мозку та психічний стан людини. З фенілаланіну утворюється тирозин, а з тирозину – адреналін, норадреналін та дофамін. Ці гормони відповідають за передачу нервових імпульсів, які у свою чергу допомагають людині перебувати у здоровому глузді, ясно мислити та перебувати у гарному настрої. Фенілаланін також грає базову роль в утворенні головного гормону щитоподібної залози – тироксину, який стимулює обмін речовин та прискорює процеси спалювання зайвих жирів, допомагає регулювати масу тіла. Також ця амінокислота бере активну участь у роботі надниркових залоз та сприяє виробленню гормону ендорфіну, який має анальгезуючу дію та сприяє відновним процесам у період адаптації після важких захворювань [120, 130, 153]. При вивченні протизапальних властивостей модифікованого екстракту мучниці звичайної листя з фенілаланіном було встановлено, що екстракт проявляє найбільший антиексудативний ефект у дозі 50 мг/кг (рис. 4.15).

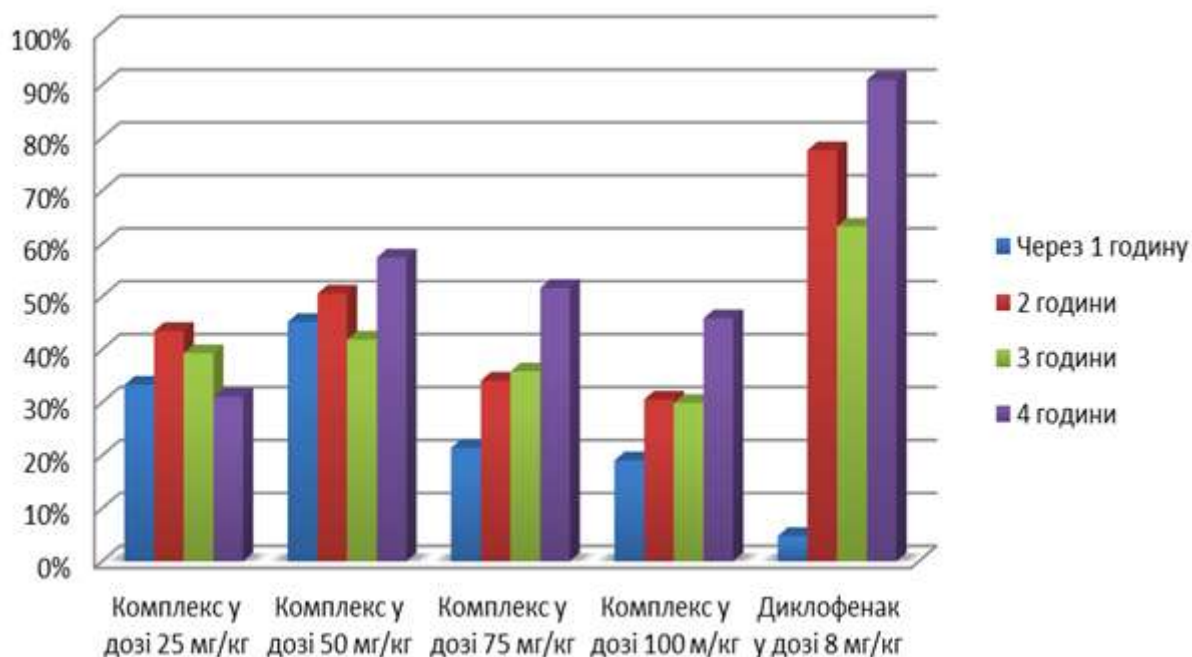


Рис 4.15 Протизапальна активність модифікованого екстракту мучниці звичайної листя з фенілаланіном (ПЕФ) у досліджуваних дозах (%)

Глутамінова кислота бере участь у процесах переамінування амінокислот в організмі, у білковому та вуглеводному обміні, стимулює окиснювальні процеси, сприяє знешкодженню і виведенню з організму аміаку, підвищує стійкість організму до гіпоксії, сприяє синтезу ацетилхоліну і АТФ, перенесенню іонів калію, відіграє важливу роль у діяльності скелетних м'язів. Глутамінова кислота належить до нейромедіаторних амінокислот, які стимулюють передачу збудження у синапсах ЦНС [72, 98]. Серед усіх досліджуваних модифікованих екстрактів з амінокислотами екстракт, модифікований глутаміновою кислотою проявив найменшу протизапальну активність. Протизапальна активність екстракту спостерігалась у дозі 75 мг/кг і становила 60 % у порівнянні з групою контролю (рис. 4.16).

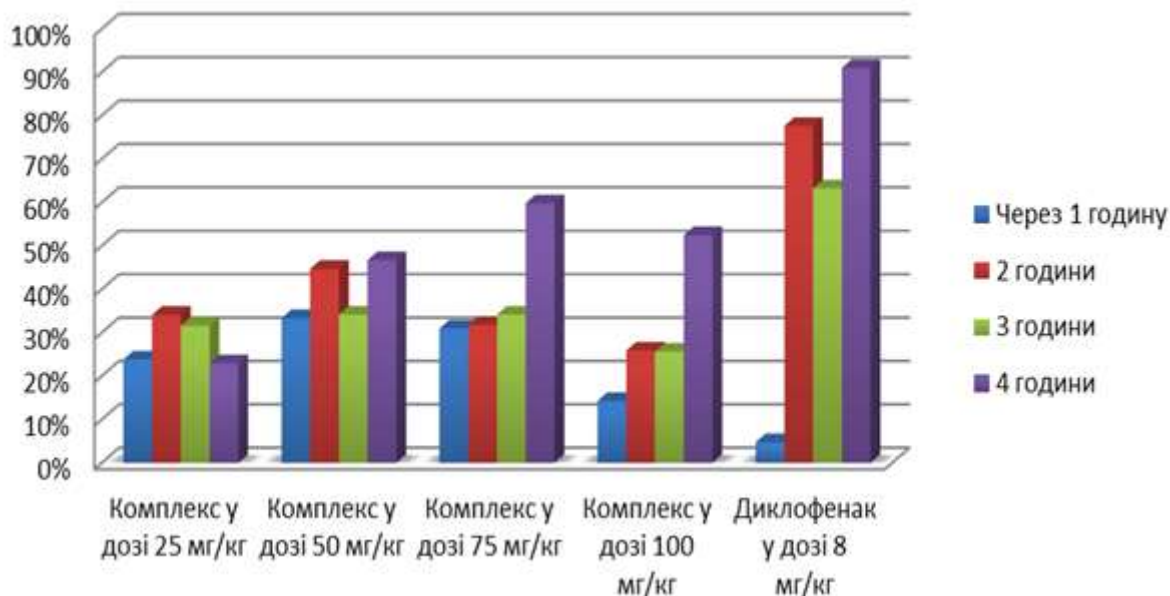


Рис 4.16 Протизапальна активність модифікованого екстракту мучниці звичайної листя з глютаміновою кислотою (ПЕГлу) у досліджуваних дозах (%)

Таким чином, найактивнішими субстанціями, які проявили протизапальну активність, стали модифіковані екстракти мучниці звичайної листя з лізином, гліцином, аргініном, аланіном, валіном, лейцином і цистеїном.

4.6 Скринінг діуретичної активності

Серед рослинних лікарських засобів з діуретичною та уроантисептичною дією особливе місце займає арбутиновмісна сировина, така як мучниця, брусниця, грушанка тощо. Рослинні діуретичні засоби мають істотні переваги над синтетичними, оскільки сечогінний ефект наростає поступово та відсутні втрати електролітів. Окрім сечогінного ефекту, арбутиновмісна сировина має протизапальну, антибактеріальну і антиоксидантну дію. Відомо, що екстракти з мучниці звичайної листя мають діуретичну активність за рахунок вмісту в них гідрохінону [7]. Тому доцільно провести скринінг діуретичної активності модифікованих екстрактів мучниці звичайної листя.

Дослідження діуретичної активності модифікованих екстрактів мучниці звичайної листя проводили за методом Берхіна [4] (Розділ 2, п. 13) на безпородних щурах масою 150-220 г, які утримувались у віварії ЦНДЛ НФаУ у стандартних умовах на звичайному раціоні при вільному доступі до води і їжі. Отримані данні дослідження модифікованих екстрактів мучниці звичайної листя наведені у таблиці 4.4.

Таблиця 4.4

**Діуретична активність модифікованих екстрактів мучниці звичайної
листя**

Комплекс	Доза, мг/кг	Діурез через ...			
		2 години		4 години	
		(M ± m) мл	у % до контролю	(M ± m) в мл	у % до контролю
1	2	3	4	5	6
Контроль		0,90±0,14	100	1,74±0,25	100
ПЕЛі	25	0,62±0,18*	69	0,94±0,09*	54
	50	1,14±0,17*	127	1,36±0,15*	78
	75	1,10±0,07*	122	1,26±0,09*	72
	100	1,16±0,15*	129	1,34±0,17*	77
ПЕГі	25	0,62±0,13*	69	1,08±0,16*	62
	50	0,92±0,08	102	1,34±0,11*	77
	75	1,06±0,11	118	1,24±0,21*	71
	100	1,02±0,08	113	1,38±0,08*	79
ПЕГ	25	0,86±0,11	123	1,36±0,11*	91
	50	1,08±0,08*	154	1,40±0,10*	93
	75	1,06±0,11	151	1,40±0,12*	93
	100	1,22±0,13*	174	1,54±0,11	103
ПЕЦ	25	1,04±0,11	116	1,32±0,13*	76
	50	1,16±0,09*	129	1,50±0,12	86
	75	1,26±0,24*	140	1,60±0,16	92
	100	1,22±0,13*	136	1,46±0,09	84

Продовж. табл. 4.4

1	2	3	4	5	6
ПЕЛ	25	0,98±0,11	109	1,24±0,11*	71
	50	1,26±0,11*	140	1,52±0,08	87
	75	1,16±0,15*	129	1,54±0,15	89
	100	1,28±0,08*	142	1,52±0,08	87
ПЕА	25	1,14±0,11*	127	1,38±0,15*	79
	50	1,22±0,19*	136	1,40±0,16*	80
	75	1,32±0,08*	147	1,58±0,04	91
	100	1,32±0,13*	147	1,60±0,10	92
ПЕВ	25	1,34±0,21*	149	1,88±0,13	108
	50	1,30±0,10*	144	1,88±0,13	108
	75	1,50±0,10*	167	2,08±0,15*	120
	100	1,80±0,16*	200	2,44±0,17*	140
ПЕАр	25	1,12±0,16	124	1,60±0,16	92
	50	1,32±0,16*	147	1,62±0,18	93
	75	1,48±0,16*	164	1,76±0,15	101
	100	1,44±0,11*	160	1,92±0,08	110
ПЕФ	25	1,12±0,15*	124	1,54±0,11	89
	50	1,24±0,11*	138	1,56±0,11	90
	75	1,44±0,11*	160	1,74±0,11	100
	100	1,42±0,15*	158	1,88±0,13	108
ПЕГлу	25	0,96±0,09	107	1,20±0,12*	69
	50	1,12±0,08*	124	1,52±0,16	87
	75	1,20±0,12*	133	1,48±0,13	85
	100	1,22±0,19*	136	1,68±0,13	97
ПЕ	25	1,00±0,16	111	1,30±0,10*	75
	50	1,24±0,11*	138	1,50±0,12	86
	75	1,24±0,17*	138	1,58±0,11	91
	100	1,22±0,13*	136	1,58±0,25	91

Примітки: * - $p \leq 0,05$ по відношенню до контрольних тварин; # - $p \leq 0,05$ по відношенню до тварин, що отримували відвар мучниці порівняння.

Як видно з результатів дослідження, деякі модифіковані екстракти мучниці звичайної з амінокислотами призводили до збільшення кількості виділеної сечі через 2 години від початку експерименту, а потім до зниження через 4 години, у порівнянні з показниками групи контрольних тварин. Діурез дослідних тварин, які отримували екстракти мучниці звичайної листя з лізином, гліцином, лейцином, аланіном, глютаміновою кислотою і цистеїном у дозі 100 мг/кг через 2 години збільшувався на 29 %, 74 %, 42 %, 47 %, 36 % та 36 % відповідно у порівнянні з контрольною групою. Введення екстракту мучниці звичайної з аргініном в усіх досліджуваних дозах (25, 50, 75 і 100 мг/кг) через 2 години від початку експерименту призводило до збільшення діурезу в групі на 24 %, 47 %, 64 % та 60 % відповідно. Найбільший вплив на діуретичну активність мав екстракт мучниці звичайної листя з валіном. Через 2 години після введенні цього екстракту у дозі 25 мг/кг діурез достовірно зростав на 49 %, у дозі 50 мг/кг – на 44 %, у дозі 75 мг/кг – на 67 % та у дозі 100 мг/кг – збільшувався в 2 рази у порівнянні з контрольною групою. Через 4 години ця активність у дозах 75 і 100 мг/кг була вищою на 20 % та 40 % відповідно за показник у групі контролю.

Через 4 години від початку експерименту об'єм сечі у груп тварин, які отримували екстракти мучниці звичайної листя з лізином та гліцином в усіх досліджуваних дозах, екстракти з цистеїном, норлейцином та глютаміновою кислотою у дозі 25 мг/кг, та з аланіном у дозах 25 та 50 мг/кг, достовірно був меншим за показник у контрольній групі.

Введення екстракту мучниці звичайної листя з гістидином у дозі 25 мг/кг призводило до зменшення діурезу через 2 години на 31 %, а через 4 години у цій же дозі – на 38 %, у дозі 50 мг/кг – на 23 %, у дозі 75 мг/кг – на 29 %, у дозі 100 мг/кг – на 21%, тобто цей екстракт має антидіуретичну дію.

Об'єм сечі при введенні екстракту мучниці звичайної листя з фенілаланіном через 2 години після початку експерименту достовірно зростав в усіх досліджуваних дозах на 24 %, 38 %, 60 % та 58 % відповідно у порівнянні з контрольною групою. Через 4 години достовірних змін не відбувалось.

Порівнюючи діуретичну активність модифікованих екстрактів мучниці звичайної листя і препарату порівняння, були отримані наступні результати. Достовірні зміни через 2 години від початку експерименту спостерігали у групах тварин, які отримували екстракт з лізином у дозі 25 мг/кг, з гістидіном у дозі 25, 50 і 100 мг/кг, з гліцином у дозі 50 мг/кг, з валіном у дозі 25, 75 і 100 мг/кг та з аргініном у дозі 100 мг/кг. При введенні екстракту мучниці звичайної з лізином у дозі 25 мг/кг і з гліцином у дозі 50 мг/кг спостерігали зменшення екскреторної функції нирок дослідних тварин [56-61, 63, 132].

Серед модифікованих екстрактів мучниці звичайної листя найбільш перспективними є екстракти з валіном, гліцином та фенілаланіном.

4.7 Скринінг антимікробної активності

Вивчення антимікробної активності модифікованих екстрактів мучниці звичайної листя з амінокислотами проводили методом дифузії в агар у лабораторії біохімії мікроорганізмів та живильних середовищ Інституту мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова під керівництвом к.біол.н. Осолодченко Т. П.

Отримані результати представлені у таблиці 4.5.

У результаті досліджень за діаметром зони затримки росту мікроорганізмів встановлено, що всі досліджувані екстракти мучниці звичайної листя, модифіковані з амінокислотами, проявляють антибактеріальну активність. Виражену антибактеріальну активність щодо штамів *St. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *Pr. vulgaris* ATCC 4636, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *B. subtilis* ATCC 6633 та *C. albicans* ATCC 653/885 проявили екстракти мучниці звичайної листя, модифіковані з лейцином, валіном та препаратом порівняння – нативний екстракт мучниці звичайної листя, отриманий 50 % розчином етанолу.

Таблиця 4.5.

Антимікробна активність досліджуваних екстрактів мучниці звичайної

Екстракт	Діаметри зон затримки росту у мм (кількість повторів досліду n=6)					
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 4636	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Candida albicans</i> ATCC 653/885
ПЕА	21,7±0,6	19,3±0,6	21,0±1,0	22,0±1,0	17,0±1,0	22,7±0,6
ПЕАр	21,0±1,0	20,3±0,6	22,0±1,0	22,0±1,0	16,0±1,0	23,0±1,0
ПЕВ	22,0±1,0	20,0±1,0	23,7±0,6	24,0±1,0	20,0±1,0	22,3±0,6
ПЕГі	20,0±1,0	20,3±0,6	21,7±0,6	20,0±1,0	16,0±1,0	20, ±0,6
ПЕГ	20,0±1,0	20,3±0,6	21,7±0,6	20,7±0,6	16,7±0,6	20,0±1,0
ПЕГлу	22,7±0,6	21,7±1,5	23,7±0,6	22,0±1,0	16,7±0,6	22,0±1,0
ПЕЛі	18,3±0,6	16,0±1,0	19,3±0,6	22,0±1,0	19,3±0,6	24,0±1,0
ПЕЛ	20,0±1,0	18,0±1,0	20,3±0,6	23,7±0,6	20,3±1,5	22,0±1,0
ПЕ	21,0±1,0	20,0±1,0	22,0±1,0	22,0±1,0	20,0±1,0	23,0±1,0
ПЕФ	18,0±1,0	17,7±0,6	20,0±1,0	23,7±0,6	19,3±1,5	22,3±1,5
ПЕЦ	16,3±1,5	17,0±1,0	19,0±1,0	18,0±1,0	12,7±1,5	18,3±1,5

Незначну антимікробну активність мають екстракти мучниці звичайної листя, модифіковані з аланіном, аргініном, гістидином, гліцином, глутаміновою кислотою та цистеїном, щодо культури *B. subtilis* ATCC 6633 (зона затримки росту 12,7-17 мм). Також, досить слабка антибактеріальна активність характерна для екстрактів мучниці звичайної листя, модифікованих з лізином, лейцином, фенілаланіном і цистеїном, щодо культури *E. coli* ATCC 25922 (зони затримки росту становили 16-17,7 мм).

Загалом, слабку антимікробну активність проявляє екстракт мучниці звичайної листя з цистеїном, де зони затримки росту штамів *St. aureus*, *E. coli*, *Pr. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* та *C. albicans* були 16,3, 17,0, 19,0, 18,0, 12,7 та 18,3 мм відповідно.

Таким чином, серед екстрактів мучниці звичайної листя, модифікованих з амінокислотами, виявлено субстанції, для яких характерна виражена антимікробна активність щодо штамів *St. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *Pr. vulgaris* ATCC 4636, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *B. subtilis* ATCC 6633 та *C. albicans* 653/885 ATCC. Такими субстанціями виявились екстракти мучниці звичайної листя з лейцином, валіном та вихідний екстракти, отриманий 50 % етанолом.

4.8 Скринінг гіпоглікемічної активності

Первинний фармакологічний скринінг гіпоглікемічних властивостей нових екстрактів, одержаних з мучниці звичайної листя, з додаванням амінокислот проводили на інтактних тваринах під керівництвом доцента Кравченко Г. Б. та аспіранта Мазена М. Для оцінки гіпоглікемічної активності екстрактів було проведено два експерименти – первинний скринінг і оральний тест толерантності до глюкози (ОТТГ).

Результати першого етапу експерименту по вивченню гіпоглікемічної активності сухих екстрактів з мучниці звичайної листя, в якому були використані здорові щури наведені у таблиці 4.6.

Як препарат порівняння використовували офіційний збір «Арфазетин» у вигляді відвару. Враховуючи те, що тварини були здорові, натще і не зазнали навантаження глюкозою зміни у рівні глюкози у крові більшою мірою були недостовірні, але мали тенденцію до зниження. Лише через 4 години та 6 годин після введення ПЕ з додаванням цистеїну та аргініну, а також «Арфазетину» та метформіну було зафіксовано достовірне зниження концентрації глюкози порівняно з інтактними тваринами.

Таблиця 4.6

**Вплив введення сухих екстрактів мучниці звичайної листя на рівень
глюкози у крові здорових щурів**

Група тварин		Концентрація глюкози в крові, ммоль/л через відповідний проміжок часу (години)				
		0	2	4	6	8
1	Інтакт	3,87±0,17	3,88±0,24	3,93±0,23	3,86±0,13	3,85±0,11
2	ПЕ	4,04±0,14	3,81±0,21	3,54±0,19	3,66±0,17	3,91±0,24
3	ПЕЛі	4,02±0,21	4,04±0,19	3,08±0,15	4,01±0,19	3,98±0,24
4	ПЕФ	3,87±0,15	3,95±0,11	3,88±0,21	3,74±0,13	3,79±0,21
5	ПЕВ	3,96±0,17	3,91±0,13	3,95±0,14	3,93±0,24	3,92±0,19
6	ПЕГ	3,94±0,18	3,89±0,17	3,69±0,18	3,51±0,21*	3,74±0,15
7	ПЕА	4,01±0,20	3,97±0,18	4,04±0,19	4,01±0,24	3,87±0,24
8	ПЕЛ	3,87±0,15	3,91±0,14	3,83±0,15	3,85±0,11	3,73±0,17
9	ПЕГі	3,93±0,17	3,81±0,24	3,67±0,23*	3,79±0,15	3,85±0,16
10	ПЕЦ	3,95±0,15	3,71±0,19	3,42±0,15*	3,51±0,19*	3,88±0,13
11	ПЕАрг	4,01±0,17	3,73±0,13	3,47±0,19*	3,61±0,18*	3,87±0,19
12	ПЕГлу	4,03±0,11	3,87±0,19	3,55±0,17*	3,74±0,19	3,94±0,21
13	Арфазетин	3,97±0,17	3,61±0,18	3,35±0,14*	3,42±0,14*	3,79±0,18

Примітка. * - $p \leq 0,05$ порівняно з інтактом

Проте, зрозуміло, що більш виражені зміни були виявлені при проведенні ОТТГ. Пероральний тест на толерантність до глюкози є чутливим і специфічним для виявлення чутливості тканин до глюкози, оскільки може продемонструвати швидкість утилізації глюкози після її всмоктування. Вважається, що коливання рівня глюкози після навантаження добре відображає толерантність до глюкози, а площа глюкози під кривою (AUC)

може бути показником саме такого коливання глюкози [100]. Результати тесту на толерантність до глюкози представлені на рисунку 4.17 у вигляді графіку, де відображені результати ОТТГ у тварин інтактної і контрольної груп, при введенні препаратів порівняння та, звісно, ПЕ та ПЕ з додаванням глютамінової кислоти, аргініну і цистеїну. Вміст глюкози натще, як у інтактних щурів, так і у інших здорових тварин до початку експерименту був у межах фізіологічної норми для даного виду лабораторних тварин.

