

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
фармацевтичний факультет
кафедра фармакогнозії та нутриціології

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему: «**ФАРМАКОГНОСТИЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ КОРИ ТА ЛИСТЯ
JUGLANS NIGRA**»

Виконала: здобувач вищої освіти групи Фм19(4,10д)-04
спеціальності 226 Фармація, промислова фармація
освітньої програми Фармація

Лоліта ДУДКІНА

Керівник: зав. кафедри фармакогнозії та нутриціології,
професор, д.фарм.н., професор Вікторія КИСЛИЧЕНКО

Рецензент: зав. кафедри загальної хімії НФаУ, д.фарм.н.,
професор Сергій КОЛІСНИК

Харків – 2024 рік

АННОТАЦІЯ

Кваліфікаційна робота присвячена фармакогностичному вивченню Горіха чорного. Встановлено показники автентичності та доброякісності ЛРС. Проведено дослідження якісного та кількісного складу біологічно активних речовин у сировині.

Ключові слова: Juglans nigra, кора, лист, діагностичні ознаки, біологічно активні речовини

ANNOTATION

Qualifying work is devoted to pharmacognostic study of Juglans nigra. Indicators of authenticity and benignity of the herbal products have been established. The research of qualitative and quantitative composition of biologically active substances in raw material has been carried out.

Keywords: Juglans nigra, bark, leaf, diagnostic attributes, biologically active substances

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	5
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ПРЕДСТАВНИКИ РОДУ ГОРІХ (JUGLANS L.) - ПЕРСПЕКТИВНІ ДЖЕРЕЛА НОВИХ ВИДІВ ЛІКАРСЬКОЇ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	9
1.1 Представники роду Горіх перспективні джерела біологічно активних сполук	9
1.2 Ботанічна характеристика видів роду Juglans	10
1.3 Хімічний склад перспективних видів роду Горіх	12
1.4 Фармакологічні властивості та застосування в медицині представників роду Горіх	15
РОЗДІЛ 2. РОЗРОБКА ПІДХОДІВ ДО СТАНДАРТИЗАЦІЇ СИРОВИНИ КОРИ ТА ЛИСТЯ ГОРІХА ЧОРНОГО (JUGLANS NIGRA L.)	22
2.1 Розробка методик якісного аналізу кори та листя горіха чорного методом ТШХ і спекрофотометрії	22
2.2 Розробка методики кількісного визначення суми флавоноїдів у перерахунку на мірицитрин у корі горіха чорного	27
2.3 Розробка методики кількісного визначення суми флавоноїдів у перерахунку на мірицитрин у листі горіха чорного	31
2.4 Вивчення динаміки накопичення біологічно активних сполук у листі горіха чорного	35
РОЗДІЛ 3. МОРФОЛОГО-АНАТОМІЧНЕ ВИВЧЕННЯ СИРОВИНИ ОКРЕМИХ