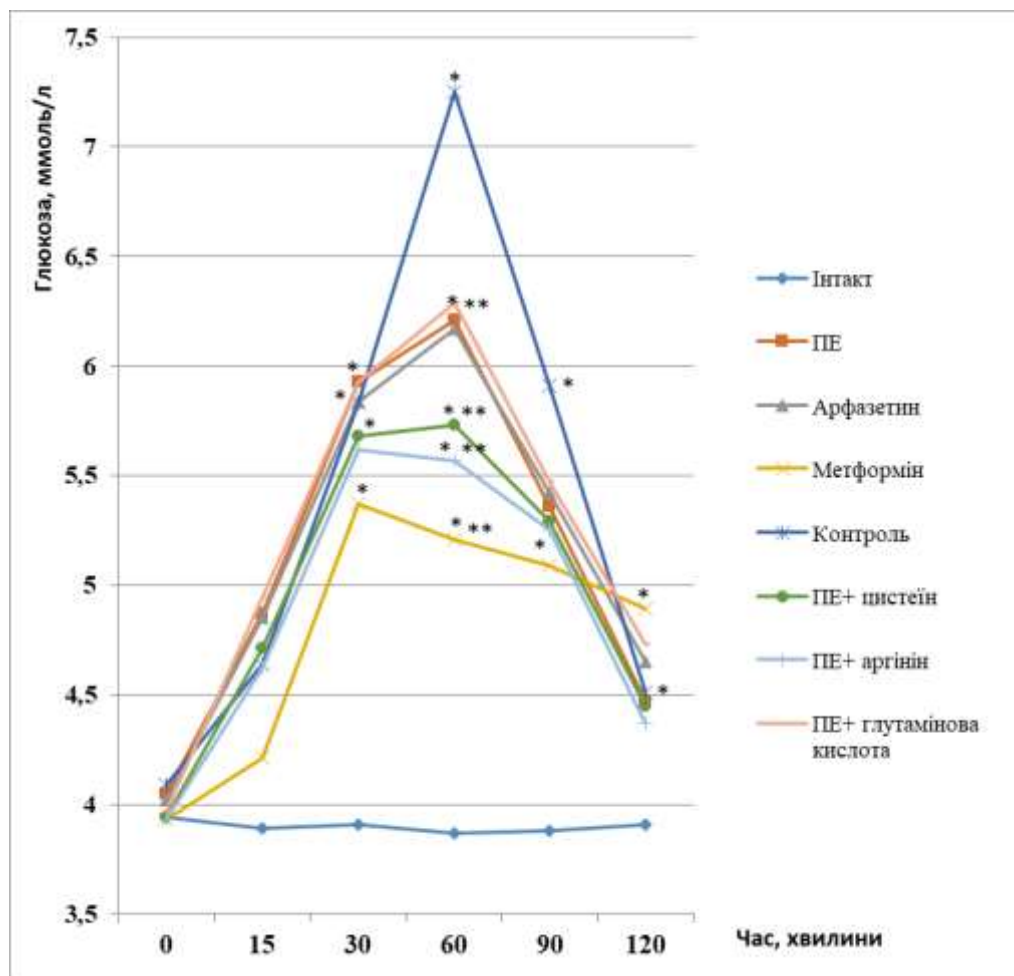


Рис. 4.17 Результати ОТТГ при введенні сухого екстракту з листя мучниці звичайної і сухих екстрактів з додаванням амінокислот: *- $\leq 0,05$ порівняно з інтактом; **-* $\leq 0,05$ порівняно з контролем

Як наочно можемо побачити, рівень глюкози у кожній контрольній точці часу достовірно вище за період після навантаження глюкозою у контрольній групі порівняно з інтактними тваринами. Вже через 30 хв після навантаження рівень глюкози зріс на 32,9 %, а через 60 хв на 46,6 % ($7,25 \pm 0,24$ ммоль/л).

Введення ПЕ знизило концентрацію глюкози у крові через 60 хвилин на 14,3 % порівняно з контрольною групою та становив 6,21 ммоль/л. У той же час, додавання амінокислот посилює цей ефект. Так, у групі тварин ПЕАрг рівень глюкози знизився через годину на 16 %, у групі тварин ПЕЦ – на 15,2 % і у групі ПЕГлу – на 15,7 %.

Показники концентрації глюкози у контрольних точках часу у групах тварин, яким вводили «Арфазетин», ПЕ і ПЕГлу не мали суттєвої різниці (Рис 4.17), але через 60 та 90 хв зниження рівня глюкози було достовірним по відношенню до контрольної групи. У груп щурів, яким введені ПЕАрг і ПЕЦ більше був знижений рівень глюкози у крові порівняно з названими групами, але цей вплив був не таким ефективним, як при введенні метформіну.

Супресивний вплив сухого екстракту з мучниці звичайної листя і екстрактів з додаванням амінокислот на рівень глюкози у крові при проведенні ОТТГ підтверджено розрахунком АUC. За допомогою діаграми (рис. 4.18), відобразили розрахунки АUC для всіх груп тварин, яким вводилися ПЕ з додаванням амінокислот.

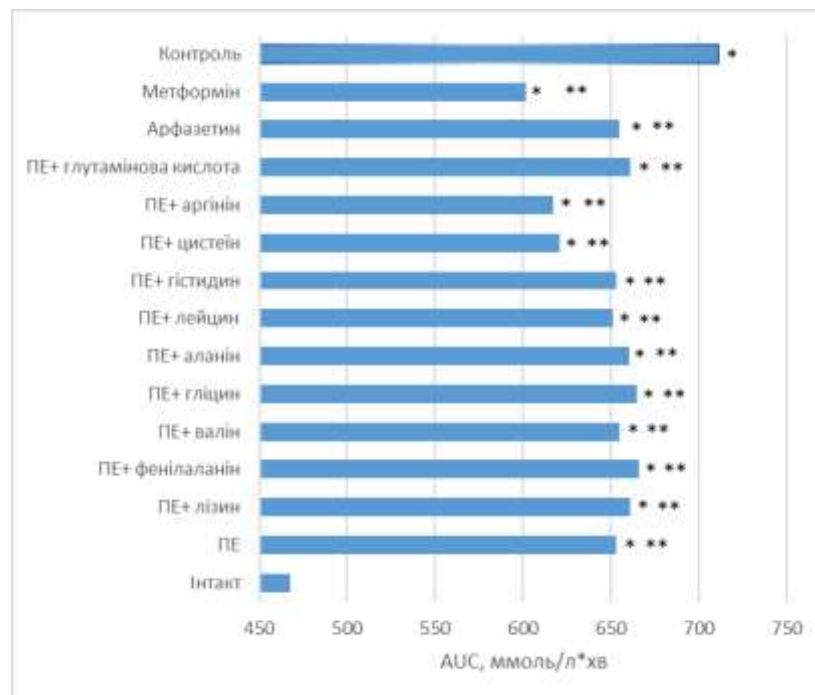


Рис. 4.18 Розрахунок площі під кривою (AUC) при проведенні ОТТГ при введенні сухих екстрактів мучниці звичайної листя: *- $\leq 0,05$ порівняно з інтактом; **- $\leq 0,05$ порівняно з контролем

Результати дослідження показали, що розраховані значення AUC для відповіді глюкози під час ОГТТ виявили суттєвий приріст у контрольній групі тварин ($710,9 \pm 17,56$ ммоль/л*хв) порівняно з інтактною групою ($467,55 \pm 13,14$ ммоль/л*хв). Однак, порівняно з контрольною групою, введення як препаратів порівняння, так і екстрактів з додаванням амінокислот, показало значне зниження AUC відносно контрольної групи. Зокрема, можна відмітити достовірне та найбільше відносно інших груп щурів, зниження площі під кривою протягом 120 хвилин спостереження, порівняно з контрольною групою з навантаженням глюкозою для груп ПЕ ($652,8 \pm 21,32$ ммоль/л*хв), ПЕАрг ($617,4 \pm 18,34$ ммоль/л*хв) та ПЕЦ ($621,3 \pm 19,61$ ммоль/л*хв). Крім того, введення метформіну призводило до найбільшого зниження площі під кривою, при цьому, AUC іншого препарату порівняння – «Арфазетину» була більше, чим при введенні ПЕ, ПЕАрг та ПЕЦ.

Вже з початку 2000х років почали з'являтися експериментальні та клінічні підтвердження того, що концентрація амінокислот у плазмі крові підвищується при інсулінрезистентних станах, також і те, що дієта збагачена білками може корегувати порушення метаболізму глюкози [143]. Вивчалися, як ефект введення суміші амінокислот, так і ефекти, які викликані введенням окремих амінокислот. Так, результати, які були отримані у експерименті, показали, що сприятливий вплив суміші амінокислот на засвоєння глюкози скелетними м'язами на тлі постпрандіальної глікемії і підвищенні рівня інсуліну, обумовлено збільшенням фосфорилування AS160 та ізоформи глюкозного транспортера (GLUT4), пов'язаного з плазматичною мембраною [150]. Дослідження впливу окремих амінокислот продемонструвало цікаві дані щодо застосування цілого ряду амінокислот. Так, добавки аргініну мають ефективну дію, яке допомагає поліпшити чутливість до інсуліну і функцію ендотелію, імовірно за допомогою вироблення NO, що ймовірно спричиняє збільшення секреції інсуліну. NO стимулює транспорт глюкози у скелетних м'язах із збільшенням рівня GLUT4 на її поверхні, що призводить до поліпшення резистентності до інсуліну [125]. Також було показано, що

добавки цистеїну можуть знижувати гіперлікемію та маркери судинного запалення при ЦД, мабуть, запобігаючи активації ядерного фактору капта-підсилювача легких ланцюгів активованих β -клітин (NF- κ ppaB) на моделі діабетичних тварин та позитивно регулюють вплив інсуліну на метаболізм глутатіону і глюкози в адипоцитах. Це свідчить про те, що такі добавки можуть підвищити чутливість до інсуліну і можуть використовуватися як допоміжна терапія діабету [78].

Однак, у доступних для аналізу даних немає опублікованих досліджень щодо поєднання застосування рослинних поліфенолів у поєднанні з амінокислотами для лікування або корекції інсулінорезистентності, ЦД2, метаболічного синдрому. Тому для було проведено скринінг екстрактів з листя мучниці звичайної і виявлені саме ті амінокислотні добавки до ПЕ, які є найбільш ефективними щодо стимуляції поглинання глюкози тканинами.

Хоча рівень глюкози у плазмі натще загально визнаний як діагностичний показник діабету і толерантності глюкози, однак, цього недостатньо для чіткого виявлення толерантності до глюкози на ранній стадії, якщо не проводиться ОТТГ. Більше того, в даному експерименті, коли згідно загальноприйнятим рекомендаціям використовуються здорові тварини, для оцінки швидкості поглинання глюкози після навантаження необхідно проводити ОТТГ. Але, навіть у випадку проведення ОТТГ, критерій швидкості поглинання глюкози при ОГТТ, може не надати повної інформації щодо толерантності до глюкози, тому була розрахована АUC, яка є показником змін рівня глюкози у часі після навантаження глюкозою і широко застосовується для оцінки ефективності субстанцій з потенційною гіперглікемічною дією.

У проведених експериментах було встановлено, що розроблені екстракти на тлі вуглеводного навантаження знижують постпрандіальний рівень глюкози у крові у щурів порівняно з контрольними тваринами. З огляду на те, що глікемічна крива після перорального навантаження (ОТТГ) та розрахунок площі під кривою (АUC) здатні певною мірою відобразити процеси утилізації глюкози у організмі експериментальних тварин, можна

припустити, що в умовах вуглеводного навантаження саме під дією сухого екстракту з листя мучниці звичайної та екстрактів з додаванням амінокислот з інтенсивність поглинання глюкози тканинами зростає. Експериментально було встановлено, що додавання певних амінокислот, зокрема аргініну, цистеїну і глютамінової кислоти, до екстракту підвищували у тварин толерантність до вуглеводів [44, 86, 87, 145].

Для більш об'єктивного виявлення гіпоглікемічної активності у екстрактів, поряд з використанням тесту на толерантність до глюкози, необхідно проводити обов'язкове вивчення їх дії на моделі експериментальної інсулінорезистентності.

4.9 Дослідження гіпоглікемічної та гіполіпідемічної активності екстрактів на моделі експериментальної інсулінорезистентності

Гіпоглікемічну активність сухих екстрактів з мучниці звичайної листя вивчали на аутбредних самцях щурів масою 180 ± 20 г [50] під керівництвом доцента Кравченко Г. Б. та аспіранта Мазена М. Інсулінорезистентність викликали у тварин утримуванням на висококалорійній дієті збагаченій фруктозою (ВФД) (29 % жирів рослинного та тваринного походження з додаванням фруктози у дозі 1 г/100 г маси тіла щоденно) протягом 5 тижнів [137]. Піддослідних тварин було поділено на групи ($n=6$): інтактна, група контрольної патології; дві референс-групи, тваринам яких вводили настій з лікарського збору «Арфазетин» (12 мл/кг) та суспензію препарату «Метформін» (15 мг/кг) відповідно; три дослідні групи, тварини яких отримували екстракт з мучниці звичайної листя та екстракти з мучниці звичайної листя з додаванням аргініну та цистеїну у дозах 200 мг/кг маси тіла. Відповідні засоби вводили тваринам натщесерце внутрішньошлунково з 3 тижня експерименту упродовж 14 днів. По закінченні експерименту тварин декапітували шляхом сакрифації, збирали кров для отримання сироватки та визначали вміст глюкози у сироватці крові глюкозо-оксидазним методом за

допомогою стандартних наборів реактивів фірми Філісіт-Діагностика (м. Дніпро, Україна). Отримані результати представлені в таблиці 4.7.

Таблиця 4.7

Вміст глюкози у сироватці крові щурів з інсулінорезистентністю, яким вводили екстракти з мучниці звичайної листя (M±m, n=10)

Група тварин	Вміст глюкози, ммоль/л
Інтакт	4,85±0,19
Високофруктозна дієта	8,11±0,46*
Високофруктозна дієта + «Арфазетин»	6,34±0,53*/**
Високофруктозна дієта + «Метформін»	5,02±0,35**
Високофруктозна дієта + екстракт з листя мучниці звичайної (ПЕ)	6,42±0,37*/**
Високофруктозна дієта + екстракт з листя мучниці звичайної з аргініном (ПЕАрг)	5,67±0,67*/**
Високофруктозна дієта + екстракт з листя мучниці звичайної з цистеїном (ПЕЦ)	5,89±0,31*/**

Примітки: * - $p \leq 0,05$ вірогідно по відношенню до інтактної групи; ** - $p \leq 0,05$ вірогідно по відношенню до контрольної патології.

Дані, наведені у табл. 4.7, свідчать про те, що розвиток стану резистентності до інсуліну супроводжується розвитком гіперглікемії. Введення екстрактів мучниці звичайної листя призводить до зниження рівня глюкози. При цьому, найбільшу активність виявив екстракт з листя мучниці з додаванням аргініну. Його активність була вище активності препарату порівняння «Арфазетину» і наближалася до «Метформіну».

Відомо, що розвиток стану резистентності до інсуліну призводить до порушення чутливості клітин до дії інсуліну, підвищення рівню глюкози і формуванню дисліпідемічних станів [165]. Посилення синтезу холестерину у

печінці за цих умов є ключовим етапом у патогенезі атеросклерозу, стеатозу печінки, цукровому діабеті 2 типу, тощо. Ліпотропну дію екстрактів з мучниці листя вивчали на моделі резистентності до інсуліну. По закінченні експерименту тварин декапітували шляхом сакрифації, збирали кров для отримання сироватки та визначали вміст холестерину ліпопротеїдів низької густини (ХС-ЛПНГ) та холестерину ліпопротеїдів високої густини (ХС-ЛПВГ) з допомогою стандартних наборів реактивів фірми «Фелісіт-Діагностика». Результати визначення цих показників наведені у таблиці 4.8.

Таблиця 4.8

Вміст ХС-ЛПНГ та ХС-ЛПВГ у крові щурів з інсулінорезистентністю за умов введення екстрактів з мучниці звичайної листя

Група тварин	ХС-ЛПНГ, мкмоль/мг білка	ХС-ЛПВГ, мкмоль/мг білка
Інтакт	0,81±0,02	1,32±0,07
Високофруктозна дієта	1,22±0,05*	0,77±0,04*
Високофруктозна дієта + «Арфазетин»	1,07±0,06*/**	0,94±0,05*/**
Високофруктозна дієта + «Метформін»	1,01±0,04*/**	1,23±0,09**
Високофруктозна дієта + екстракт з мучниці звичайної листя (ПЕ)	0,99±0,05*/**	1,06±0,09*/**
Високофруктозна дієта + екстракт з мучниці звичайної листя з аргініном (ПЕАрг)	0,88±0,35**	1,21±0,09**
Високофруктозна дієта + екстракт з мучниці звичайної листя з цистеїном (ПЕЦ)	0,84±0,42**	1,25±0,09**

Примітки: * - $p \leq 0,05$ вірогідно по відношенню до інтактної групи; ** - $p \leq 0,05$ вірогідно по відношенню до контрольної патології.

Отримані дані свідчать про те, що розвиток стану резистентності у експериментальних тварин супроводжується зниженням рівню ХС-ЛПВГ та підвищенням вмісту ХС-ЛПНГ, що свідчить про формування проатерогенного стану. Введення тваринам екстракту мучниці звичайної листя має нормалізуючий вплив на вміст холестерину. Так, вміст ХС-ЛПНГ вірогідно знижується, а вміст ХС-ЛПВГ підвищується. Найвищу активність в цьому випадку продемонстрував екстракти з цистеїном і аргініном. Їх активність наближувалася до препарату порівняння «Метформін» [44, 86, 87, 145].

Встановлено, що введення сухого екстракту з мучниці звичайної листя, а також модифікованих сухих екстрактів з цистеїном та аргініном проявляє нормалізуючу дію на метаболічні порушення на тлі високофруктозної дієти, тому вони є перспективними агентами для корекції метаболічного синдрому.

4.10 Дослідження панкреопротекторної активності

Ін'єкції низьких доз дексаметазону використовували в різних модифікаціях для індукції ІР та ЦД2 протягом останніх десятиліть [138]. Щоб оцінити, чи індукують ІР тривалі ін'єкції дексаметазону в поточній модифікації, визначили рівень глюкози, імунореактивний інсулін та розраховали індекси НОМА (роділ 2, п. 17) (табл. 4.9). Дослідження проводились на базі ЦНДЛ НФаУ під керівництвом доцента Кравченко Г. Б. та аспіранта Мазена М.

Середня маса тіла щурів інтактної групи до кінця 7-го тижня була значно вищою, ніж у щурів групи Dex; як і протягом усього експерименту. Так, достовірні відмінності у масі тіла зафіксовано вже на 3-му тижні (рис. 4.19, а). Введення досліджуваних сполук дає можливість тваринам набирати масу тіла відповідно до віку. Об'єктом інтересу була також вага підшлункової залози щура. Як виявилось, абсолютна маса підшлункової залози в різних дослідних

групах суттєво різнилася (рис. 4.19, б). Важливе значення має співвідношення між масою підшлункової залози та масою тіла тварини. Відносна маса підшлункової залози інтактних тварин значно вища, ніж у групі Dex. Після 2-тижневого прийому екстрактів мучниці звичайної листя і еталонних препаратів відносна вага підшлункової залози збільшилася, але не досягла показника здорових тварин.

Таблиця 4.9

Вплив сухих екстрактів мучниці звичайної листя на моделі резистентності до інсуліну, індукованої ін'єкціями дексаметазону у щурів

Група тварин		Показник		
		Глюкоза, ммоль/л	Імунореактивний інсулін, ммоль/л	НОМА
Початкові показники		4.15±0.28	73±7	1.9±0.61
Інтактні тварини (IC)	5 тижнів	4.03±0.41	72±8	1.8±0.65
	7 тижнів	3.95±0.27	74±9	1.7±0.69
Dex	5 тижнів	5.93±0.63*	105±8*	4.0±0.85*/#
	7 тижнів	7.58±0.91	121±15*	5.9±0.97
Dex_ПЕ		5.81±0.54	91±9*	3.4±0.64*/#
Dex_ПЕЦ		5.37±0.49	82±7*	2.8±0.32
Dex_cys		6.01±0.47	90±9*	3.5±0.27
Dex_met		5.33±0.31	71±6*	2.4±0.27
Dex_arph		6.11±0.47	95±10*	3.7±0.45

Примітка: Кожне значення представляє середнє ± стандартна помилка (n=6)

* - вказує на достовірну різницю відносно групи IC ($p \leq 0,05$)

- вказує на достовірну різницю відносно групи Dex ($p \leq 0,05$)

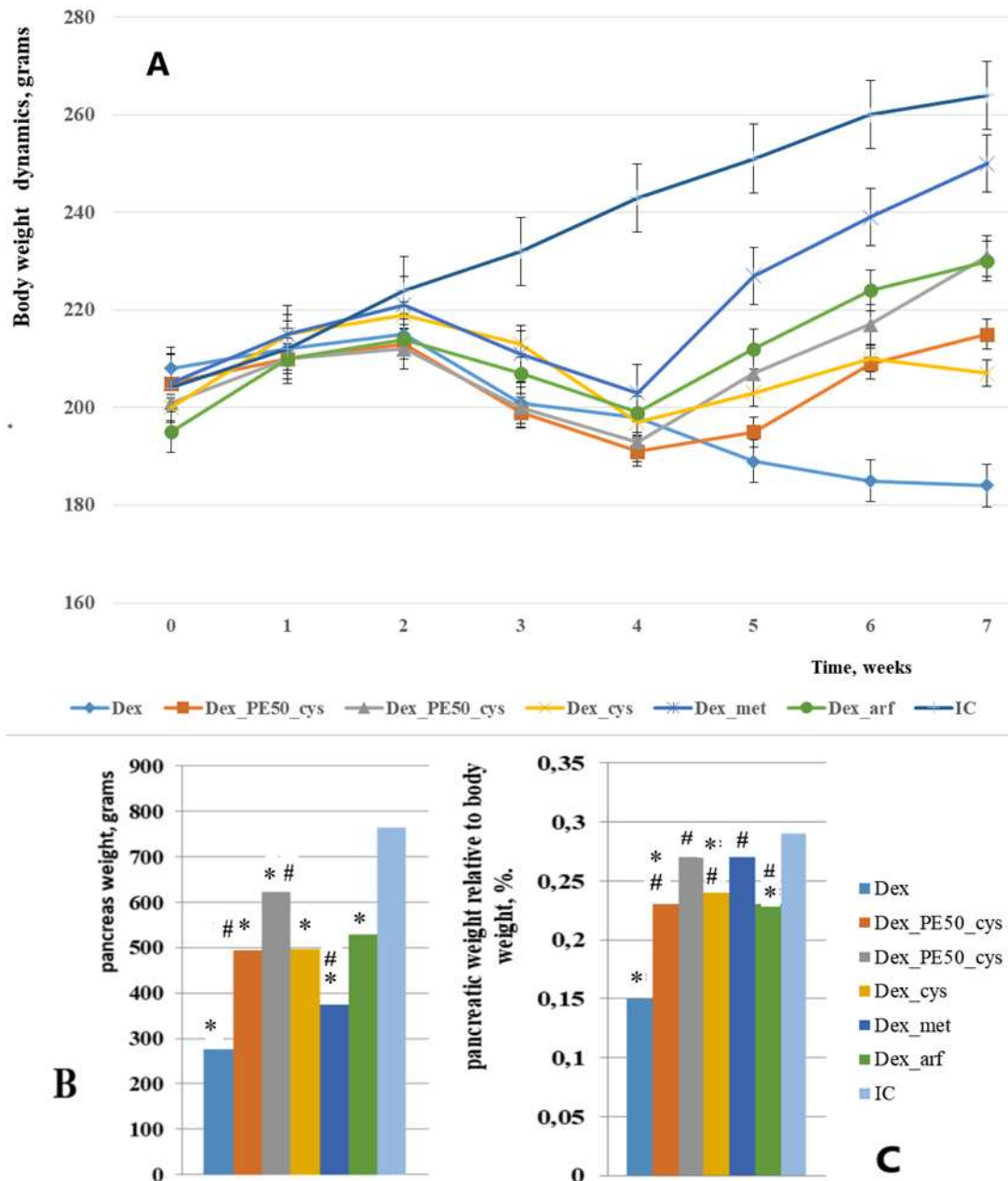


Рис. 4.19 А – Динаміка маси тіла, г за тижні; В – Маса підшлункової залози, г; С – співвідношення маси підшлункової залози до маси тіла тварини, %.

Примітка: Кожне значення представляє середнє \pm стандартна помилка (n=6)

* - вказує на достовірну різницю відносно групи IC ($p \leq 0,05$)

- вказує на достовірну різницю відносно групи Dex ($p \leq 0,05$)

Стан гіперглікемії, викликаний тривалими ін'єкціями дексаметазону, призводив до підвищення рівня окисних маркерів, таких як продукти

перекисного окислення ліпідів, а також знижував активність антиоксидантних ферментів (табл. 4.10).

Розвиток експериментальної патології супроводжувався активацією процесів перекисного окислення ліпідів і виснаженням системи антиоксидантного захисту в клітинах підшлункової залози. Так, встановлено, що в гомогенатах тканин тварин групи Dex вміст як первинних, так і кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів – DC та TBARS був підвищений у 1,97 та 1,49 рази відповідно. Рівень GSH знизився у 2,27 рази, що, очевидно, пов'язано з його використанням у процесі інактивації реактивних форм кисню, а також зниженням активності GSH-Rx (табл. 4.10).

Таблиця 4.10

Вплив сухих екстрактів листя мучниці на деякі антиоксидантні параметри та вміст JNK у моделі інсулінорезистентності, спричиненої ін'єкціями дексаметазону у щурів

Дослідна група	Показник							
	TBARS, нмоль/мг протеїну	DC, нмоль/мг протеїну	GSH, нмоль/мг тканини	CAT, мкмоль/мг протеїну	SOD, U/мг протеїну	GSH-Rx, U/мг протеїну	Total JNK, нг/мг протеїну	p-JNK нг/мг протеїну
Інтактні тварини	99±11	47±7	82±7	0.54±0.3	28.3±1.7	0.68±0.6	274±19	73±8
Dex	148±21*	93±8*	36±6*	0.33±0.4*	16.1±0.9*	0.44±0.5*	385±21*	124±12*
Dex_ПЕ	112±14	64±4*/#	60±7	0.41±0.4*/#	21.3±1.5	0.51±0.7	330±28	112±9
Dex_ПЕЦ	103±15#	59±6	73±8*/#	0.51±0.5#	23.7±1.7#	0.63±0.3#	301±15#	84±6#
Dex_cys	129±16*	71±6*/#/&	45±9#&	0.40±0.3*/#	19.9±2.3*	0.56±0.8	311±12	107±11&
Dex_met	114±12#	53±8#	70±6*/#	0.48±0.4#	24.6±1.4	0.61±0.7	299±14	91±8
Dex_arph	126±23	69±7*	56±7	0.37±0.3*	22.3±1.7	0.59±0.4	324±31	114±10

Кожне значення представляє середнє ± стандартна похибка (n=6)

* - вказує на достовірну різницю відносно групи IC ($p \leq 0,05$)

- вказує на достовірну різницю відносно групи Dex ($p \leq 0,05$)

& - вказує на достовірну різницю відносно групи Dex_ПЕЦ ($p \leq 0,05$)

Численні експериментальні дані підтверджують розвиток оксидативного стресу як одного з наслідків хронічної гіперглікемії [144]. Зокрема, експерименти як *in vivo*, так і *in vitro* з використанням культури бета-клітин підшлункової залози також надали докази збільшення продукції реактивних форм кисню у підшлунковій залозі [94]. У зв'язку з цим важливою є оцінка показників, які вказують на розвиток оксидативного стресу та відповідь системи антиоксидантного захисту клітин. Результати поточного експерименту, який виявив накопичення TBARS і DC в гомогенаті підшлункової залози наприкінці 7-го тижня введення низьких доз дексаметазону, свідчать про інтенсифікацію утворення реактивних форм кисню.

Відомо, що JNK перш за все активується за рахунок утворення реактивних форм кисню. Встановлено, що в тканині підшлункової залози щурів групи Dex як загальний вміст JNK, так і її фосфорильованої форми – *p*-JNK збільшено в 1,4 і 1,69 рази відповідно. Активність ферментів першої лінії антиоксидантного захисту – CAT та SOD – зменшилась у 1,5 та 1,75 рази відповідно. Введення ПЕЦ тваринам з контрольною патологією пригнічувало процеси перекисного окислення ліпідів і покращувало антиоксидантний захист клітин підшлункової залози. Таким чином, вміст DC і TBARS зменшився в 1,57 і 1,44 рази. Рівень GSH відновився майже до початкових значень, що, мабуть, було зумовлено не лише придушенням окисного стресу, а й активацією GSH-Rx. Активність CAT та SOD зросла в 1,5 та 1,43 рази. Загальний рівень JNK знизився в 1,28 рази, але не досяг вихідних значень, а вміст *p*-JNK практично нормалізувався (табл. 4.10).

Підвищення загального рівня JNK внаслідок тривалого застосування дексаметазону може бути зумовлено впливом глюкокортикоїдів на експресію MAP-кіназ [25]. У нашому експерименті розвиток IP доведено у тварин групи Dex за допомогою загальноприйнятих методів – гіперглікемії та гіперінсулінемії (табл. 4.9) і супроводжується розвитком окисного стресу у

підшлунковій залозі щурів, активацією JNK та підвищенням вмісту p-JNK. (Табл. 4.10).

Існують докази щодо ймовірних шкідливих наслідків активації JNK у бета-клітинах, які можуть навіть спричинити глибоке пошкодження клітин [110]. Активація JNK в екскреторних клітинах є ключовою ланкою діабету екзокринної підшлункової залози, що призводить до загибелі клітин, активації запальних процесів, панкреатиту тощо [128]. Таким чином, у нашому дослідженні було виявлено зменшення відносно маси тіла маси підшлункової залози (рис. 4.19). Фосфорилування JNK призводить до його транслокації в мітохондрії, взаємодії з Sab білком, пригнічення тканинного дихання та вивільнення активних форм кисню, тобто утворення петлі активації JNK-Sab-ROS [162].

Введення тваринам ПЕЦ істотно знижує рівень pJNK, пригнічує перекисне окислення ліпідів, покращує активність ферментів антиоксидантного захисту (табл. 4.10). Спостережуваний ефект опосередковується спільною дією кількох компонентів. Таким чином, пригнічення перекисного окислення ліпідів є результатом антиоксидантної активності поліфенольних компонентів, серед яких вираженою активністю володіє арбутин, крім того, галова кислота пригнічує трансдукцію сигналу JNK. Підвищений рівень GSH підтримується наявністю амінокислоти цистеїну, яка також сприяє підвищенню активності ферментів, що містять SH-групи в активному центрі [155].

Таким чином, встановлено, що поєднання рослинних поліфенолів нового екстракту мучниці звичайної листя та амінокислоти цистеїну запобігає перекисному окисленню ліпідів, відновлює систему антиоксидантного захисту та руйнує петлю JNK-SAB-ROS, що, у свою чергу, відновлює структуру та покращує функціональну активність бета-клітин під впливом дексаметазону, який призводить IP [77].

Висновок до розділу 4

1. Розроблено дві схеми одержання сухих екстрактів мучниці звичайної листя зі значним вмістом арбутину. Фракціонування водного екстракту етилацетатом дозволило отримати сухий екстракт із вмістом арбутину на рівні 19,11 %. При обезжирюванні водного екстракту сировини хлороформом, після очищення на катіоніті КУ2, випарювання та екстракції фенольних сполук етанолом, вдалося отримати субстанцію з вмістом арбутину на рівні 31,25 %.

2. З мучниці звичайної листя були розроблені способи одержання сухих екстрактів, модифікованих 10 різними амінокислотами. Вихід сухих модифікованих екстрактів становив від 28,6 % до 36,2 % у залежності від амінокислоти; сухого екстракту, одержаного 50 % розчином етанолу – 12,7 %. Принципові схеми одержання сухих модифікованих екстрактів були запропоновані вперше та захищені 10 патентами України: 5 патентами на винахід 123476, 123477, 123380, 124042, 124043 та 5 патентами на корисну модель 141184, 140872, 140486, 142210 та 142930.

3. В одержаних екстрактах методом ВЕРХ було ідентифіковано 1 фенологлікозид (арбутин), 1 фенолкарбонову кислоту (галову кислоту), 5 флавоноїдів, 4 гідроксикоричні кислоти та встановлено їх кількісний вміст. Серед флавоноїдів домінуючими були гіперозид та катехін, серед гідроксикоричних кислот – кофеїна та хлорогенова кислоти. Вміст усіх ідентифікованих фенольних сполук у модифікованих екстрактах був нижчий у порівнянні з нативним екстрактом, отриманим 50 % розчином етанолу. В одержаних модифікованих екстрактах мучниці звичайної листя методом СФ встановлено вміст гідроксінонпохідних (у перерахунку на арбутин), гідроксикоричних кислот (у перерахунку на хлорогенову кислоту), флавоноїдів (у перерахунку на рутин) та суми фенольних сполук (у перерахунку на галову кислоту).

4. Протягом 14 днів спостережень у групах тварин, яким вводили досліджувані екстракти у дозі 3000 мг/кг, загибелі мишей не спостерігалось, що дозволяє вважати екстракти мучниці звичайної листя нетоксичними у обраних дозах. Оскільки дози 3000 мг/кг не призвели до смерті дослідних тварин в усіх групах, можна зробити висновок, що за класифікацією Сидорова К. К. модифіковані екстракти мучниці звичайної листя можна віднести до IV класу токсичності (малотоксичні сполуки).

5. Вивчили протизапальну активність модифікованих екстрактів мучниці звичайної листя з амінокислотами на моделі карагенінового набряку. Найактивнішими субстанціями, які проявили протизапальну активність, стали модифіковані екстракти мучниці звичайної листя з лізином, гліцином, аргініном, аланіном, валіном, лейцином і цистеїном.

6. Дослідили діуретичну активність модифікованих екстрактів мучниці звичайної листя за методом Берхіна. Серед модифікованих екстрактів мучниці звичайної листя найбільш перспективними є екстракти з валіном, гліцином та фенілаланіном, які мають виражену діуретичну активність.

7. Серед екстрактів мучниці звичайної листя, модифікованих з амінокислотами, виявлено субстанції, для яких характерна виражена антимікробна активність щодо штамів *St. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *Pr. vulgaris* ATCC 4636, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *B. subtilis* ATCC 6633 та *C. albicans* 653/885 ATCC. Такими субстанціями виявились екстракти мучниці звичайної листя з лейцином, валіном та сухий екстракт 3, отриманий 50 % етанолом.

8. Для оцінки гіпоглікемічної активності екстрактів було проведено два експерименти – первинний скринінг і ОТТГ. У проведених експериментах було встановлено, що розроблені екстракти на тлі вуглеводного навантаження знижують постпрандіальний рівень глюкози у крові у щурів порівняно з контрольними тваринами. З огляду на те, що глікемічна крива після перорального навантаження (ОТТГ) і розрахунок площі під кривою (AUC) здатні певною мірою відобразити процеси утилізації глюкози у організмі

експериментальних тварин, можна припустити, що в умовах вуглеводного навантаження саме під дією сухого екстракту з листя мучниці звичайної та екстрактів з додаванням амінокислот інтенсивність поглинання глюкози тканинами зростає. Експериментально було встановлено, що додавання певних амінокислот, зокрема аргініну, цистеїну і глутамінової кислоти до екстракту підвищували у тварин толерантність до вуглеводів.

9. Гіпоглікемічну та гіполіпідемічну активність найбільш перспективних сухих екстрактів з мучниці звичайної листя вивчали на аутобредних самцях щурів на моделі викликаної інсулінорезистентності. Встановлено, що введення сухого екстракту з мучниці звичайної листя, а також модифікованих сухих екстрактів з цистеїном та аргініном проявляє нормалізуючу дію (гіпоглікемічну і гіполіпідемічну) на метаболічні порушення на тлі високофруктозної дієти, тому вони є перспективними агентами для корекції метаболічного синдрому.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Chaika N.B., Koshovyi O.M., Mazen M., Kravchenko G.B., Goryacha O.V., Kireyev I.V., Kovalenko S.M., Darmograi R.E. Research in phytochemical composition and hypoglycemic activity screening of the dry extracts from bearberry leaves. *Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science»*. 2021. № 3 (31). P. 42-50. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2021.235939>. (Scopus).
2. Chaika N., Koshovyi O., Raal A., Kireyev I., Zupanets A., Odyntsova V. Phytochemical profile and pharmacological activity of the dry extract from *Arctostaphylos uva-ursi* leaves modified with phenylalanine. *Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science»*. 2020. № 6 (28). P. 74-78. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2020.222511> (Scopus).
3. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Мазен М., Кравченко А. Б., Ковальова А. М., Кіреєв І. В. Перспективи створення нового лікарського засобу для корекції

- метаболического синдрома на основе БАР мучниці звичайної листя. Український біофармацевтичний журнал. 2021. № 1 (66). С. 46-52. <https://doi.org/10.24959/ubphj.21.305>.
4. Kravchenko, G., Krasilnikova, O., Raal, A., Mazen, M., Chaika, N., Kireyev, I., Grytsyk, A., Koshovyi O. (2022). *Arctostaphylos uva-ursi* L. leaves extract and its modified cysteine preparation for the management of insulin resistance: chemical analysis and bioactivity. Nat. Prod. Bioprospect. 2022. 12. 30. <https://doi.org/10.1007/s13659-022-00352-1>. (Scopus).
 5. Кошовий О. М., Кравченко Г. Б., Красільнікова О. А., Чайка Н. Б., Матар М. Спосіб одержання засобу з гіпоглікемічною та ліпотропною дією з листя мучниці звичайної з додаванням цистеїну: пат. на винахід 124043 Україна, № а 2019 10496; заявл. 21.10.2019; опубл. 07.07.2021; Бюл. № 27. 4.
 6. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Кіреєв І. В., Ільїна Т. В., Бородіна Н. В. Спосіб одержання засобу з діуретичною дією з листя мучниці звичайної та валіну: пат. на винахід 123476 Україна, № а2019 09314; заявл. 15.08.2019; опубл. 07.04.2021; Бюл. № 14. 4.
 7. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Кіреєв І.В., Ільїна Т. В., Бородіна Н. В. Спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу з діуретичною та протизапальною дією з листя мучниці звичайної з валіном: пат. на кор. мод. 141184 Україна, № u2019 9322; заявл. 15.08.2019; опубл. 25.03.2020; Бюл. № 6. 6.
 8. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Кіреєв І. В., Комісаренко М. А., Ковальова А. М. Спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу діуретичної дії з листя мучниці звичайної та гліцину: пат. на кор. мод. 140872 Україна, № u2019 09323; заявл. 15.08.2019; опубл. 10.03.2020; Бюл. № 5, 5.
 9. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Кіреєв І. В., Комісаренко М. А., Ковальова А. М. Спосіб одержання засобу з діуретичною дією з листя мучниці звичайної та гліцину: пат. на винахід 123477 Україна, № а2019

- 09327; заявл. 15.08.2019; опубл. 07.04.2021; Бюл. № 14. 4.
10. Кошовий О. М., Кравченко Г. Б., Красільнікова О. А., Чайка Н. Б., Матар М. Спосіб одержання засобу з гіпоглікемічною та гепатопротекторною дією з листя мучниці звичайної з додаванням аргініну: пат. на кор. мод. 142210 Україна, № u 2019 10482; заявл. 21.10.2019; опубл. 25.05.2020; Бюл. № 10. 4.
 11. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Кіреєв І. В., Зупанець А. А., Комісаренко А. М. Спосіб одержання лікарського засобу з листя мучниці звичайної та фенілаланіну з діуретичною активністю: пат. на винахід 123380 Україна, № a2019 09321; заявл. 15.08.2019; опубл. 24.03.2021; Бюл. № 12. 4.
 12. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Кіреєв І. В., Зупанець А. А., Комісаренко А. М. Спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу з діуретичною дією з листя мучниці звичайної з фенілаланіном: пат. на кор. мод. 140486 Україна, № u2019 09324; заявл. 15.08.2019; опубл. 25.02.2020; Бюл. № 4. 5.
 13. Кошовий О. М., Кравченко Г. Б., Красільнікова О.А., Мазен М., Чайка Н.Б.. Спосіб одержання засобу з гіпоглікемічною та ліпотропною дією з листя мучниці звичайної з додаванням цистеїну: пат. на кор. мод. 142930 Україна, № u2019 10495; заявл. 21.10.2019; опубл. 10.07.2020; Бюл. № 13. 4.
 14. Кошовий О. М., Кравченко Г. Б., Красільнікова О. А., Чайка Н. Б., Мазен М.. Спосіб одержання засобу з гіпоглікемічною та гепатопротекторною дією з листя мучниці звичайної з додаванням аргініну: пат. на винахід 124042 Україна, № a2019 10483; заявл. 21.10.2019; опубл. 07.07.2021; Бюл. № 27. 4.
 15. Chaika N., Koshovyi O., Pina T., Borodina N., Masen M., Kravchenko G. The study of the chemical composition and the hypoglycemic activity of dry extracts from the leaves of bearberry. *Sciences and Practice 2018: the 9th International Pharmaceutical Conference, dedicated to the 100th years anniversary of*

independent Lithuania's pharmacy, Kaunas, Lithuania, 09th November, 2018.
Kaunas, 2018. P. 40.

16. Chaika N. B., Koshovyi O. M., Kireev I. V., Ilina T. V., Kovalyova A. M. The prospects for creation of a new drug based on a modified extract of bearberry leaves. *Chemistry of Natural Compounds: abstracts XIII International Symposium, October 16–19, 2019, Shanghai*. P. 81.
17. Чайка Н.Б., Кошовий О.М., Комісаренко М.А., Кіреєв І.В. Новий модифікований екстракт з діуретичною активністю на основі бар листя мучниці звичайної та валіну. *Сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, м. Івано-Франківськ, Яремче, 12-13 травня 2020 р.* С. 184.

РОЗДІЛ 5

ВИЗНАЧЕННЯ ПАРАМЕТРІВ СТАНДАРТИЗАЦІЇ МУЧНИЦІ ЗВИЧАЙНОЇ ЛИСТЯ ЕКСТРАКТІВ СУХИХ

Найбільш перспективними виявилися сухі екстракти, які були модифіковані цистеїном, фенілаланіном, валіном, гліцином і аргініном, тому і були запропоновані методи їх стандартизації.

У результаті проведених досліджень розроблено проекти МКЯ та згідно з їх вимогами проведено дослідження сухих екстрактів мучниці звичайної листя, які були модифіковані цистеїном, фенілаланіном, валіном, гліцином і аргініном [27-30, 56-61]. Проекти МКЯ на сухі екстракти мучниці звичайної листя розроблено за такими показниками: опис, розчинність, ідентифікація (ТШХ: метод А (гідрохінонпохідні), В (флавоноїди) та С (амінокислоти), втрата в масі під час висушування (не більше 10 %), залишкові кількості органічних розчинників (спирт етиловий не більше 1,0 %), важкі метали (не більше 100 ppm), мікробіологічна чистота, вміст гідрохінонпохідних (менше 5 % у перерахунку на арбутин) та флавоноїдів (не менше 2 % у перерахунку на гіперозид). Усі екстракти відповідали вимогам розробленої документації.

Опис. Мучниці звичайної листя екстракти сухі є аморфними гігроскопічними порошками від світло-коричневого до коричневого кольору з слабким запахом.

Розчинність. Екстракти легко розчиняються у 50 % розчині етанолу, помірно розчинні у 96 % етанолі та воді, дуже мало розчиняються у хлороформі та ефірі. Випробування проводили відповідно до вимог ДФУ 1.4.

Ідентифікація. Метод А. Ідентифікація гідрохінонпохідних. Визначення проводили методом тонкошарової хроматографії (2.2.27) ДФУ.

Випробовуваний розчин. До 0,5 г екстракту мучниці звичайної листя додавали 5 мл суміші рівних об'ємів метанолу *P* і води *P*, нагрівали зі зворотним холодильником протягом 10 хв, одержаний гарячий розчин фільтрували, колбу і фільтр обполіскували сумішшю рівних об'ємів

метанолу P і води P , доводили тією самою сумішшю розчинників до об'єму 5,0 мл.

Розчин порівняння. 25 мг арбутину P розчиняли у метанолі P і доводили об'єм розчину до 10,0 мл тим самим розчином.

Пластинка: ТШХ пластинка із шаром силікагелю.

Рухома фаза: кислота мурашина безводна P – вода P – етилацетат P (6:6:88).

Об'єм проби, що наноситься: 10 мкл, смугами. Відстань, що має пройти рухома фаза: 15 см від лінії старту.

Висушування: при температурі від 100 до 105 °С.

Виявлення: обприскують пластинки розчинами 10 г/л амінопіразолону, 20 г/л калію фериціаніду, проявляють парами аміаку і переглядають у денному світлі.

Результати: у середній частині хроматограми розчину порівняння проявляється помаранчева зона, яка відповідає арбутину (рис. 5.1). На хроматограмі досліджуваного розчину можуть проявлятися також інші флуоресціюючі зони.

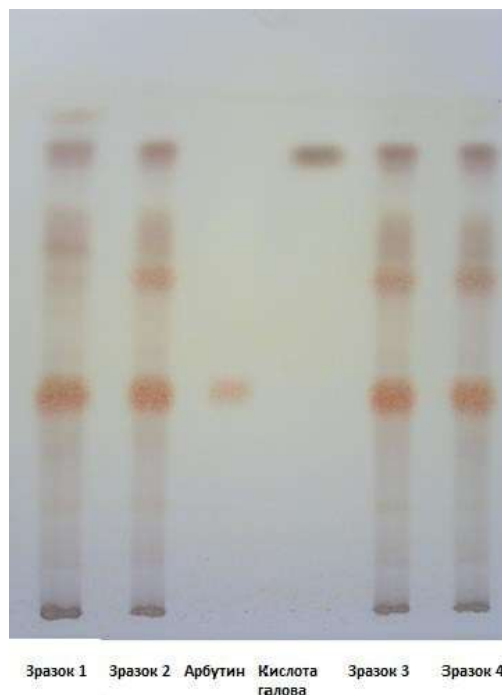


Рис. 5.1 Хроматограма розчинів екстрактів мучниці звичайної листя, арбутину та кислоти галової при перегляді у денному світлі

На хроматограмі (рис. 5.1) при перегляді у денному світлі ідентифікували коричневі зони на рівні зон кислоти галової та помаранчеві плями на рівні зони арбутину.

Таким чином, у екстрактах мучниці звичайної листя було виявлено кислоту галову і арбутин.

Метод В. Ідентифікація флавоноїдів. Визначення проводили методом тонкошарової хроматографії (2.2.27) ДФУ [10].

Випробовуваний розчин. До 0,5 г екстракту мучниці звичайної додавали 10,0 мл метанолу *P*, нагрівали на водяній бані при температурі 60 °С зі зворотним холодильником протягом 10 хв, охолоджували і фільтрували.

Розчин порівняння. 3,0 мг рутину розчиняють у 10,0 мл метанолу *P*.

Пластинка: ТШХ пластинка із шаром силікагелю.

Рухома фаза: етилацетат *P* - вода *P* - кислота мурашина безводна *P* - кислота оцтова безводна *P* (72 : 14 : 7 : 7).

Об'єм проби, що наноситься: 20 мкл, смугами.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 15 см від лінії старту.

Висушування: при температурі від 100 до 105 °С.

Виявлення: обприскують розчином 10 г/л аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти у метанолі *P*. Потім пластинку обприскують розчином 50 г/л макроголу 400 у метанолі *P*, сушать на повітрі протягом 30 хв і переглядають в УФ-світлі при довжині хвилі 365 нм.

Результати: у середній частині хроматограми розчину порівняння проявляється жовто-помаранчева флуоресціююча зона, яка відповідає рутину. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть проявлятися також інші флуоресціюючі зони.

Метод С1, С2. Ідентифікація валіну, цистеїну або фенілаланіну. Визначення проводять методом тонкошарової хроматографії (2.2.27), використовуючи ТШХ пластинки із шаром силікагелю *P*.

Для аналізу валіну, цистеїну або фенілаланіну у відповідних екстрактах

як рухому фазу використовують суміш розчинників кислота оцтова льодяна P - вода P - бутанол P (20:20:60).

Розчин порівняння цистеїну (а). 10 мг ФСЗ цистеїну розчиняють у воді P і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 50,0 мл.

Розчин порівняння валіну (б). 10 мг ФСЗ валіну розчиняють у 0,1 М розчині кислоти хлористоводневої P і доводять об'єм розчину тією самою кислотою до 50,0 мл.

Розчин порівняння фенілаланіну (в). 10 мг ФСЗ фенілаланіну розчиняють у суміші рівних об'ємів кислоти оцтової льодяної P і води P та доводять об'єм розчину тією самою сумішшю розчинників до 50,0 мл.

На лінію старту хроматографічної пластинки наносять 5 мкл випробуваного розчину та 5 мкл розчину порівняння ((в), (г) або (д) в залежності від субстанції). Пластинку сушать на повітрі і поміщають у камеру із системою розчинників: кислота оцтова льодяна P - вода P - бутанол P (20:20:60). Коли фронт розчинників пройде 15 см від лінії старту, пластинку виймають із камери, сушать на повітрі та обприскують розчином нінгідрину P . Пластинку нагрівають при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 15 хв. На хроматограмі випробуваного розчину спостерігається пляма на рівні плями розчину порівняння, яка за кольором і значенням R_f відповідає стандартній речовині.

Метод С3. Ідентифікація аргініну.

Випробовуваний розчин. 0,5 г екстракту мучниці звичайної листя розчиняють у кислоті хлористоводневій розведеної P і доводять об'єм розчину тим же розчинником до 10,0 мл. 1 мл розчину екстракту доводять водою P до об'єму 50,0 мл.

Розчин порівняння. 10 мг ФСЗ аргініну розчиняють у 0,1 М розчині кислоти хлористоводневої P і доводять об'єм розчину тим же розчинником до 50,0 мл.

Пластинка: ТШХ пластинка із шаром силікагелю.

Рухома фаза: етилацетат P - вода P - кислота мурашина безводна P -

кислота оцтова безводна *P* (72:14:7:7). Об'єм проби, що наноситься: випробуваного розчину – 50 мкл, розчину порівняння – 5 мкл, смугами.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 15 см від лінії старту.

Висушування: при температурі від 100 °С до 105 °С.

Виявлення: обприскують розчином нінгідрину *P*, сушать при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 15 хв і переглядають при денному світлі.

Результати: на хроматограмі випробуваного розчину має виявлятися основна пляма на рівні розчину порівняння, відповідна їй за забарвленням.

Метод С4. Ідентифікація гліцину. Визначення проводять методом тонкошарової хроматографії (2.2.27), використовуючи ТШХ пластинки із шаром силікагелю *P*. Для аналізу лізину або гліцину у відповідних екстрактах як рухому фазу використовують аміак концентрований *P* – 2-пропанол *P* (30:70).

Випробовуваний розчин. 1,0 г сухого екстракту мучниці звичайної листя розчиняють у 10,0 мл 96 % етанолу *P* або метанолу *P*, фільтрують через паперовий фільтр, відганяють розчинник і розчиняють у 1,0 мл метанолу *P*.

Розчин порівняння. 25 мг ФСЗ гліцину розчиняють у воді *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10,0 мл.

На лінію старту хроматографічної пластинки наносять 5 мкл випробуваного розчину і 5 мкл розчину порівняння (а або б в залежності від субстанції). Пластинку сушать на повітрі та поміщають у камеру із сумішшю розчинників. Коли фронт розчинників пройде 15 см від лінії старту, пластинку виймають із камери, сушать при температурі від 100 °С до 105 °С до зникнення запаху аміаку та обприскують розчином нінгідрину *P*. Пластинку нагрівають при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 15 хв. На хроматограмі випробуваного розчину виявляється основна інтенсивна зона на рівні плями розчину порівняння.

Випробування:

Втрата в масі при висушуванні. Не більше 10,0 %. Визначення

проводять згідно з ДФУ 2.0 (2.8.17). 0,50 г здрібненого на тонкий порошок екстракту мучниці звичайної листя поміщають у бюкс і сушать у сушильній шафі при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 3 год до постійної маси. Охолоджують у ексикаторі і зважують.

Залишкові кількості органічних розчинників (спирт етиловий).

Вміст етанолу у модифікованому екстракті мучниці звичайної листя не повинен перевищувати 1,0 %.

Близько 1,0 г (точна наважка) екстракту мучниці звичайної листя вносять у мірну колбу ємністю 10,0 мл, розчиняють у 7 мл води, додають 1,0 мл ацетону *P* і 1,2-дихлоретану (внутрішні стандарти), доводять об'єм розчину водою до мітки і перемішують. По 1 мкл отриманого розчину і розчину стандартного зразку етанолу хроматографують на газовому хроматографі з полум'яно-іонізаційним детектором.

Результати аналізу вважаються достовірними, якщо втримуються вимоги тесту «Перевірка придатності хроматографічної системи».

Важкі метали. Для токсикологічної безпеки в усіх видах фітохімічної продукції потрібно контролювати вміст важких металів, за вимогами ДФУ (2.4.8) їх вміст має бути не більше 100 ppm.

Мікробіологічна чистота. Для фітозасобів характерна мікробна забрудненість, тому потрібно контролювати кількість життєздатних бактерій і грибів у екстрактах. Випробування проводять відповідно до вимог ДФУ, 2.6.12, 2.6.13. [10].

Склад нейтралізувальної рідини, що містить 10 % полісорбату-80 та 20 % ізопропілміристату:

полісорбат-80 – 100 г,

ізопропілміристан – 200 г,

лецитин (яєчний) – 3 г,

гістидину гідрохлорид – 1 г,

пептон ферментативний – 1 г,

натрію хлорид – 4,3 г,

калію дигідрофосфат – 3,6 г,
динатрію гідрофосфат дигідрат – 7,2 г,
вода очищена – 1000 мл.

Нормування мікробіологічної чистоти екстракту встановлюють відповідно до вимог ДФУ, 5.1.4, категорія 2. У екстракті допускається загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів: не більше 1000 мікроорганізмів (бактерій і грибів сумарно) в 1 г. Не допускається наявність ентеробактерій і деяких інших грамнегативних бактерій в 1 г. Не допускається наявність *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г. Не допускається наявність *Staphylococcus aureus* в 1 г.

Кількісне визначення: Вміст гідрохінонпохідних у екстрактах мучниці звичайної листя визначали спектрофотометричним методом у перерахунку на арбутин (Розділ 2, п. 7) за ДФУ 2.2.25. Вміст гідрохінонпохідних у перерахунку на арбутин – не менше 5 % (табл. 5.1).

Вміст флавоноїдів у екстрактах мучниці звичайної листя визначали спектрофотометричним методом у перерахунку на гіперозид (Розділ 2, п. 9) за ДФУ 2.2.25. Вміст суми флавоноїдів у перерахунку на гіперозид – не менше 2 % (табл. 5.1).

Таблиця 5.1

Результати аналізу сухих екстрактів мучниці звичайної листя згідно проєкту МКЯ

Показники якості	Допустимі межі	Результати визначення в серіях екстрактів, модифікованих з														
		цистеїном			гліцином			валіном			фенілаланіном			аргініном		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Опис	Аморфний гігроскопічний порошок від світло-коричневого до коричневого кольору зі слабким запахом.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Розчинність																
96 % етанолі	помірно розчинний	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50 % етанолі	легко розчинний	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ефірі	дуже мало розчинний	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
хлороформі	дуже мало розчинний	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
воді	помірно розчинний	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ідентифікація																
Гідрохінон-похідні	Метод А (ТШХ).	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Продовж. табл. 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Кількісне визначення																
Вміст гідрохінон-похідних	не менше 5 %, у перерахунку на арбутин	6,44 ± 0,08	6,32 ± 0,04	6,12 ± 0,03	5,51 ± 0,02	5,54 ± 0,07	5,22 ± 0,05	7,11 ± 0,08	6,87 ± 0,05	7,02 ± 0,04	5,18 ± 0,07	5,64 ± 0,08	5,21 ± 0,06	6,07 ± 0,04	5,64 ± 0,05	5,42 ± 0,08
Вміст флавоноїдів	не менше 2 %, у перерахунку на гіперозид	2,21 ± 0,02	2,32 ± 0,05	2,42 ± 0,03	2,51 ± 0,02	2,44 ± 0,03	2,52 ± 0,03	2,31 ± 0,01	2,30 ± 0,04	2,22 ± 0,03	2,18 ± 0,03	2,24 ± 0,02	2,21 ± 0,03	2,07 ± 0,02	2,04 ± 0,05	2,02 ± 0,03

Примітка. «+» – екстракт відповідає вимогам проєкту МКЯ.

За результатами аналізу можна зробити висновок, що всі серії модифікованих сухих екстрактів мучниці звичайної листя відповідають вимогам розроблених проєктів МКЯ [43, 55].

Висновки до розділу 5

1. Розроблено проєкти МКЯ на модифіковані сухі екстракти мучниці звичайної листя та згідно з їх вимогами проведено дослідження 3-х серій кожного з 5 сухих екстрактів, які було модифіковано цистеїном, гліцином, валіном, фенілаланіном і аргініном.

2. Проєкти МКЯ на сухі екстракти мучниці звичайної розроблено за такими показниками: опис, розчинність, ідентифікація (ТШХ: метод А (гідрокінонпохідні), В (флавоноїди) та С (амінокислоти), втрата в масі під час висушування (не більше 10 %), залишкові кількості органічних розчинників (спирт етиловий не більше 1,0 %), важкі метали (не більше 100 ppm), мікробіологічна чистота, вміст гідрокінонпохідних (менше 5 % у перерахунку на арбутин) і флавоноїдів (не менше 2 % у перерахунку на гіперозид).

3. Одержані стандартизовані екстракти є перспективними субстанціями та будуть використані для розробки лікарських форм нових лікарських засобів з уроантисептичною, діуретичною, гіпоглікемічною та гіполіпідемічною дією.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Комісаренко М. А., Кіреєв І. В., Кравченко Г. Б. Параметри стандартизації модифікованих екстрактів мучниці звичайної листя. Український біофармацевтичний журнал. 2020. № 4 (65). С. 16-23. <https://doi.org/10.24959/ubphj.20.293>.
2. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Мазен М., Кравченко А. Б., Ковальова А. М., Кіреєв І. В. Перспективи створення нового лікарського засобу для корекції

метаболического синдрома на основе БАР мучниці звичайної листя. Український біофармацевтичний журнал. 2021. № 1 (66). С. 46-52. <https://doi.org/10.24959/ubphj.21.305>.

3. Чайка Н.Б., Кошовий О.М., Комісаренко М.А., Кіреєв І.В. Новий модифікований екстракт з діуретичною активністю на основі бар листя мучниці звичайної та валіну. Сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, м. Івано-Франківськ, Яремче, 12-13 травня 2020 р. С. 184
4. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Ільїна Т. В., Бородіна Н. В. Визначення параметрів стандартизації екстрактів з листя мучниці звичайної. Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів: мат. III Міжнар. наук.-практ. конференції. У 2-х т. Т. 2. м. Харків, 14-15 бер. 2019 р. Х.: НФаУ, 2019. С. 303.
5. Chaika N. B., Koshovyi O. M., Kireev I. V., Ilina T. V., Kovalyova A. M. The prospects for creation of a new drug based on a modified extract of bearberry leaves. Chemistry of Natural Compounds: abstracts XIII International Symposium, October 16–19, 2019, Shanghai. P. 81.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено практичне вирішення наукової проблеми, що полягає у одержанні, комплексному фітохімічному та фармакологічному дослідженні нових екстрактів з мучниці звичайної листя для створення нових стандартизованих лікарських засобів з протизапальною, діуретичною, гіпоглікемічною, гіполіпідемічною та пенкреопротекторною активністю.

1. Фітохімічний скринінг основних груп БАР у листі мучниці звичайної показав наявність похідних гідрохінону, фенолкарбонових та гідроксикоричних кислот, кумаринів, флавоноїдів, дубильних речовин та тритерпенових сапонінів. Методом ВЕРХ ідентифіковано 8 речовин фенольної природи, серед яких домінуючими були арбутин, гіперозид та катехін, 8 тритерпенових сапонінів, серед яких домінуючими були урсолова кислота, уваол та лупеол. Методом ГХ-МС досліджено сполуки легкої фракції листя мучниці звичайної. Вміст цих речовин був 14,46 мг/100 г, при цьому було виявлено 42 речовини, з яких тільки 26 вдалося ідентифікувати, основними з яких були октан, камфора, 2,4-декадиеналь, гексадекан, гексагідрофарнезиллацетон, фітол, етилпальмітат, етиллінолеат, 4,8,12,16-тетраметилгептадекан-4-олід, пентакозан, гексакозан, нонакозан, унтриаконтан та тритриаконтан.

2. При виборі оптимального екстрагенту для екстракції БАР з мучниці звичайної листя було отримано п'ять сухих екстрактів з використанням води, 30 %, 50 %, 70 % та 96 % етанолу. В одержаних екстрактах було проведено визначення вмісту основних груп БАР методом ВЕРХ та СФ. Визначено арбутин, 2 фенолкарбонові кислоти, 6 флавоноїдів та 8 сапонінів. Встановлено, що з листя мучниці звичайної водою та 30 % розчином етанолу забезпечується найкраща екстракція гідрохінонпохідних; гідроксикоричні кислоти краще екстрагуються водно-спиртовими розчинами у концентраціях 30-50 %, флавоноїди – у концентраціях 50-70 %. Визначено

оптимальну кратність водної екстракції листя мучниці звичайної, яка ставить два рази. Розроблено дві схеми одержання екстрактів зі значним вмістом арбутину. Фракціонування водного екстракту етилацетатом дозволило отримати сухий екстракт із вмістом арбутину на рівні 19,11 %. При обезжирюванні водного екстракту хлороформом, після очищення на катіоніті КУ2, випарювання та екстракції фенольних сполук етанолом, вдалося отримати субстанцію зі вмістом арбутину на рівні 31,25 %.

3. Для отримання модифікованих сухих екстрактів мучниці звичайної листя було використано 10 амінокислот. Амінокислоти додавали у трикратній еквімолярній кількості до суми фенольних сполук. Новизну розроблених схем одержання найбільш перспективних модифікованих екстрактів підтверджено та захищено 10 патентами України: 5 патентами на винахід , 123380, 123476, 123477, 124042, 124043 та 5 патентами на корисну модель 140872, 140486, 141184, 142210 та 142930.

4. В одержаних модифікованих екстрактах методом ВЕРХ було ідентифіковано 1 фенологлікозид (арбутин), 1 фенолкарбонову кислоту (галову кислоту), 5 флавоноїдів, 4 гідроксикоричні кислоти та встановлено їх кількісний вміст. Серед флавоноїдів домінуючими були гіперозид та катехін, серед гідроксикоричних кислот – кофейна та хлорогенова кислоти. В одержаних екстрактах методом СФ встановлено вміст гідрохінонпохідних сполук, гідроксикоричних кислот, флавоноїдів та суми фенольних сполук. Вміст фенольних сполук у модифікованих екстрактах був нижчий у порівнянні з нативним екстрактом, отриманим 50 % розчином етанолу. Одержані результати використані при розробці проєктів МКЯ на екстракти.

5. Досліджено протизапальну, діуретичну, гіпоглікемічну та гіполіпідемічну активність одержаних модифікованих екстрактів. Сухі екстракти мучниці звичайної листя, модифіковані цистеїном та аргініном, проявляли найбільш виражену нормалізуючу дію на метаболічні порушення на тлі високофруктозної дієти (гіпоглікемічна та гіполіпідемічна дія), тому вони є перспективними агентами для корекції метаболічного синдрому.

Скринінг діуретичної, антимікробної та протизапальної активності сухих модифікованих екстрактів мучниці звичайної листя показав, що найбільш перспективними субстанціями є екстракти з фенілаланіном, валіном та гліцином. Сухі екстракти з листя мучниці звичайної виявили антимікробну активність по відношенню до *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Basillus subtilis* та *Candida albicans*.

6. Найбільш перспективними виявилися екстракти, які були модифіковані цистеїном, фенілаланіном, валіном, гліцином та аргініном, тому були запропоновані методи їх стандартизації. В результаті проведених досліджень розроблено проекти МКЯ та згідно з їх вимогами проведено дослідження одержаних сухих екстрактів. Проекти МКЯ на сухі екстракти мучниці звичайної розроблено за такими показниками: опис, розчинність, ідентифікація (ТШХ: метод А (гідрохінонпохідні), В (флавоноїди) та С (амінокислоти), втрата в масі під час висушування (не більше 10 %), залишкові кількості органічних розчинників (спирт етиловий не більше 1,0 %), важкі метали (не більше 100 ppm), мікробіологічна чистота, вміст гідрохінонпохідних (менше 5 % у перерахунку на арбутин) та флавоноїдів (не менше 2 % у перерахунку на гіперозид). Усі екстракти відповідали вимогам розробленої документації.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Антиоксидантный и прооксидантный эффекты арбутина и гидрохинона в эксперименте *in vitro* / Н. Л. Волобой и др. *Бюллетень сибирской медицины*. 2011. 5. 41-44.
2. Бандюкова В.А. Фенолокислоты растений, их эфиры и гликозиды. *Химия природных соединений*. 1983. № 3. С. 263–272.
3. Башмулин А. Ф. Фармакологическое исследование галеновых и новогаленовых препаратов толокнянки. В кн.: Сборник научных трудов Ленинградского института усовершенствования ветеринарных врачей. Л., 1951. 7. 174.
4. Берхин Е.Б. Методы изучения действия новых химических соединений на функцию почек. *Хим.-фармац. ж.* 1977. № 11 (5). С. 3-11.
5. Бойко Н.Н., Зайцев А. И., Осолодченко Т. П. Скрининг антимикробных свойств спиртоводных вытяжек из некоторых видов растительного сырья содержащего хинонпроизводные. *Annals of Mechnikov Institute*. 4. 2014. 67-72.
6. Волобой Н.Л., Бутакова Л.Ю., Смирнов И.В. Изучение антимикробного действия арбутина и гидрохинона в отношении некоторых представителей грамтрицательной флоры. *Химия растительного сырья*. 2013. №1. 179-182.
7. Волобой Н.Л., Смирнов И.В., Бондарев А.А. Особенности мочегонной активности арбутина и гидрохинона. *Сибирский медицинский журнал*. 2012. 27. 3. 131-134.
8. Гаммерман, А. Ф., Шасс Ю. Схематические карты распространения лекарственных растений СССР. М.-Л., АН СССР, 1954. 138 с.
9. Гринкевич Н.И. Сафронич Л.Н. Химический анализ лекарственных растений. М., 1983. 174 с.
10. Державна Фармакопея України : в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-е вид. – Х. : Державне

підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015.

11. Дослідження динаміки екстрагування біологічно активних речовин з листя мучниці звичайної / Н. Б. Чайка і ін. *Фітотерапія. Часопис*. 2019. № 4. 64-68. <https://doi.org/10.33617/2522-9680-2019-4-64>.
12. Дослідження ізопреноїдного складу та антимікробної активності густого екстракту листя шавлії лікарської / О. М. Кошовий та ін. // *Клінічна фармація*. – 2011. – Т. 15, № 1. – С. 26–29.
13. Дослідження фенольних сполук листя евкаліпта / О.М. Кошовий і ін. *Фармаком*. 2005. № 2/3. С. 151 – 161.
14. Иванов В.В. Фитотерапия в профилактике рецидивов инфекций мочевых путей. *Вестник Бурятского университета*. 2011. 12. 20-23. [113].
15. Иванов В.В., Хитрихеев В.Е. Фитотерапия при остром цистите. *Бюллетень ВСНЦ С) РАМН*. 2010. 3 (73). 72-75.
16. Изучение диуретической активности препаратов на основе цветков календулы лекарственной / В.А. Куркин и др. *Бюллетень сибирской медицины*. 2016. 15. 2. 51–57.
17. Инструкция по сбору толокнянки. Ресурсы дикорастущих лекарственных растений СССР. Л., «Наука», 1968.
18. Китанов Г.М., Генова Е.М., Руменин В.М. Содержание арбутина в *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. из разных районов Народной Республики Болгарии. *Растительные ресурсы*. 1986. № 3. 425-431.
19. Комиссаренко А.Н., Точкова Т.В. Биологически активные вещества листьев *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. *Растительные ресурсы*. 1995. 31. 1. 37-44.
20. Комиссаренко Н. А., Гейдерих А. С., Кошевой О. Н. Биологически активные добавки толокнянки обыкновенной. Функціональні харчові продукти – дієтичні добавки – як дієвий засіб різнопланової профілактики захворювань: матеріали I Міжнар. наук.- практ. конф., 11-12 квіт. 2013 р. Х. : ЕСЕН, 2013. С. 129-130.

21. Комиссаренко Н. А., Кошевой О. Н., Ковалева А. М. Изучение состава летучей фракции листьев *Arctostaphylos uva-ursi*. *Вестник Южно-Казахстанской государственной фармацевтической академии*. 2014. № 3 (68), 4. 43-46.
22. Комісаренко М.А., Гейдеріх А.С., Ковальова А.М., Кошовий О.М. Дослідження фенольних сполук спиртового екстракту листя мучниці звичайної. *Фармаком*. 2012. № 1/2. 50-53.
23. КОМПЕНДИУМ 2019 – лікарські препарати / За ред. В.М. Коваленка. К.: МОРІОН, 2019. 2700 с.
24. Косман В.М., Зенкевич И.Г., Н.Ф. Комиссаренко. Информационное обеспечение для идентификации фенольных соединений растительного происхождения. Кумарины и фурукумарины. *Растительные ресурсы*. 1997. 33. 3. 32.
25. Кошовий О. М. Сучасні підходи до створення лікарських засобів на основі рослин родів Евкалипт та Шавлія : автореф. дис. ... док. фармац. наук : 15.00.02 / НФаУ. Харків, 2013. 41 с.
26. Кошовий О. М., Виноградов Б. А., Ковальова А. М., Комісаренко А. М. Терпеноїдний склад листя деяких видів шавлій України. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2012. № 2. С. 13–18.
27. Кошовий О. М., Кравченко Г. Б., Красільнікова О. А., Чайка Н. Б., Матар М. Спосіб одержання засобу з гіпоглікемічною та ліпотропною дією з листя мучниці звичайної з додаванням цистеїну: пат. на винахід 124043 Україна, № а 2019 10496; заявл. 21.10.2019; опубл. 07.07.2021; Бюл. № 27. 4.
28. Кошовий О. М., Кравченко Г. Б., Красільнікова О. А., Чайка Н. Б., Матар М. Спосіб одержання засобу з гіпоглікемічною та гепатопротекторною дією з листя мучниці звичайної з додаванням аргініну: пат. на кор. мод. 142210 Україна, № и 2019 10482; заявл. 21.10.2019; опубл. 25.05.2020; Бюл. № 10. 4.

29. Кошовий О. М., Кравченко Г. Б., Красільнікова О. А., Чайка Н. Б., Мазен М. Спосіб одержання засобу з гіпоглікемічною та гепатопротекторною дією з листя мучниці звичайної з додаванням аргініну: пат. на винахід 124042 Україна, № а2019 10483; заявл. 21.10.2019; опубл. 07.07.2021; Бюл. № 27. 4.
30. Кошовий О. М., Кравченко Г. Б., Красільнікова О. А., Мазен М., Чайка Н. Б. Спосіб одержання засобу з гіпоглікемічною та ліпотропною дією з листя мучниці звичайної з додаванням цистеїну: пат. на кор. мод. 142930 Україна, № u2019 10495; заявл. 21.10.2019; опубл. 10.07.2020; Бюл. № 13. 4.
31. Кузнецова Н. А., Каляя О. Л. Фотохимия кумаринов. *Успехи химии*. 1992. 61. С. 1243-1268
32. Куркин В. А., Рязанова Т. К., Платонов И. А., Павлова Л. В. Количественное определение арбутина в листьях толокнянки обыкновенной. *Химия растительного сырья*. 2015. № 1. 95-100.
33. Куцик Р. В., Зузук Б. М., Недоступ А. Т., Пецко П. Толокнянка. *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng (Аналитический обзор). *Провизор*. 2003. 18.
34. Лекарственные растения официальной и народной медицины. М.: Изд-во Эскимо. 2005. 800 с.
35. Лекарственные растения. М.: Изд-во Эскимо. 2003. 350 с.
36. Марчишин С. М., Ярошенко Т. Я., Мілян І. І., Наконечна С. С. Вивчення гострої токсичності та фармакологічної активності сухого екстракту трави вероніки лікарської. *Медична та клінічна хімія*. 2015. 17. 4. 96-100.
37. Машковский М. Д. Лекарственные средства: в 2-х т., 16-е изд. М.: Новая волна, 2016. 608 с.
38. Мига М. М. Дослідження фенольних сполук листя нефармакопейних видів роду *Salvia* флори України / М. М. Мига та ін. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2019. № 3. С. 291 – 297. DOI: <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2019.3.184191>.

39. Мондодоев А.Г., Бутуханова И.С., Юндунова О.В., Мархаева Л.Э. Влияние растительного средства на течение экспериментального гломерулонефрита. *Современные проблемы науки и образования*. 2016. 2. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=24361>.
40. Нормативно-директивні документи. Гліцин. Режим доступу: <http://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=2034>.
41. Охрименко Л. П., Калинкина Г. И., Лукша Е. А., Коломиец Н. Э. Исследование фенольных соединений листьев голубики, брусники, толокнянки, черники и зимолубки, произрастающих в республике Саха (Якутия). *Химия растительного сырья*. 2009. 3. 109-115.
42. Паламарчук, А.С., Бондаренко В.Е., Хилькевич П.С. Запасы лекарственных растений в некоторых типах сосновых лесов Гомельской области. *Растит. ресурсы*. 1975. 1. 15-23.
43. Параметри стандартизації модифікованих екстрактів мучниці звичайної листя / Чайка Н. Б. і ін. *Український біофармацевтичний журнал*. 2020. № 4 (65). 16-23. <https://doi.org/10.24959/ubphj.20.293>.
44. Перспективи створення нового лікарського засобу для корекції метаболічного синдрому на основі БАР мучниці звичайної листя / Н. Б. Чайка і ін. *Український біофармацевтичний журнал*. 2021. № 1 (66). 46-52. <https://doi.org/10.24959/ubphj.21.305>.
45. Порівняльне фармакогностичне та фармакологічне дослідження листя *Salvia verticillata* та *Salvia officinalis* для встановлення перспективи створення нового лікарського засобу / М. М. Мига і ін. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2020. № 1 (32). С. 61-71. DOI: <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2020.1.198136>.
46. Розробка метода стандартизації нового лікарського засобу піфламін / А.М. Ковальова і ін. *Фармаком*. 2002. № 2. С. 92-97.
47. Селезнев Н.Г., Потанина О.Г., Селезнев Г.Н. Морфолого-анатомическое изучение урологического сбора. *Фармация*. 2016. 65. 5. 30-33.
48. Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России: 5-е изд. М.:

- АстраФармСервис, 2006. 1632 с.
49. Степанова А.В., Кузьмина С.С., Аньшакова В.В., Соловьева М.И. Антиоксидантные свойства листьев *Arctostaphylos uva-ursi* L. И *Vaccinium vitis-idaea* L. в составе биоконплекса на основе лишайников. *Вестник Северо-Восточного Федерального Университета им. М.К. Аммосова*. 2017. 5. 26-36.
50. Стефанов О. В. Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. рек. К.: Авіцена, 2001. 528 с.
51. Универсальная энциклопедия лекарственных растений / Сост. И. Путьрский, В. Прохоров. Мн.: Книжный Дом; Махаон. 2000. 656 с.
52. Фармацевтична енциклопедія / Голова ред. ради В.П. Черних. 3-тє вид., переробл. і доповн. К.: «МОРІОН», 2016. 1952 с.
53. Фітохімічний профіль і діуретична активність сухих екстрактів із мучниці звичайної листя. Н. Б. Чайка та ін. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2021. Т. 14. № 1 (35). 45-51. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2021.1.226761>.
54. Цеменко К. В. Кіреєв І. В., Комісаренко М. А., Кошовий О. М. Діуретична активність фітосубстанцій із листя брусниці звичайної. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2018. № 3 (28). С. 312–317. DOI: <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2018.3.145276>.
55. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Ільїна Т. В., Бородіна Н. В. Визначення параметрів стандартизації екстрактів з листя мучниці звичайної. *Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів*: мат. III Міжнар. наук.-практ. конференції. У 2-х т. Т. 2. м. Харків, 14-15 бер. 2019 р. Х.: НФаУ, 2019. 303.
56. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Кіреєв І. В., Зупанець А. А., Комісаренко А. М. Спосіб одержання лікарського засобу з листя мучниці звичайної та фенілаланіну з діуретичною активністю: пат. на винахід 123380 Україна, № а2019 09321; заявл. 15.08.2019; опубл. 24.03.2021; Бюл. № 12. 4.

57. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Кіреєв І. В., Зупанець А. А., Комісаренко А. М. Спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу з діуретичною дією з листя мучниці звичайної з фенілаланіном: пат. на кор. мод. 140486 Україна, № u2019 09324; заявл. 15.08.2019; опубл. 25.02.2020; Бюл. № 4. 5.
58. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Кіреєв І. В., Ільїна Т. В., Бородіна Н. В. Спосіб одержання засобу з діуретичною дією з листя мучниці звичайної та валіну: пат. на винахід 123476 Україна, № a2019 09314; заявл. 15.08.2019; опубл. 07.04.2021; Бюл. № 14. 4.
59. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Кіреєв І. В., Комісаренко М. А., Ковальова А. М. Спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу діуретичної дії з листя мучниці звичайної та гліцину: пат. на кор. мод. 140872 Україна, № u2019 09323; заявл. 15.08.2019; опубл. 10.03.2020; Бюл. № 5, 5.
60. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Кіреєв І. В., Комісаренко М. А., Ковальова А. М. Спосіб одержання засобу з діуретичною дією з листя мучниці звичайної та гліцину: пат. на винахід 123477 Україна, № a2019 09327; заявл. 15.08.2019; опубл. 07.04.2021; Бюл. № 14. 4.
61. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Кіреєв І. В., Ільїна Т. В., Бородіна Н. В. Спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу з діуретичною та протизапальною дією з листя мучниці звичайної з валіном: пат. на кор. мод. 141184 Україна, № u2019 9322; заявл. 15.08.2019; опубл. 25.03.2020; Бюл. № 6. 6.
62. Чайка Н.Б., Голембіовська О.І., Кошовий О.М. Дослідження сапонінового складу листя мучниці. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів*: Матеріали VII науково-практичної конференції з міжнародною участю (27 - 28 вересня 2018 р.). Тернопіль: ТДМУ «Укрмедкнига», 2018. 50-51.
63. Чайка Н.Б., Кошовий О.М., Комісаренко М.А., Кіреєв І.В. Новий модифікований екстракт з діуретичною активністю на основі бар листя мучниці звичайної та валіну. *Сучасні напрямки удосконалення*

фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, м. Івано-Франківськ, Яремче, 12-13 травня 2020 р. 184.

64. Чайка Н.Б., Рааль А., Кошовий О.М., Кіресєв І.В. Визначення оптимального екстрагента для екстракції БАР з листя мучниці звичайної. *Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку*: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, м. Харків, 19 вересня 2019 р. Х.: НФаУ, 2019. Том. 1, 294-296.
65. Черногород Л. Б., Виноградов Б. А. Эфирные масла некоторых видов рода *Achillea* L., содержащие фразгранол. *Растит. ресурсы*. 2006. Т. 42, 2. С. 61–68.
66. Чопик, В. И., Дудченко Л. Г., Краснова А. Н. Дикорастущие полезные растения Украины. Київ: Наукова думка, 1983. 400 с.
67. Экстрагирование антиоксидантов из листьев толокнянки (*Arctostaphylos adans*) в электрическом поле / Н.И. Белая и др. *Химико-фармацевтический журнал*. 2006. 40. 9. 40-42.
68. Яковлев А.М., Ивашев М.Н., Циколия Э.М. Взаимодействие ребамипида и урсосана. *Международный журнал экспериментального образования*. 2006. 11. 120-121.
69. A single extraction step in the quantitative analysis of arbutin in bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) leaves by high-performance liquid chromatography / I. Parejo et al. *Phytochem Anal.* 2001. № 12(5). 336-339.
70. Zagayko A.L., Modification of the method of modeling experimental insulin resistance in rats: Inform. Letter № 86-2015. (Ukrmedpatentinform about innovations in the health care system, Kyiv, 2015).
71. Action of tyrosinase on alpha and beta-arbutin: A kinetic study / A. Garcia-Jimenez et al. *Plos one*. 2017. 12. 5.
72. Ali I., Wani WA., Haque A., Saleem K. Glutamic acid and its derivatives: candidates for rational design of anticancer drugs. *Future Med Chem.* 2013. 5

- (8). 961-78. doi: 10.4155/fmc.13.62.
73. Amarowicz R., Pegg R.B., Kosińska A. Chromatographic separation of tannin fractions from a bearberry-leaf (*Arctostaphylos uva-ursi* L. Sprengel) extract by HPLC – a short report. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 2008. 58. 4. 485-490.
74. Arbutin attenuates behavioral impairment and oxidative stress in an animal model of Parkinson's disease. M. Dadgar et al. *Avicenna Journal of Phytomed.* 2018. 8. 6. 533-542.
75. Arbutin Attenuates Isoproterenol-Induced Cardiac Hypertrophy by Inhibiting TLR-4/NF- κ B Pathway in Mice. N. Nalban et al. *Cardiovasc Toxicol.* 2020. 20(3). 235-248. doi: 10.1007/s12012-019-09548-3.
76. Arbutin reduces cognitive deficit and oxidative stress in animal model of Alzheimer's disease. Z. Dastan et al. *Int J Neurosci.* 2019. 129(11). 1145-1153. doi: 10.1080/00207454.2019.1638376.
77. *Arctostaphylos uva-ursi* L. leaves extract and its modified cysteine preparation for the management of insulin resistance: chemical analysis and bioactivity / G. Kravchenko et al. *Nat. Prod. Bioprospect.* 2022. 12. 30. <https://doi.org/10.1007/s13659-022-00352-1>.
78. Arunkumar E. A., Sushil K. J. L-Cysteine supplementation increases insulin sensitivity mediated by upregulation of GSH and adiponectin in high glucose treated 3T3-L1 adipocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2017. 630. 54-65. doi: 10.1016/j.abb.2017.07.016.
79. Azhunova T.A., Sambueva Z.G., Nikolaev S.M. Bile-expelling effect of *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) extract. *Farmatsiia.* 1988. № 37(2). 41-43.
80. Azzam MMM, Dong XY, Dai L, Zou XT. Effect of excess dietary L-valine on laying hen performance, egg quality, serum free amino acids, immune function and antioxidant enzyme activity. *Br Poult Sci.* 2015. 56 (1). 72-8. doi: 10.1080/00071668.2014.989487.
81. Beaux D., Fleurentin J., Mortier F. Effect of extracts of *Orthosiphon stamineus* Benth, *Hieracium pilosella* L., *Sambucus nigra* L. and *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. in rats. *Phytother Res.* 1999. № 13 (3). 222-225.

82. Böger R.H. The pharmacodynamics of L-arginine. *J Nutr.* 2007. 137 (6, 2). 1650-1655. doi: 10.1093/jn/137.6.1650S.
83. Bondarenko V.H., Kanivska I.Y., Paramonova S.M. Probability Theory and Mathematical Statistics. Part 1, NTUU "KPI", Kiiiv, 2006. Ukraine.
84. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978. 52. 302-10. doi: 10.1016/s0076-6879(78)52032-6.
85. Cen J. H., Xia R. X. High-performance liquid chromatographic analysis of bioactive triterpenes in *Perilla frutescens*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003. № 32. P. 1175–1179.
86. Chaika N. B., Koshovyi O. M., Kireev I. V., Ilina T. V., Kovalyova A. M. The prospects for creation of a new drug based on a modified extract of bearberry leaves. *Chemistry of Natural Compounds: abstracts XIII International Symposium, October 16–19, 2019, Shanghai.* 81.
87. Chaika N., Koshovyi O., Ilina T., Borodina N., Masen M., Kravchenko G. The study of the chemical composition and the hypoglycemic activity of dry extracts from the leaves of bearberry. *Sciences and Practice 2018: the 9th International Pharmaceutical Conference, dedicated to the 100th years anniversary of independent Lithuania's pharmacy, Kaunas, Lithuania, 09th November, 2018.* Kaunas, 2018. 40.
88. Chukarina E.V., Vlasov A.M., Eller K.I. Quantitative determination of arbutin and hydroquinone in leaves of *Arctostaphylos*, *Vaccinium vitis-idaea*, and the plant preparations. *Voprosy Pitaniia.* 2007. 76. № 3. 82-87.
89. De Arriba SG, Naser B, Nolte KU. Risk assessment of free hydroquinone derived from *Arctostaphylos Uva-ursi* folium herbal preparations. *Int J Toxicol.* 2013. 32(6). 442-53. doi: 10.1177/1091581813507721.
90. De Olivera D.T., Soursa-Silva E., Scand T. Gingival Vein Punction: A New Simple Technique for Drug Administration or Blood Sampling in Rats and Mice. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science.* 2009, 36 (2), 109-113.
91. Dobrochaeva D.N.; Kotox M.I.; Prokudin Y.N.; Barbarich A.I. Key to Higher Plants of Ukraine, 2nd ed.; Science Dumka: Kiev, Ukraine, 1999.

92. Dombrowicz E., Zadernowski R., Swiatek L. Phenolic acids in leaves of *Arctostaphylos uva ursi* L., *Vaccinium vitis idaea* L. and *Vaccinium myrtillus* L. *Die Pharmazie*. 1991. 46. № 9. 680-681.
93. Dykes G.A., Amarowicz R., Pegg R.B. Enhancement of nisin antibacterial activity by a bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) leaf extract. *Food Microbiology*. 2003. 20. 2. 211-216.
94. Eguchi N.; Vaziri N.D.; Dafoe D.C.; Ichii H. The Role of Oxidative Stress in Pancreatic β Cell Dysfunction in Diabetes. *Int. J. Mol. Sci.* 2021. 22, 1509. DOI: 10.3390/ijms22041509.
95. Enhanced biosynthesis of arbutin by engineering shikimate pathway in *Pseudomonas chlororaphis* P3 / S. Wang et al. *Microbial Cell Factories*. 2018. 17:174 <https://doi.org/10.1186/s12934-018-1022-8>.
96. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes. Strasbourg, March 18, 1986. Official translation. 11 p.
97. Evaluation of anti-obesity and lipid-lowering properties of *Vaccinium myrtillus* leaves powder extract in a hamster model / A. L. Zagayko et al. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*. 2018. 29 (6). 697-703.
98. Garattini S. Glutamic acid, twenty years later. *J Nutr.* 2000. 130. 901S-9S. doi: 10.1093/jn/130.4.901S.
99. Gawłowska J. *Arctostaphylos uva-ursi* L. *Ochrona przyrody*. 1964. 30. 302.
100. Glucose area under the curve during oral glucose tolerance test as an index of glucose intolerance / K. Sakaguchi et al. *Diabetology International*. 2016, 7(1), 53-58. doi:10.1007/s13340-015-0212-4.
101. Gohari AR, Saeidnia S. The role of herbal medicines in treatment of urinary tract diseases. *Journal of Nephro pharmacology*. 2014. 3. № 1. 13–14.
102. Hafeman DG, Sunde RA, Hoekstra WG. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. *J Nutr.* 1974. 104(5). 580-7. doi: 10.1093/jn/104.5.580.
103. Heinrich M., Barnes J., Gibbons S., Williamson E.M. Fundamentals of

- pharmacognosy and phytotherapy. - second edition. Elsevier Ltd., 2012. 326 p.
104. High diversity of ectomycorrhizal fungi associated with *Arctostaphylos uva-ursi* in subalpine and alpine zones: Potential inoculum for afforestation / D. Krpata et al. *Forest Ecology and Management*. 2007. 250. 3. 167-175.
105. Holecek M. Histidine in Health and Disease: Metabolism, Physiological Importance, and Use as a Supplement. *Nutrients*. 2020. 12(3). 848. doi: 10.3390/nu12030848.
106. Investigation of the pro-apoptotic effects of arbutin and its acetylated derivative on murine melanoma cells / L. Jiang et al. *Int J Mol Med*. 2018. 41(2). 1048-1054. doi: 10.3892/ijmm.2017.3256.
107. Jahodár L. Výzkum medvedice léčivé. Nase léčivé rostliny. 1987. 2. 45-46.
108. Jahodár L., Grygarová V., Budésinský M. Triterpenoids of *Arctostaphylos uva-ursi* roots. *Pharmazie*. 1988. 43, 6. 442-443.
109. Jahodár L., Leifertová I., Lisá M. Investigation of iridoid substances in *Arctostaphylos uva-ursi*. *Pharmazie*. 1978. 33, 8. 536-537.
110. JNK1 ablation improves pancreatic β -cell mass and function in db/db diabetic mice without affecting insulin sensitivity and adipose tissue inflammation / A Mazzoli et al. *FASEB Bioadv*. 2020. 3(2), 94-107. DOI: 10.1096/fba.2020-00081.
111. Kawai T., Terai T., Katai V. Study of triterpenoids of *Ericaceae* by thin layer chromatography. *Rikohen*. 1974. 19. 1. 1-5.
112. Kravchenko G., Mazen M., Krasilnikova O. Screening of Bearberry leaves extracts hypoglycemic effect and study of acute toxicity. *Український біофармацевтичний журнал*. 2018. 2 (55). 13-16. doi:10.24959/ubphj.18.173.
113. Lapach, S.M., Chubenko, A.V., Babich, P.M. Statistical methods in biomedical research using Exel. MORION, Kiiiv, 2000. Ukraine. (in Ukrainian).
114. L-Cysteine metabolism and its nutritional implications / Jie Yin et al., *Mol Nutr Food Res*. 2016. 60 (1). 134-46. doi: 10.1002/mnfr.201500031.
115. Lee HJ, Kim KW. Anti-inflammatory effects of arbutin in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells. *Inflamm Res*. 2012. 61(8). 817-25. doi:

- 10.1007/s00011-012-0474-2.
116. Leng G. Determination of oleanolic acid and ursolic acid in different parts of *Mesona Chinensis* Benth by RP–HPLC. *Chin. J. Spectrosc. Lab.* 2011. № 28. P. 2111–2114.
117. Linderborg K., Laaksonen O., Kallio H., Yang B. Flavonoids, sugars and fruit acids of alpine bearberry (*Arctostaphylos alpina*) from Finnish Lapland. *Food Research International*. 2011. 44. 2027–2033.
118. Malterud K. E. The nonpolar components of *Arctostaphylos uva-ursi* leaves. *Med. Nor. Farm.* 1980. 42. № 1. 15–20.
119. Matsuda H., Tanaka T., Kubo M. Pharmacological studies on leaf of *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. III. Combined effect of arbutin and indomethacin on immuno-inflammation. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*. 1991. 111, 4-5. 253-258.
120. Matthews D E. An overview of phenylalanine and tyrosine kinetics in humans. *J Nutr.* 2007. 137 (6,1). 1549-1555; discussion 1573-1575. doi: 10.1093/jn/137.6.1549S.
121. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969. 244(22). 6049-55.
122. Miller G.L. Protein determination for large numbers of samples. *Analytical Chemistry*. 1959. 31 (5). 964-966.
123. Moron MS, Depierre JW, Mannervik B. Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione S-transferase activities in rat lung and liver. *Biochim Biophys Acta*. 1979. 582(1). 67-78. doi: 10.1016/0304-4165(79)90289-7.
124. Mühlmann O., Göbl F. Mycorrhiza of the host-specific *Lactarius deterrimus* on the roots of *Picea abies* and *Arctostaphylos uva-ursi*. *Mycorrhiza*. 2006. 16. № 4. 245-250.
125. Omnia A., Ehsan B, Hanan H. Z. Antiatherogenic Effect of L-Arginine in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Indian Journal of Public Health Research & Development*. 2019. 10 (12). 4148-4154.
126. Parejo I., Viladomat F., Bastida J., Codina C. A Single Extraction Step in the

- Quantitative Analysis of Arbutin in Bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) Leaves by High-Performance Liquid Chromatography. *Phytochem. Anal.* 2001. 12. 336–339; doi: 10.1002/pca.602.
127. Parejo I., Viladomat F., Bastida J., Codina C. Variation of the Arbutin content in different wild populations of *Arctostaphylos uva-ursi* in Catalonia, Spain. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal plants.* 2002. 9. 4. 329-333.
128. Pathological Mechanisms in Diabetes of the Exocrine Pancreas: What's Known and What's to Know / Q. Wei et al. *Front. Physiol.* 2020. 28(11). 570276. DOI: 10.3389/fphys.2020.570276.
129. Pentacyclic Triterpene Distribution in Various Plants – Rich Sources for a New Group of Multi-Potent Plant Extracts / S. Jäger et al. *Molecules.* 2009. 14(6). 2016-2031.
130. Perkowski MC, Warpeha KM. Phenylalanine roles in the seed-to-seedling stage: Not just an amino acid. *Plant Sci.* 2019. 110223. doi: 10.1016/j.plantsci.2019.110223.
131. Phytochemical and Psychotropic Research of Motherwort (*Leonurus cardiaca* L.) Modified Dry Extracts. / O. Koshovyi et al. *Plants.* 2021. 10. 230. <https://doi.org/10.3390/plants10020230>.
132. Phytochemical profile and pharmacological activity of the dry extract from *Arctostaphylos uva-ursi* leaves modified with phenylalanine / N. Chaika et al. *Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science».* 2020. № 6 (28). 74-78. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2020.222511>.
133. Phytochemical study of the dry extract from bilberry leaves / O. M. Koshovyi et al. *Azerbaijan Pharmaceutical and Pharmacotherapy Journal.* 2016. 16 (1). 18-23.
134. Polozova A.V., Chayka N.B., Koshovyi O.M. Research in biological active substances of the bearberry leaves extract, which was obtained with 50 % ethanol. *Topical issues of new drugs development: Abstracts of XXIV International Scientific And Practical Conference of Young Scientists and Students (April 20, 2017).* Vol. 1. Kh.: Publishing office NUPh, 2017. 117.

135. Products of thiocyanate peroxidation: properties and reaction mechanisms / J. Tenovuo et al. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1986. 870(3). 377-84. DOI: 10.1016/0167-4838(86)90244-x.
136. Proliac A. Triterpens *Arctostaphylos uva-ursi*. *Plant.med. et phytother.* 1973. - Vol.14, №3. -P.155-158
137. Protective effect of grape seed and skin extract against high-fat diet-induced liver steatosis and zinc depletion in rat / K. Charradi et al. *Digestive Diseases and Sciences*. 2014. 59. 8. 1768-1778.
138. Protective effects of aqueous extract of *Baillonella toxisperma* stem bark on dexamethasone-induced insulin resistance in rats / M.T. Wego et al. *Adv Pharmacol Pharmaceut Sci*. 2019. 1-6.
139. R.J. Peg Determination of conjugated dienes and trienes. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. (John Wiley & Sons: New York, D2.1.1–D2.1.3, 2001).
140. Radulović N., Blagojević P., Palić R. Comparative Study of the Leaf Volatiles of *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. And *Vaccinium vitis-idaea* L. (Ericaceae). *Molecules*. 2010. 15. 6168-6185; doi:10.3390/molecules15096168.
141. Recasens J., Ninot P., Cristóbal R., Aymerich P. Sustainable Wild Harvesting of *Arctostaphylos uva-ursi* in the Pyrenees as a Conservation Practice. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*. 2008. 14. 1–2. 11-12.
142. Reducing antibiotic use for uncomplicated urinary tract infection in general practice by treatment with uva-ursi (REGATTA) – a double-blind, randomized, controlled comparative effectiveness trial // Kambiz Afshar et al. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2018.
143. Regulation of GLUT4 translocation in an *in vitro* cell model using postprandial human serum ex vivo / K. E. Cogan et al. *Experimental Physiology*. 2019. 104. 800–807. doi: 10.1113/EP087356.
144. Relationship between oxidative stress, ER stress, and inflammation in type 2 diabetes: the battle continues / E.Burgos-Morón et al. *Journal of Clinical Medicine*. 2019. 8(9). 1385. DOI: 10.3390/jcm8091385.

145. Research in phytochemical composition and hypoglycemic activity screening of the dry extracts from bearberry leaves / N.B. Chaika et al. *Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science»*. 2021. № 3 (31). 42-50. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2021.235939>.
146. Research in the chemical composition of the bark of *Sorbus aucuparia*. / E. Krivoruchko et al. *Ceska a Slovenska Farmacie*. 2018. 67(3). 113-115.
147. Romas K., Polovko N., Vyshnevskaya L., Shmalko. A. The Investigation of the Stability of the Granules Based on Arginine and Tincture of Ginseng. *Journal of Global Pharma Technology*. 2020. 12 (2). 108-114.
148. Saponins of the extracts of *Galium aparine* and *Galium verum* / I. L. Shynkovenk et al. *News of Pharmacy*. 2018. № 4 (96). P. 16-23; <https://doi.org/10.24959/nphj.18.2225>.
149. Screening of selected food and medicinal plant extracts for pancreatic lipase Inhibition / P. Slanc et al. *Phytother. Res*. 2009. 23. 6. 874-877.
150. Srinivasan V., Radhakrishnan S., Angayarkanni N., Sulochana K.N. Antidiabetic effect of free amino acids supplementation in human visceral adipocytes through adiponectin-dependent mechanism. *Indian Journal of Medical Research*. 2019. 149 (1). 41–46. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_1782_16.
151. Standardization parameters of modified extracts from *Leonurus cardiaca* herb / Ye. Romanenko et al. *Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science»*. 2019. №1 (17). 17-23.
152. Ștefănescu BE, Szabo K, Mocan A, Crișan G. Phenolic Compounds from Five *Ericaceae* Species Leaves and Their Related Bioavailability and Health Benefits. *Molecules*. 2019. 24(11). 2046. doi: 10.3390/molecules24112046.
153. Strasser B., Sperner-Unterweger B., Fuchs D., Gostner JM. Mechanisms of Inflammation-Associated Depression: Immune Influences on Tryptophan and Phenylalanine Metabolisms. *Curr Top Behav Neurosci*. 2017. 31. 95-115. doi: 10.1007/7854_2016_23.
154. Synthesis of arbutin-gold nanoparticle complexes and their enhanced performance for whitening. / J. Park et al. *Arch Pharm Res*. 2019. 42(11). 977-

989. doi: 10.1007/s12272-019-01164-7.
155. The combined effect of metformin and l-cysteine on inflammation, oxidative stress and insulin resistance in streptozotocin-induced type 2 diabetes in rats / Z. K. Salman et al. *European Journal of Pharmacology*. 2013. 714 (1-3). 448-455. DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.07.002.
156. The phytochemical and chemotaxonomic study of *Salvia* spp. growing in Ukraine / O Koshovyi et al. *J Appl Biol Biotech*. 2020. 8 (03). 29–36. DOI: 10.7324/JABB.2020.80306.
157. Urinary excretion and metabolism of arbutin after oral administration of *Arctostaphylos uvae ursi* extract as film-coated tablets and aqueous solution in healthy humans/ G. Schindler et al. *J Clin Pharmacol*. 2002. № 42(8). 920-927.
158. Vinakova A.E., Chayka N.B., Koshovyi O.M. Research of the dry alcoholic extract from bearberry leaves. *Topical issues of new drugs development: Abstracts of XXIV International Scientific And Practical Conference of Young Scientists and Students* (April 20, 2017). Vol. 1. Kh.: Publishing office NUPh, 2017. 140.
159. Visek W.J. Arginine needs, physiological state and usual diets. A reevaluation. *J Nutr*. 1986. 116 (1). 36-46. doi: 10.1093/jn/116.1.36.
160. Wahler Ch., Schonert I., Friedrich H. Zur Kenntnis der Gerbstoffs der Barentraubenblätter (*Arctostaphylos uva-ursi* L.). *Pharmazie*. 1974. 29. 9. 616-617.
161. Wahner C., Schonert J., Friedrich H. Knowledge of the tannin contained in leaves of the bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi* L.). *Pharmazie*. 1974. №29(9). 616-617.
162. Win S., Than T. A., Kaplowitz N. The Regulation of JNK Signaling Pathways in Cell Death through the Interplay with Mitochondrial SAB and Upstream Post-Translational Effects. *Int J Mol Sci*. 2018. 19(11). 3657. DOI: 10.3390/ijms19113657.
163. Wu G., Morris S.M. Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J*. 1998. 336 (1). 1-17. doi: 10.1042/bj3360001.

164. Yarnell E. Botanical medicines for the urinary tract. *World Journal of Urology*. 2002. 20. 5. 285-293.
165. Zagayko A.L., Kravchenko G.B., Fylymonenko V.P., Krasilnikova O.A. Effect of apple polyphenol concentrate on lipid metabolism in rats under experimental insulin resistance. *Wiadomosci Lekarskie*. 2017. LXX. 2. 200-204.
166. Zhou H, Zhao J, Li A, Reetz MT. Chemical and Biocatalytic Routes to Arbutin. *Molecules*. 2019. 24(18). 3303. doi: 10.3390/molecules24183303.

ДОДАТКИ

Додаток А

Список публікацій здобувача за темою дисертаційної роботи

1. Чайка Н. Б., Комісаренко М. А., Кошовий О. М., Ковальова А. М., Бородіна Н. В. Дослідження динаміки екстрагування біологічно активних речовин з листя мучниці звичайної. *Фітотерапія. Часопис*. 2019. № 4. С. 64-68. <https://doi.org/10.33617/2522-9680-2019-4-64>.
2. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Комісаренко М. А., Кіреєв І. В., Кравченко Г. Б. Параметри стандартизації модифікованих екстрактів мучниці звичайної листя. *Український біофармацевтичний журнал*. 2020. № 4 (65). С. 16-23. <https://doi.org/10.24959/ubphj.20.293>.
3. Chaika N., Koshovyi O., Raal A., Kireyev I., Zupanets A., Odyntsova V. Phytochemical profile and pharmacological activity of the dry extract from *Arctostaphylos uva-ursi* leaves modified with phenylalanine. *Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science»*. 2020. № 6 (28). P. 74-78. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2020.222511> (Scopus).
4. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Комісаренко М. А., Бородіна Н. В., Кіреєв І. В. Фітохімічний профіль і діуретична активність сухих екстрактів із мучниці звичайної листя. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2021. Т. 14. № 1 (35). С. 45-51. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2021.1.226761>.
5. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Мазен М., Кравченко А. Б., Ковальова А. М., Кіреєв І. В. Перспективи створення нового лікарського засобу для корекції метаболічного синдрому на основі БАР мучниці звичайної листя. *Український біофармацевтичний журнал*. 2021. № 1 (66). С. 46-52. <https://doi.org/10.24959/ubphj.21.305>.
6. Chaika N.B., Koshovyi O.M., Mazen M., Kravchenko G.B., Goryacha O.V., Kireyev I.V., Kovalenko S.M., Darmograi R.E. Research in phytochemical composition and hypoglycemic activity screening of the dry extracts from bearberry leaves. *Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science»*. 2021. № 3 (31). P. 42-50. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2021.235939>.

(Scopus).

7. Kravchenko, G., Krasilnikova, O., Raal, A., Mazen, M., Chaika, N., Kireyev, I., Grytsyk, A., Koshovyi O. (2022). *Arctostaphylos uva-ursi* L. leaves extract and its modified cysteine preparation for the management of insulin resistance: chemical analysis and bioactivity. *Nat. Prod. Bioprospect.* 2022. 12. 30. <https://doi.org/10.1007/s13659-022-00352-1>. **(Scopus)**.
8. Кошовий О. М., Кравченко Г. Б., Красільнікова О. А., Чайка Н. Б., Матар М. Спосіб одержання засобу з гіпоглікемічною та ліпотропною дією з листя мучниці звичайної з додаванням цистеїну: пат. на винахід 124043 Україна, № а 2019 10496; заявл. 21.10.2019; опубл. 07.07.2021; Бюл. № 27. 4.
9. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Кіреєв І. В., Ільїна Т. В., Бородіна Н. В. Спосіб одержання засобу з діуретичною дією з листя мучниці звичайної та валіну: пат. на винахід 123476 Україна, № а2019 09314; заявл. 15.08.2019; опубл. 07.04.2021; Бюл. № 14. 4.
10. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Кіреєв І.В., Ільїна Т. В., Бородіна Н. В. Спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу з діуретичною та протизапальною дією з листя мучниці звичайної з валіном: пат. на кор. мод. 141184 Україна, № u2019 9322; заявл. 15.08.2019; опубл. 25.03.2020; Бюл. № 6. 6.
11. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Кіреєв І. В., Комісаренко М. А., Ковальова А. М. Спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу діуретичної дії з листя мучниці звичайної та гліцину: пат. на кор. мод. 140872 Україна, № u2019 09323; заявл. 15.08.2019; опубл. 10.03.2020; Бюл. № 5, 5.
12. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Кіреєв І. В., Комісаренко М. А., Ковальова А. М. Спосіб одержання засобу з діуретичною дією з листя мучниці звичайної та гліцину: пат. на винахід 123477 Україна, № а2019 09327; заявл. 15.08.2019; опубл. 07.04.2021; Бюл. № 14. 4.
13. Кошовий О. М., Кравченко Г. Б., Красільнікова О. А., Чайка Н. Б., Матар

- М. Спосіб одержання засобу з гіпоглікемічною та гепатопротекторною дією з листя мучниці звичайної з додаванням аргініну: пат. на кор. мод. 142210 Україна, № u 2019 10482; заявл. 21.10.2019; опубл. 25.05.2020; Бюл. № 10. 4.
14. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Кіреєв І. В., Зупанець А. А., Комісаренко А. М. Спосіб одержання лікарського засобу з листя мучниці звичайної та фенілаланіну з діуретичною активністю: пат. на винахід 123380 Україна, № a2019 09321; заявл. 15.08.2019; опубл. 24.03.2021; Бюл. № 12. 4.
15. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Кіреєв І. В., Зупанець А. А., Комісаренко А. М. Спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу з діуретичною дією з листя мучниці звичайної з фенілаланіном: пат. на кор. мод. 140486 Україна, № u2019 09324; заявл. 15.08.2019; опубл. 25.02.2020; Бюл. № 4. 5.
16. Кошовий О. М., Кравченко Г. Б., Красільнікова О.А., Мазен М., Чайка Н.Б.. Спосіб одержання засобу з гіпоглікемічною та ліпотропною дією з листя мучниці звичайної з додаванням цистеїну: пат. на кор. мод. 142930 Україна, № u2019 10495; заявл. 21.10.2019; опубл. 10.07.2020; Бюл. № 13. 4.
17. Кошовий О. М., Кравченко Г. Б., Красільнікова О. А., Чайка Н. Б., Мазен М.. Спосіб одержання засобу з гіпоглікемічною та гепатопротекторною дією з листя мучниці звичайної з додаванням аргініну: пат. на винахід 124042 Україна, № a2019 10483; заявл. 21.10.2019; опубл. 07.07.2021; Бюл. № 27. 4.
18. Vinakova A.E., Chayka N.B., Koshovyi O.M. Research of the dry alcoholic extract from bearberry leaves. *Topical issues of new drugs development: Abstracts of XXIV International Scientific And Practical Conference of Young Scientists and Students (April 20, 2017)*. Vol. 1. Kh.: Publishing office NUPh, 2017. P. 140.
19. Polozova A.V., Chayka N.B., Koshovyi O.M. Research in biological active

- substances of the bearberry leaves extract, which was obtained with 50 % ethanol. *Topical issues of new drugs development: Abstracts of XXIV International Scientific And Practical Conference of Young Scientists and Students* (April 20, 2017). Vol. 1. Kh.: Publishing office NUPh, 2017. P. 117.
20. Chaika N., Koshovyi O., Ilina T., Borodina N., Masen M., Kravchenko G. The study of the chemical composition and the hypoglycemic activity of dry extracts from the leaves of bearberry. *Sciences and Practice 2018: the 9th International Pharmaceutical Conference, dedicated to the 100th years anniversary of independent Lithuania's pharmacy, Kaunas, Lithuania, 09th November, 2018. Kaunas, 2018. P. 40.*
21. Чайка Н.Б., Голембіовська О.І., Кошовий О.М. Дослідження сапонінового складу листя мучниці. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів: Матеріали VII науково-практичної конференції з міжнародною участю (27 - 28 вересня 2018 р.)*. Тернопіль: ТДМУ «Укрмедкнига», 2018. С. 50-51.
22. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Ільїна Т. В., Бородіна Н. В. Визначення параметрів стандартизації екстрактів з листя мучниці звичайної. *Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів: мат. III Міжнар. наук.-практ. конференції. У 2-х т. Т. 2. м. Харків, 14-15 бер. 2019 р. Х.: НФаУ, 2019. С. 303.*
23. Chaika N. B., Koshovyi O. M., Kireev I. V., Ilina T. V., Kovalyova A. M. The prospects for creation of a new drug based on a modified extract of bearberry leaves. *Chemistry of Natural Compounds: abstracts XIII International Symposium, October 16–19, 2019, Shanghai. P. 81.*
24. Чайка Н.Б., Рааль А., Кошовий О.М., Кіреєв І.В. Визначення оптимального екстрагента для екстракції БАР з листя мучниці звичайної. *Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, м. Харків, 19 вересня 2019 р. Х.: НФаУ, 2019. Том. 1, С. 294-296.*
25. Чайка Н.Б., Кошовий О.М., Комісаренко М.А., Кіреєв І.В. Новий

модифікований екстракт з діуретичною активністю на основі бар листя мучниці звичайної та валіну. *Сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, м. Івано-Франківськ, Яремче, 12-13 травня 2020 р. С. 184*

Chaika, Natalia

National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine [Show all author info](#)
57221437218 [Connect to ORCID](#)

[Edit profile](#) [Set alert](#) [Save to list](#) [Potential author matches](#) [Export to SciVal](#)

Metrics overview

3 Documents by author
8 Citations by 6 documents
2 h-Index: [View h-graph](#)

Document & citation trends



Most contributed Topics 2017–2021

Galium; Asperula; Iris Sibirica
2 documents
[View all Topics](#)

3 Documents [Cited by 6 Documents](#) [0 Preprints](#) [12 Co-Authors](#) [1 Topic](#) [0 Awarded Grants](#)

[Export all](#) [Save all to list](#)

Sort by [Date \(newest\)](#)

- [View list in search results format](#)
- [View references](#)
- [Set document alert](#)

Article - [Open access](#)
 Arctostaphylos uva-ursi L. leaves extract and its modified cysteine preparation for the management of insulin resistance: chemical analysis and bioactivity
 Kravchenko, G., Krasnikova, O., Raal, A., ... Grytsyk, A., Koshovyl, O.
Natural Products and Bioprospecting, 2022, 12(1), 30
[Show abstract](#) [View at Publisher](#) [Related documents](#)

Article - [Open access](#)
 Research in phytochemical composition and hypoglycemic activity screening of the dry extracts from bearberry leaves
 Chalka, N., Mazon, M., Koshovyl, O., ... Kovalenko, S., Darmogral, R.
ScienceRise: Pharmaceutical Science, 2021, 31(3), pp. 42–50
[Show abstract](#) [View at Publisher](#) [Related documents](#)

Article - [Open access](#)
 Phytochemical profile and pharmacological activity of the dry extract from arctostaphylos uva-ursi leaves modified with phenylalanine
 Chalka, N., Koshovyl, O., Raal, A., ... Zupanets, A., Odyntsova, V.
ScienceRise: Pharmaceutical Science, 2020, 30(6), pp. 74–84

0 Citations
2 Citations
6 Citations

Активация Windows
Чтобы активировать Windows, перейдите в раздел "Параметры".

Додаток А 1

Апробація результатів дисертації

1. XXIV міжнародна науково-практична конференція молодих вчених та студентів «Topical issues of new drugs development» (м. Харків, 20 квітень 2017 р., форма участі – публікація тез);
2. the 9th International Pharmaceutical Conference, dedicated to the 100th years anniversary of independent Lithuania's pharmacy) «Sciences and Practice 2018» (Kaunas, Lithuania, 09th November, 2018, форма участі – публікація);
3. VI науково-практична конференція з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (Тернопіль, 27 - 28 вересня 2018 р., форма участі – публікація тез);
4. III Міжнародна науково-практична конференція «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів» (м. Харків, 14-15 бер. 2019 р., форма участі – усна доповідь);
5. XIII International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds (Shanghai, China, October 16–19, 2019, форма участі – публікація тез);
6. Науково-практична конференція з міжнародною участю, присвяченої 20-й річниці заснування Дня фармацевтичного працівника України «Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку» (м. Харків, 19 вересня 2019 р., форма участі – публікація тез);
7. Міжнародна науково-практична конференція «Сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження» (м. Івано-Франківськ, Яремче, 12-13 травня 2020 р., форма участі – публікація тез).

Додаток А 2





УКРАЇНА

(19) UA (11) 124042 (13) C2

(51) МПК

A61K 36/45 (2006.01)
 A61K 31/198 (2006.01)
 A61K 127/00 (2006.01)
 A61P 3/10 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
 ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
 ВЛАСНОСТІ
 ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
 "УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
 ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
 ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2019 10483	Комиссаренко Н. А. Биологически активные добавки толокнянки обыкновенной / Н. А. Комиссаренко, А. С. Гейдерих, О. Н. Кошевой // Функциональні харчові продукти – дієтичні добавки – як дієвий засіб різнопланової профілактики захворювань : матеріали І Міжнар. наук.- практ. конф., 11-12 квіт. 2013 р. – X. : ЕСЕН. – С. 129-130 Нагаєлаєва Л.А. Разработка технологии производства экстракта толокнянки сухого и создание лекарственной формы на его основе, методы их стандартизации : автореферат дис. кандидата фармацевтических наук : 15.00.01. - Москва, - 1994.- 21 с. Luo K. Effect of L-arginine supplementation on the hepatic phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway and gluconeogenic enzymes in early intrauterine growth-restricted rats / Luo K., Chen P., Li S., Li W., He M., Wang T., Chen J. // Experimental and therapeutic medicine. – 2017. – 14. – P. 2355-2360 Hu S., et al. L-arginine modulates glucose and lipid metabolism in obesity and diabetes / Hu S., Han M., Rezaei A., Li D., Wu G., Ma X. // Current Protein and Peptide Science. – 2017. – 18. – P. 599-608 UA 89735 U, 25.04.2014 Polozova, A. V. Research in biological active substances of the bearberry leaves extract, which was obtained with 50 % ethanol / A. V. Polozova, N. B. Chayka // Topical issues of new drugs development : abstracts of XXIV international scientific and practical conference of young scientists and student, April 20, 2017. - Kh., 2017. - Vol. 1. - P. 117
(22) Дата подання заявки:	21.10.2019	
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	08.07.2021	
(41) Публікація відомостей про заявку:	21.04.2021, Бюл.№ 16	
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	07.07.2021, Бюл.№ 27	
(72) Винахідник(и):	Кошовий Олег Миколайович (UA), Кравченко Ганна Борисівна (UA), Красільнікова Оксана Анатоліївна (UA), Чайка Наталя Борисівна (UA), Матар Мазен (UA)	
(73) Володілець (володілці):	НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA)	
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	UA 111134 C2, 25.03.2016 UA 111133 C2, 25.03.2016 US 6660320 B1, 09.12.2003	

UA 124042 C2

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЗАСОБУ З ГІПОГЛІКЕМІЧНОЮ ТА ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОЮ ДІЄЮ З ЛИСТЯ МУЧНИЦІ ЗВИЧАЙНОЇ З ДОДАВАННЯМ АРГІНІНУ

(57) Реферат:

Винахід належить до хіміко-фармацевтичної галузі, а саме одержання засобу з гіпоглікемічною та гепатопротекторною дією з рослинної сировини, що включає екстракцію рослинної сировини 50 % розчином спирту етилового, фільтрацію, упарювання, очищення та сушіння, при якому як рослинну сировину використовують листя мучниці звичайної, екстракцію проводять у співвідношенні сировини до екстрагента 1:5-1:10, очищення проводять шляхом відстоювання та



УКРАЇНА



ПАТЕНТ

НА ВИНАХІД

№ 124043

СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЗАСОБУ З ГІПОГЛІКЕМІЧНОЮ ТА ЛІПОТРОПНОЮ ДІЄЮ З ЛИСТЯ МУЧНИЦІ ЗВИЧАЙНОЇ З ДОДАВАННЯМ ЦИСТЕЇНУ

Видано відповідно до Закону України "Про охорону прав на винаходи і корисні моделі".

Зареєстровано в Державному реєстрі України винаходів 07.07.2021.

Генеральний директор
Державного підприємства
«Український інститут
інтелектуальної власності»

А.В. Кудін





УКРАЇНА

(19) UA (11) 124043 (13) C2

(51) МПК

A61K 31/198 (2006.01)

A61K 36/45 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2019 10496</p> <p>(22) Дата подання заявки: 21.10.2019</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 08.07.2021</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 21.04.2021, Бюл.№ 16</p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 07.07.2021, Бюл.№ 27</p>	<p>(72) Винахідник(и): Кошовий Олег Миколайович (UA), Кравченко Ганна Борисівна (UA), Красільнікова Оксана Анатоліївна (UA), Чайка Наталя Борисівна (UA), Матар Мазен (UA)</p> <p>(73) Володілець (володільці): НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA)</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: UA 89735 U, 25.04.2014 Polozova, A. V. Research in biological active substances of the bearberry leaves extract, which was obtained with 50 % ethanol / A. V. Polozova, N. B. Chayka // Topical issues of new drugs development : abstracts of XXIV international scientific and practical conference of young scientists and student, April 20, 2017. - 2017. - Vol. 1. - P. 117 UA 111133 C2, 25.03.2016 US 6660320 B1, 09.12.2003 Study of the properties of bearberry leaf extract as a natural antioxidant in model foods / N.A.M. Azman, M.G.Gallego, F. Segovia et al. // Antioxidants. - 2016. - Vol. 5. - P. 11 Комісаренко М.А. Дослідження фенольних сполук спиртового екстракту листя мучниці звичайної / М.А. Комісаренко, А.С. Гейдеріх, А.М. Ковальова, О.М. Кошовий // Фармаком. - 2012. - № 1/2. - С. 50-54 RU 2413527 C1, 10.03.2011 Screening of Bearberry leaves extracts hypoglycemic effect and study of acute toxicity / G. Kravchenko, M. Mazen, O. Krasilnikova // Український біофармацевтичний журнал. - 2018. - № 2 (55). - С. 13-16</p>
--	---

UA 124043 C2

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЗАСОБУ З ГІПОГЛІКЕМІЧНОЮ ТА ЛІПОТРОПНОЮ ДІЄЮ З ЛИСТЯ МУЧНИЦІ ЗВИЧАЙНОЇ З ДОДАВАННЯМ ЦИСТЕЇНУ

(57) Реферат:

Винахід стосується способу одержання засобу з гіпоглікемічною та ліпотропною дією, що включає екстракцію рослинної сировини 50 % розчином спирту етилового, фільтрацію, упарювання, очищення та сушіння, де як рослинну сировину використовують листя мучниці





УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **123380** (13) **C2**

(51) МПК

A61K 36/45 (2006.01)

A61K 127/00 (2006.01)

A61P 13/02 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2019 09321</p> <p>(22) Дата подання заявки: 15.08.2019</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 25.03.2021</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 17.02.2021, Бюл.№ 7</p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 24.03.2021, Бюл.№ 12</p>	<p>(72) Винахідник(и): Чайка Наталя Борисівна (UA), Кошовий Олег Миколайович (UA), Кіресв Ігор Володимирович (UA), Зупанець Анна Анатоліївна (UA), Комісаренко Андрій Миколайович (UA)</p> <p>(73) Володілець (всподільці): Кошовий Олег Миколайович, вул. Амосова, 52, кв. 34, м. Харків, 61176 (UA)</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: UA 133723 U, 25.04.2019 UA 103358 U, 10.12.2015 UA 33578 U, 25.06.2008 UA 16774 U, 15.08.2006 RU 2413527 C1, 10.03.2011 RU 2016111690 A, 02.10.2017 US 10300099 B2, 28.05.2019 Комиссаренко, Н. А. Биологически активные добавки толокнянки обыкновенной / Н. А. Комиссаренко, А. С. Гейдерих, О. Н. Кошевой // Функциональные пищевые продукты – дієтичні добавки – як дієвий засіб різнопланової профілактики захворювань : матеріали І Міжнар. наук.- практ. конф., 11-12 квіт. 2013 р. – X. : ЕСЕН. – С. 129-130 UA 111133 C2, 25.03.2016</p>
--	--

UA 123380 C2

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ З ЛИСТЯ МУЧНИЦІ ЗВИЧАЙНОЇ ТА ФЕНІЛАЛАНІНУ З ДІУРЕТИЧНОЮ АКТИВНІСТЮ

(57) Реферат:

Винахід належить до фармації та медицини, а саме до способів одержання біологічно активних речовин з природної сировини, зокрема до способу одержання лікувально-профілактичного засобу з діуретичною та протизапальною дією, що включає екстракцію рослинної сировини, фільтрацію, упарювання, очищення та сушіння, де як рослинну сировину використовують листя мучниці звичайної, екстракцію проводять двократно 40-60 % розчином спирту етилового у співвідношенні сировини до екстрагента 1:5-1:10 та додають фенілаланін у 2-4-кратній еквімолярній кількості відносно загальної суми фенольних сполук.



УКРАЇНА



ПАТЕНТ

НА ВІНАХІД

№ 123476

СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЗАСОБУ З ДІУРЕТИЧНОЮ ДІЄЮ З
ЛИСТЯ МУЧНИЦІ ЗВИЧАЙНОЇ ТА ВАЛІНУ

Видано відповідно до Закону України "Про охорону прав на винаходи
і корисні моделі".

Зареєстровано в Державному реєстрі України винаходів **07.04.2021**.

Генеральний директор
Державного підприємства
«Український інститут
інтелектуальної власності»

A.V. Kudin
А.В. Кудін





УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **123476** (13) **C2**
(51) МПК**A61K 36/45** (2006.01)**A61K 31/198** (2006.01)**A61P 3/10** (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2019 09314 (22) Дата подання заявки: 15.08.2019 (24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 08.04.2021 (41) Публікація відомостей про заяву: 17.02.2021, Бюл.№ 7 (46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 07.04.2021, Бюл.№ 14</p>	<p>(72) Винахідник(и): Чайка Наталя Борисівна (UA), Кошовий Олег Миколайович (UA), Кіреєв Ігор Володимирович (UA), Ільїна Тетяна Василівна (UA), Бородіна Наталя Валерівна (UA)</p> <p>(73) Володілець (володільці): Кошовий Олег Миколайович, вул. Амосова, 52, кв. 34, м. Харків, 61176 (UA)</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Нагаслаєва Л.А. Разработка технологии производства экстракта толокнянки сухого и создание лекарственной формы на его основе, методы их стандартизации : автореферат дис. кандидата фармацевтических наук : 15.00.01. - Москва, - 1994. - 21 с. Radulović N. Comparative Study of the Leaf Volatiles of <i>Arctostaphylos uva-ursi</i> (L.) Spreng. And <i>Vaccinium vitis-idaea</i> L. (Ericaceae) / Radulović N., Blagojević P., Palić R // <i>Molecules</i>. - 2010. - Vol. 15(9). - P. 6168-6185 Polozova, A. V. Research in biological active substances of the bearberry leaves extract, which was obtained with 50 % ethanol / A. V. Polozova, N. B. Chayka // <i>Topical issues of new drugs development : abstracts of XXIV international scientific and practical conference of young scientists and student</i>, April 20, 2017. - Kh., 2017. - Vol. 1. - P. 117 Комісаренко М.А. Дослідження фенольних сполук спиртового екстракту листя мучниці звичайної / М.А. Комісаренко, А.С. Гейдерік, А.М. Ковальова, О.М. Кошовий // <i>Фармаком</i>. - 2012. - № 1/2. - С. 50-54 US 6660320 B1, 09.12.2003 UA 16774 U, 15.08.2006 UA 33578 U, 25.06.2008 RU 2413527 C1, 10.03.2011</p>
--	---

UA 123476 C2

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЗАСОБУ З ДІУРЕТИЧНОЮ ДІЄЮ З ЛИСТЯ МУЧНИЦІ ЗВИЧАЙНОЇ ТА ВАЛІНУ

(57) Реферат:

Винахід належить до галузі фармації та медицини, а саме до способів одержання біологічно активних речовин з природної сировини, і стосується способу одержання лікувально-профілактичних засобів діуретичної дії з листя мучниці звичайної з додаванням валіну, що впливають на діурез при лікуванні захворювань, пов'язаних з порушеннями роботи сечовивідної системи.





УКРАЇНА

(19) UA (11) 123477 (13) C2

(51) МПК

A61K 36/45 (2006.01)

A61K 31/198 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2019 09327</p> <p>(22) Дата подання заявки: 15.08.2019</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 08.04.2021</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 17.02.2021, Бюл.№ 7</p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 07.04.2021, Бюл.№ 14</p>	<p>(72) Винахідник(и): Чайка Наталя Борисівна (UA), Кошовий Олег Миколайович (UA), Кірес Ігор Володимирович (UA), Комісаренко Микола Андрійович (UA), Ковальова Алла Михайлівна (UA)</p> <p>(73) Володілець (володільці): Кошовий Олег Миколайович, вул. Амосова, 52, кв. 34, м. Харків, 61176 (UA)</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Нагаслаєва Л.А. Разработка технологии производства экстракта толокнянки сухого и создание лекарственной формы на его основе, методы их стандартизации : автореферат дис. кандидата фармацевтических наук : 15.00.01. - Москва, - 1994.- 21 с Radulović N. Comparative Study of the Leaf Volatiles of <i>Arctostaphylos uva-ursi</i> (L.) Spreng. And <i>Vaccinium vitis-idaea</i> L. (Ericaceae) / Radulović N., Blagojević P., Palić R // <i>Molecules</i>. - 2010. - Vol. 15(9). - P. 6168–6185 Polozova, A. V. Research in biological active substances of the bearberry leaves extract, which was obtained with 50 % ethanol / A. V. Polozova, N. B. Chayka // <i>Topical issues of new drugs development : abstracts of XXIV international scientific and practical conference of young scientists and student, April 20, 2017.</i> - Kh., 2017. - Vol. 1. - P. 117 Комісаренко М.А. Дослідження фенольних сполук спиртового екстракту листя мучниці звичайної / М.А. Комісаренко, А.С. Гейдеріх, А.М. Ковальова, О.М. Кошовий // <i>Фармаком</i>. - 2012. - № 1/2. - С. 50-54 US 6660320 B1, 09.12.2003 UA 16774 U, 15.08.2006 UA 33578 U, 25.06.2008 RU 2413527 C1, 10.03.2011</p>
---	--

UA 123477 C2

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЗАСОБУ З ДІУРЕТИЧНОЮ ДІЄЮ З ЛИСТЯ МУЧНИЦІ ЗВИЧАЙНОЇ ТА ГЛІЦИНУ





УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **142930** (13) **U**

(51) МПК

A61K 36/45 (2006.01)**A61P 3/10** (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ(21) Номер заявки: **u 2019 10495**(22) Дата подання заявки: **21.10.2019**(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **10.07.2020**(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.07.2020, Бюл.№ 13**

(72) Винахідник(и):

**Кошовий Олег Миколайович (UA),
Кравченко Ганна Борисівна (UA),
Красільнікова Оксана Анатоліївна (UA),
Матар Мазен (UA),
Чайка Наталя Борисівна (UA)**

(73) Власник(и):

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ,
вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA)**

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЗАСОБУ З ГІПОГЛІКЕМІЧНОЮ ТА ЛІПОТРОПНОЮ ДІЄЮ З ЛИСТЯ МУЧНИЦІ ЗВИЧАЙНОЇ З ДОДАВАННЯМ ЦИСТЕЇНУ

(57) Реферат:

Спосіб одержання засобу з гіпоглікемічною та ліпотропною дією включає екстракцію рослинної сировини 50 % розчином спирту етилового, фільтрацію, упарювання, очищення та сушку. Як рослинну сировину використовують листя мучниці звичайної, екстракцію проводять у співвідношенні сировини до екстрагенту 1:5-1:10, очищення проводять шляхом відстоювання та відокремлення надосадової рідини, яку піддають стерилізації, та додають у трикратній еквімолярній кількості по відношенню до загальної суми фенольних сполук амінокислоту цистеїн.

UA 142930 U



УКРАЇНА



ПАТЕНТ

НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ № 142210

**СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЗАСОБУ З ГІПОГЛІКЕМІЧНОЮ ТА
ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОЮ ДІЄЮ З ЛИСТЯ МУЧНИЦІ
ЗВИЧАЙНОЇ З ДОДАВАННЯМ АРГІНІНУ**

Видано відповідно до Закону України "Про охорону прав на винаходи і корисні моделі".

Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисні моделі 25.05.2020.

Заступник Міністра розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України

Д.О. Романович





УКРАЇНА

(19) UA (11) 142210 (13) U

(51) МПК

A61K 36/45 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2019 10482**
 (22) Дата подання заявки: **21.10.2019**
 (24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **25.05.2020**
 (46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.05.2020, Бюл.№ 10**

(72) Винахідник(и):
**Кошовий Олег Миколайович (UA),
 Кравченко Ганна Борисівна (UA),
 Красіленькова Оксана Анатоліївна (UA),
 Чайка Наталя Борисівна (UA),
 Матар Мазен (UA)**

(73) Власник(и):
**НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ
 УНІВЕРСИТЕТ,
 вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA)**

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЗАСОБУ З ГІПОГЛІКЕМІЧНОЮ ТА ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОЮ ДІЄЮ З ЛИСТЯ МУЧНИЦІ ЗВИЧАЙНОЇ З ДОДАВАННЯМ АРГІНІНУ

(57) Реферат:

Спосіб одержання засобу з гіпоглікемічною та гепатопротекторною дією з рослинної сировини включає екстракцію рослинної сировини 50 % розчином спирту етилового, фільтрацію, упарювання, очищення та сушіння. Як рослинну сировину використовують листя мучниці звичайної. Екстракцію проводять у співвідношенні сировини і екстрагенту 1:5-1:10. Очищення проводять шляхом відстоювання та відокремлення надосадової рідини, яку піддають стерилізації, та додають у трикратній еквімолярній кількості відносно загальної суми фенольних сполук амінокислоту аргінін.

UA 142210 U





УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **140486** (13) **U**

(51) МПК

A61K 36/45 (2006.01)**A61P 3/10** (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2019 09324	(72) Винахідник(и): Чайка Наталя Борисівна (UA), Кошовий Олег Миколайович (UA), Кіреєв Ігор Володимирович (UA), Зупанець Анна Анатоліївна (UA), Комісаренко Андрій Миколайович (UA)
(22) Дата подання заявки: 15.08.2019	(73) Власник(и): Кошовий Олег Миколайович, вул. Амосова, 52, кв. 34, м. Харків, 61176 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.02.2020	
(46) Публікація відомостей про видану патенту: 25.02.2020, Бюл.№ 4	

**(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЛІКУВАЛЬНО-ПРОФІЛАКТИЧНОГО ЗАСОБУ ДІУРЕТИЧНОЇ ДІЇ З ЛИСТЯ
МУЧНИЦІ ЗВИЧАЙНОЇ З ФЕНІЛАЛАНІНОМ**

(57) Реферат:

Спосіб одержання засобу з діуретичною та протизапальною дією включає екстракцію рослинної сировини, фільтрацію, упарювання, очищення та сушіння, згідно з корисною моделлю як рослинну сировину використовують листя мучниці звичайної, екстракцію проводять двократно 40-60 % розчином спирту етилового у співвідношенні сировини до екстрагенту 1:5-1:10 та додають фенілаланін у 2-4-кратній еквімолярній кількості по відношенню до загальної суми фенольних сполук.

UA 140486 U



УКРАЇНА



ПАТЕНТ

НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ
№ 140872

СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЛІКУВАЛЬНО-ПРОФІЛАКТИЧНОГО
ЗАСОБУ ДІУРЕТИЧНОЇ ДІЇ З ЛИСТЯ МУЧНИЦІ ЗВИЧАЙНОЇ
ТА ГЛІЩИНУ

Видано відповідно до Закону України "Про охорону прав на винаходи
і корисні моделі".

Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисні
моделі 10.03.2020.

Заступник Міністра розвитку
економіки, торгівлі та сільського
господарства України

D.O. Romanovych

Д.О. Романович





УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **140872** (13) **U**

(51) МПК

A61K 36/45 (2006.01)**A61P 3/10** (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2019 09323**
 (22) Дата подання заявки: **15.08.2019**
 (24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **10.03.2020**
 (46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.03.2020, Бюл.№ 5**

(72) Винахідник(и):
**Чайка Наталя Борисівна (UA),
 Кошовий Олег Миколайович (UA),
 Кірес Ігор Володимирович (UA),
 Комісаренко Микола Андрійович (UA),
 Ковальова Алла Михайлівна (UA)**

(73) Власник(и):
**Кошовий Олег Миколайович,
 вул. Амосова, 52, кв. 34, м. Харків, 61176
 (UA)**

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЛІКУВАЛЬНО-ПРОФІЛАКТИЧНОГО ЗАСОБУ ДІУРЕТИЧНОЇ ДІЇ З ЛИСТЯ МУЧНИЦІ ЗВИЧАЙНОЇ ТА ГЛІЦИНУ

(57) Реферат:

Спосіб одержання засобу з діуретичною та протизапальною дією включає екстракцію рослинної сировини, фільтрацію, уларювання, очищення та сушіння, згідно з корисною моделлю як рослинну сировину використовують листя мучниці звичайної, екстракцію проводять двократно 40-60 % розчином спирту етилового у співвідношенні сировини до екстрагенту 1:5-1:10 та додають гліцин у 2-4-кратній еквімолярній кількості по відношенню до загальної суми фенольних сполук.

UA 140872 U



УКРАЇНА



ПАТЕНТ

НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ
№ 141184

СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЛІКУВАЛЬНО-ПРОФІЛАКТИЧНОГО
ЗАСОБУ З ДІУРЕТИЧНОЮ ТА ПРОТИЗАПАЛЬНОЮ ДІЄЮ З
ЛИСТЯ МУЧНИЦІ ЗВИЧАЙНОЇ З ВАЛІНОМ

Видано відповідно до Закону України "Про охорону прав на винаходи
і корисні моделі".

Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисні
моделі 25.03.2020.

Заступник Міністра розвитку
економіки, торгівлі та сільського
господарства України

Д.О. Романович





УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **141184** (13) **U**

(51) МПК (2020.01)

A61K 36/00

A61P 13/00

A61P 7/10 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2019 09322**
 (22) Дата подання заявки: **15.08.2019**
 (24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **25.03.2020**
 (46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.03.2020, Бюл.№ 6**

(72) Винахідник(и):
 Чайка Наталя Борисівна (UA),
 Кошовий Олег Миколайович (UA),
 Кіресв Ігор Володимирович (UA),
 Ільїна Тетяна Василівна (UA),
 Бородіна Наталія Валеріївна (UA)

(73) Власник(и):
 Кошовий Олег Миколайович,
 вул. Амосова, 52, кв. 34, м. Харків, 61176
 (UA)

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЛІКУВАЛЬНО-ПРОФІЛАКТИЧНОГО ЗАСОБУ З ДІУРЕТИЧНОЮ ТА ПРОТИЗАПАЛЬНОЮ ДІЄЮ З ЛИСТЯ МУЧНИЦІ ЗВИЧАЙНОЇ З ВАЛІНОМ

(57) Реферат:

Спосіб одержання засобу з діуретичною та протизапальною дією включає екстракцію рослинної сировини, фільтрацію, упарювання, очищення та сушку. Як рослинну сировину використовують листя мучниці звичайної. Екстракцію проводять двократно 40-60 % розчином спирту етилового у співвідношенні сировини до екстрагенту 1:5-1:10 та додають валін у 2-4-х кратній еквімолярній кількості по відношенню до загальної суми фенольних сполук.


UA 141184 U

Додаток Б

Акти впровадження



„APPROVED”

Chief Executive Officer
«Brupharmexport sprl»

 _____ E. Vandecauter
 Brussels, March 25th, 2020

CERTIFICATE OF IMPLEMENTATION

The results of the research of the scientists from the National University of Pharmacy (Chaika Natalia, Kireyev Igor and Koshovyi Oleh) were used to prepare Modules of the drug registration dossier for the medicines – *Arctostaphylos uva-urci* dry extract.

Review of primary database on chemical composition, pharmacological activity and use of *Arctostaphylos uva-urci* medicines in pharmaceutical and medical practice was used in the formation of The Module 2. Summary of the CTD. in the registration dossier for the medicinal product.

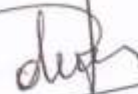
The results of the research were used in the elaboration of the technology of the *Arctostaphylos uva-urci* leaves dry extract production on the industrial capacities of the enterprise according to the draft technological documentation. Drafts of quality control techniques for the *Arctostaphylos uva-urci* dry extract have been developed, tested in the laboratory and used in the quality analysis of the extracts obtained with the industrial equipment. The obtained results were used in the development of The Module 3. Quality. in the registration dossier for the developed medicine.

The results of the preclinical research of the *Arctostaphylos uva-urci* dry extract in toxicity, antimicrobial, anti-inflammatory and diuretic activity were used in the creation of The Module 4 in the registration dossier.

The research results are carried out at the high scientific level, there are no comments on their quality, reliability and reproducibility in industrial and laboratory conditions.

Chief Executive Officer

E. Vandecauter

Акт приймання-передачі № 7від 14.12.2020р.

ТОВ "КФК" Грін фарм Косметик" в особі генерального директора Сафонов В.А. (надалі іменується «Замовник»), з однієї сторони, і Кошовий О.М., завідувач кафедри фармакогнозії Національного фармацевтичного університету (надалі іменується «Виконавець»), з іншої сторони, склали цей Акт про те, що Замовник прийняв від Виконавця:

- блок-схеми та технологічні інструкції зі способу одержання сухих екстрактів з листя мучниці звичайної для написання технологічних регламентів;
- проекти методик контролю якості на одержані сухі екстракти з листя мучниці звичайної для розробки фармацевтичного досіє на лікарські засоби.

Розроблені проекти документації передані повністю, зауважень до їх якості, достовірності та відтворюваності в промислових та лабораторних умовах ТОВ "КФК" Грін фарм Косметик" немає.

Документацію передав:

Завідувач кафедри фармакогнозії
Національного фармацевтичного університету

Кошовий О.М.

Документацію прийняв:

Генеральний директор
ТОВ "КФК" Грін фарм Косметик"

Сафонов В.А.



„ЗАТВЕРДЖУЮ”

Генеральний директор
ТОВ "КФК" Грін фарм Косметик"
Сафонов В.А.

„14” грудня 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Результати наукових досліджень аспіранта кафедри фармакогнозії Національного фармацевтичного університету **Чайки Наталії Борисівни** були використані при опрацюванні технології виробництва сухих екстрактів з листя мучниці звичайної (Патенти України № 111133 та № 103358) на промислових потужностях ТОВ "КФК" Грін фарм Косметик" згідно проекту технологічної документації. Запропонована технологія повністю відтворюється у промислових умовах.

Було отримано три серії екстрактів, по 1,35, 1,02 та 1,75 кг, які відповідали показникам якості розроблених проектів методик контролю якості. Одержані екстракти передані для аналізу на стабільність, визначення терміну зберігання та розробки лікарських форм.

Запропонована технологія, отримана в результаті науково-технічної співпраці ТОВ "КФК" Грін фарм Косметик" та кафедри фармакогнозії Національного фармацевтичного університету.

Директор з виробництва
ТОВ "КФК" Грін фарм Косметик "



Ніколов В.В.

Завідувач кафедри фармакогнозії
Національного фармацевтичного університету



Кошовий О.М.

„ЗАТВЕРДЖУЮ”


Генеральний директор
ТОВ "КФК" Грін фарм Косметик"
Сафонов В.А.
14 грудня 2020 р.


АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Розроблені проекти методик контролю якості на сухі екстракти з листя мучниці звичайної, які були апробовані в лабораторних умовах ТОВ "КФК" Грін фарм Косметик" та використані при аналізі якості екстрактів, які отримані на промисловому обладнанні. При розробці документації були використані матеріали науково-дослідної роботи аспіранта Чайки Н.Б.

Запропоновані методики, отримані в результаті науково-технічної співпраці ТОВ "КФК" Грін фарм Косметик" та кафедри фармакогнозії Національного фармацевтичного університету.

Отримані екстракти відповідали показникам якості розроблених проектів МКЯ та були передані для дослідження строків придатності.

Директор з виробництва
ТОВ "КФК" Грін фарм Косметик "  Ніколов В.В.

Завідувач кафедри фармакогнозії
Національного фармацевтичного університету  Кошовий О.М.

ЗАТВЕРДЖЕНО**Наказ Міністерства охорони
здоров'я України**

№ _____

Ресстраційне посвідчення

№ _____

Виробник ТОВ "КФК" Грін фарм Косметик"

країна: Україна

**МЕТОДИКИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ
ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ**

Arctostaphylos uva-ursi extractum siccum**Мучниці звичайної екстракт сухий,****екстракт сухий (субстанція)****у банках із скломаси для виробництва нестерильних лікарських
форм**

МАРКУВАННЯ

На етикетці українською мовою вказують: назву заявника та виробника, їх адреси, назву препарату українською, російською та англійською мовами, масу препарату в кілограмах, умови зберігання, реєстраційний номер, номер серії, термін придатності. •

УПАКОВКА

По 1 кг у банки зі скломаси з гвинтовою горловиною з пластмасовими кришками, що нагвинчуються і прокладками з картону прокладочного. Горловину банки з кришкою обертають подпергаментом, обв'язують ниткою поліпропіленовою фибрильованою або шпагатом з луб'яних волокон, армованим хімічною ниткою, на кінці якої наклеюють етикетку з паперу, що самоклеїться.

УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ

Зберігають у захищеному від світла місці при температурі не вище + 25 °С.

ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ

2 роки.

Копія вірна

Генеральний директор
ТОВ "КФК" Грін фарм Косметик"



Сафонов В.А.

Завідувач кафедри фармакогнозії
Національного фармацевтичного університету

Кошовий О.М.



«Затверджую»

Проректор з науково-педагогічної роботи
Національного фармацевтичного
університету

проф.  І.М. Владимірова

« 9 » вересня 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Результати фітохімічного дослідження листа мучниці звичайної
2. **Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет, кафедра фармакогнозії, асп. Чайка Н. Б., проф. Кошовий О. М.
3. **Джерела інформації:**
 1. Чайка Н. Б., Комісаренко М. А., Кошовий О. М., Ковальова А. М., Бородіна Н. В. Дослідження динаміки екстрагування біологічно активних речовин з листа мучниці звичайної. Фітотерапія. Часопис. 2019. № 4, С. 64-68.
 2. Чайка Н.Б., Голембіовська О.І., Кошовий О.М. Дослідження сапонінового складу листа мучниці. Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів: Матеріали VII науково-практичної конференції з міжнародною участю (27 - 28 вересня 2018 р.). Тернопіль: ТДМУ «Укрмедкнига», 2018. С. 50-51.
 3. Chaika N. B., Koshovyi O. M., Kireev I. V., Plina T. V., Kovalyova A. M. The prospects for creation of a new drug based on a modified extract of bearberry leaves. Chemistry of Natural Compounds: abstracts XIII International Symposium, October 16–19, 2019, Shanghai. P. 81.
 4. Чайка Н.Б., Рааль А., Кошовий О.М., Кіреєв І.В. Визначення оптимального екстрагенту для екстракції БАР з листа мучниці звичайної. Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, м. Харків, 19 вересня 2019 р. Х.: НФаУ, 2019. Том. 1, С. 294-296.
4. **Де впроваджено:** Кафедра ботаніки Національного фармацевтичного університету.
5. **Форма впровадження:** у науково-дослідну роботу та навчальний процес кафедри ботаніки Національного фармацевтичного університету.
6. **Ефективність впровадження:** Поглиблення знань студентів щодо хімічного складу листа мучниці звичайної, у науковій роботі викладачів кафедри.
7. **Термін впровадження:** 2020-2021 навч. рік.

Завідувачка кафедри ботаніки
Національного фармацевтичного університету,
проф.



Т. М. Гонтова

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Проректор з наукової роботи
 Івано-Франківського національного
 медичного університету
 професор Вацляк Т.П.

2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Підходи до створення сухих модифікованих екстрактів з листя мучниці звичайної. Результати вивчення їх хімічного складу та фармакологічної активності.
2. **Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет, кафедра фармакогнозії, асп. Чайка Н.Б., проф. Кошовий О. М.
3. **Джерело інформації:**
 1. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Комісаренко М. А., Бородіна Н. В., Кіреєв І. В. Фітохімічний профіль і діуретична активність сухих екстрактів із мучниці звичайної листя. Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2021. Т. 14. № 1 (35). С. 45-51.
 2. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Мазен М., Кравченко А. Б., Ковальова А. М., Кіреєв І. В. Перспективи створення нового лікарського засобу для корекції метаболічного синдрому на основі БАР мучниці звичайної листя. Український біофармацевтичний журнал. 2021. № 1 (66). С. 46-52.
 3. Chaika N.B., Koshovyi O.M., Mazen M., Kravchenko G.B., Goryacha O.V., Kiryev I.V., Kovalenko S.M., Darmograi R.E. Research in phytochemical composition and hypoglycemic activity screening of the dry extracts from bearberry leaves. Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science». 2021. № 3 (31). P. 42-50. (Scopus). (Особисто здобувачем виконана частина експериментального дослідження, підготовлено статтю до друку).
 4. Кошовий О. М., Кравченко Г. Б., Красільнікова О. А., Чайка Н. Б., Мазен М. Спосіб одержання засобу з гіпоглікемічною та гепатопротекторною дією з листя мучниці звичайної з додаванням аргініну: пат. на винахід 124042 Україна, № а2019 10483; заявл. 21.10.2019; опубл. 07.07.2021; Бюл. № 27. 4.
4. **Де впроваджено:** кафедра фармацевтичного управління, технології ліків та фармакогнозії Івано-Франківського національного медичного університету.
5. **Форма впровадження:** науково-дослідна робота, навчальний процес, у лекційному курсі.
6. **Ефект від впровадження:** поглиблення знань студентів з питань одержання модифікованих екстрактів, хімічного складу та фармакологічної активності екстрактів з листя мучниці звичайної.
7. **Строки впровадження:** 2021-2022 навчальний рік.

Зав. кафедри фармацевтичного управління,
 технології ліків та фармакогнозії
 Івано-Франківського національного
 медичного університету



д.фарм.н, проф. Грицик А. Р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** методи одержання екстрактів з листя мучниці звичайної, дослідження їх хімічного складу та виявлення діуретичної, протизапальної, гіпоглікемічної та гіполіпідемічної активності.
2. **Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет, кафедра фармакогнозії, асп. Чайка Н. Б., проф. Кошовий О. М.
3. **Джерело інформації:**
 1. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Комісаренко М. А., Бородіна Н. В., Кіреєв І. В. Фітохімічний профіль і діуретична активність сухих екстрактів із мучниці звичайної листя. Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2021. Т. 14. № 1 (35). С. 45-51.
 2. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Мазен М., Кравченко А. Б., Ковальова А. М., Кіреєв І. В. Перспективи створення нового лікарського засобу для корекції метаболічного синдрому на основі БАР мучниці звичайної листя. Український біофармацевтичний журнал. 2021. № 1 (66). С. 46-52.
 3. Chaika N.B., Koshovyi O.M., Mazen M., Kravchenko G.B., Goryacha O.V., Kireyev I.V., Kovalenko S.M., Darmograi R.E. Research in phytochemical composition and hypoglycemic activity screening of the dry extracts from bearberry leaves. Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science». 2021. № 3 (31). P. 42-50. (Scopus).
 4. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Кіреєв І. В., Ільїна Т. В., Бородіна Н. В. Спосіб одержання засобу з діуретичною дією з листя мучниці звичайної та валіну: пат. на винахід 123476 Україна, № а2019 09314; заявл. 15.08.2019; опубл. 07.04.2021; Бюл. № 14. 4.
4. **Де впроваджено:** кафедра фармакогнозії, фармакології та ботаніки Запорізького державного медичного університету
5. **Форма впровадження:** навчальний процес (лекційний курс, практичні заняття), наукова робота викладачів кафедри.
6. **Ефект від впровадження:** поглиблення знань студентів з питань одержання екстрактів з листя мучниці звичайної, дослідження їх хімічного складу, діуретичної, протизапальної, гіпоглікемічної та гіполіпідемічної активності.
7. **Строки впровадження:** 2020-2021 навчальний рік.

Завідувач кафедри фармакогнозії,
 фармакології та ботаніки
 Запорізького державного медичного
 університету, д.біол.н., професор

проф. С. Д. Тржецинський

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Ректор ПВНЗ «Київського медичного
університету»
професор Б. Б. Гинев



2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозицій для впровадження:** Підходи до стандартизації екстрактів мучниці звичайної листя.
2. **Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет, кафедра фармакогнозії, асп. Чайка Н. Б., проф. Кошовий О. М.
3. **Джерело інформації:**
 1. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Комісаренко М. А., Кіреєв І. В., Кравченко Г. Б. Параметри стандартизації модифікованих екстрактів мучниці звичайної листя. Український біофармацевтичний журнал. 2020. № 4 (65). С. 16-23.
 2. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Мазен М., Кравченко А. Б., Ковальова А. М., Кіреєв І. В. Перспективи створення нового лікарського засобу для корекції метаболічного синдрому на основі БАР мучниці звичайної листя. Український біофармацевтичний журнал. 2021. № 1 (66). С. 46-52.
 3. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Ільїна Т. В., Бородіна Н. В. Визначення параметрів стандартизації екстрактів з листя мучниці звичайної. Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів: мат. III Міжпар. наук.-практ. конференції. У 2-х т. Т. 2, м. Харків, 14-15 бер. 2019 р. Х.: НФаУ, 2019. С. 303.
 4. Чайка Н.Б., Кошовий О.М., Комісаренко М.А., Кіреєв І.В. Новий модифікований екстракт з діуретичною активністю на основі бар листя мучниці звичайної та валіну. Сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, м. Івано-Франківськ, Яремче. 12-13 травня 2020 р. С. 184
4. **Де впроваджено:** кафедра фармацевтичної і біологічної хімії, фармакогнозії ПВНЗ «Київського медичного університету».
5. **Форма впровадження:** навчальний процес, науково-дослідна робота, у лекційному курсі.
6. **Ефект від впровадження:** поглиблення знань студентів з питань хімічного складу та стандартизації екстрактів з листя мучниці звичайної.
7. **Строки впровадження:** 2020-2021 навчальний рік.

Завідувач кафедри
фармацевтичної і біологічної хімії,
фармакогнозії ПВНЗ «Київського медичного
університету», д.фарм.н.

проф. О. Ю. Коновалова

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор
з науково-педагогічної роботи
Львівського національного медичного
університету ім. Данила Галицького



проф. М. В. Ежгоцька

2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Результати досліджень щодо розробки нових лікарських засобів з мучниці звичайної листя для корекції метаболічного синдрому.
2. **Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет, кафедра фармакогнозії, асп. Чайка Н.Б., проф. Кошовий О. М.
3. **Джерело інформації:**
 1. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Мазен М., Кравченко А. Б., Ковальова А. М., Кіреєв І. В. Перспективи створення нового лікарського засобу для корекції метаболічного синдрому на основі БАР мучниці звичайної листя. Український біофармацевтичний журнал. 2021. № 1 (66). С. 46-52.
 2. Chaika N.B., Koshovyi O.M., Mazen M., Kravchenko G.B., Goryacha O.V., Kireyev I.V., Kovalenko S.M., Darmograi R.E. Research in phytochemical composition and hypoglycemic activity screening of the dry extracts from bearberry leaves. Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science». 2021. № 3 (31). P. 42-50.
 3. Кошовий О. М., Кравченко Г. Б., Красільнікова О. А., Мазен М., Чайка Н.Б.. Спосіб одержання засобу з гіпоглікемічною та ліпотропною дією з листя мучниці звичайної з додаванням цистеїну: пат. на кор. мод. 142930 Україна, № u2019 10495; заявл. 21.10.2019; опубл. 10.07.2020; Бюл. № 13. 4.
 4. Кошовий О. М., Кравченко Г. Б., Красільнікова О. А., Чайка Н. Б., Мазен М.. Спосіб одержання засобу з гіпоглікемічною та гепатопротекторною дією з листя мучниці звичайної з додаванням аргініну: пат. на винахід 124042 Україна, № a2019 10483; заявл. 21.10.2019; опубл. 07.07.2021; Бюл. № 27. 4.
4. **Де впроваджено:** кафедра фармакогнозії і ботаніки Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького.
5. **Форма впровадження:** навчальний процес (лекційний курс, практичні заняття), наукова робота викладачів кафедри.
6. **Ефект від впровадження:** поглиблення знань студентів з питань вивчення хімічного складу мучниці звичайної листя, а також нових біологічно активних субстанцій на його основі для корекції метаболічного синдрому.
7. **Строки впровадження:** 2020-2021 навчальний рік.

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

Н. В. Шаповалова

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної
роботи Одеського національного
медичного університету
професор І. П. Шмакова



2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозицій для впровадження:** Результати досліджень хімічного складу та фармакологічної активності екстрактів мучниці звичайної листя.
2. **Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет, кафедра фармакогнозії, асп. Чайка Н.Б., проф. Кошовий О. М.
3. **Джерело інформації:**
 1. Chaika N., Koshovyi O., Raal A., Kireyev I., Zupanets A., Odyntsova V. Phytochemical profile and pharmacological activity of the dry extract from *Arctostaphylos uva-ursi* leaves modified with phenylalanine. Scientific Journal «Science Rise: Pharmaceutical Science». 2020. № 6 (28). P. 74-78.
 2. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Комісаренко М. А., Бородіна Н. В., Кіреєв І. В. Фітохімічний профіль і діуретична активність сухих екстрактів із мучниці звичайної листя. Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2021. Т. 14. № 1 (35). С. 45-51.
 3. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Мазен М., Кравченко А. Б., Ковальова А. М., Кіреєв І. В. Перспективи створення нового лікарського засобу для корекції метаболічного синдрому на основі БАР мучниці звичайної листя. Український біофармацевтичний журнал. 2021. № 1 (66). С. 46-52.
4. **Де впроваджено:** кафедра фармакології та фармакогнозії Одеського національного медичного університету.
5. **Форма впровадження:** навчальний процес (лекційний курс, практичні заняття), наукова робота викладачів кафедри.
6. **Ефект від впровадження:** поглиблення знань студентів з питань хімічного складу екстрактів з листя мучниці звичайної та їх фармакологічної активності.
7. **Строки впровадження:** 2020-2021 навчальний рік.

Завідувач кафедри
фармакології та фармакогнозії
Одеського національного
медичного університету, д.мед.н, проф.

Я. В. Рожковський



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції для впровадження: Розробка способу одержання сухих екстрактів мучниці звичайної листя, модифікованих амінокислотами для створення нового лікарського засобу для корекції та профілактики метаболічного синдрому.

2. Установа, автор: Національний фармацевтичний університет, кафедра фармакогнозії, асп. Чайка Н.Б., проф. Кошовий О. М.

3. Джерело інформації:

1. Кошовий О. М., Кравченко Г. Б., Красільнікова О.А., Мазен М., Чайка Н.Б. Спосіб одержання засобу з гіпоглікемічною та діпотропною дією з листя мучниці звичайної з додаванням цистеїну: пат. на кор. мод. 142930 Україна, № u2019 10495; заявл. 21.10.2019; опубл. 10.07.2020; Бюл. № 13. 4. (Виконана частина експериментального дослідження, підготовлені матеріали для подання в патентне бюро).
2. Кошовий О. М., Кравченко Г. Б., Красільнікова О. А., Чайка Н. Б., Мазен М. Спосіб одержання засобу з гіпоглікемічною та гепатопротекторною дією з листя мучниці звичайної з додаванням аргініну: пат. на винахід 124042 Україна, № u2019 10483; заявл. 21.10.2019; опубл. 07.07.2021; Бюл. № 27. 4. (Виконана частина експериментального дослідження, підготовлені матеріали для подання в патентне бюро).
3. Чайка Н. Б., Кошовий О. М., Мазен М., Кравченко А. Б., Ковальова А. М., Кіресів І. В. Перспективи створення нового лікарського засобу для корекції метаболічного синдрому на основі БАР мучниці звичайної листя. Український біофармацевтичний журнал. 2021. № 1 (66). С. 46-52.
4. Chaika N.B., Koshovyi O.M., Mazen M., Kravchenko G.B., Goryacha O.V., Kireyev I.V., Kovalenko S.M., Darmograi R.E. Research in phytochemical composition and hypoglycemic activity screening of the dry extracts from bearberry leaves. Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science». 2021. № 3 (31). P. 42-50.

4. Де впроваджено: кафедра технології біологічно активних сполук фармацевції та біотехнології Національного університету «Львівська політехніка».

5. Форма впровадження: навчальний процес (лекційний курс, практичні заняття), наукова робота викладачів кафедри.

6. Ефект від впровадження: поглиблення знань студентів з питань вивчення хімічного складу листя мучниці звичайної, а також нових біологічно активних субстанцій на його основі для профілактики метаболічного синдрому.

7. Строки впровадження: 2020-2021 навчальний рік.

В. о. завідувача кафедри технології біологічно активних сполук фармацевції та біотехнології
Національного університету
«Львівська політехніка», д.х.н., проф.

 В. І. Лубенець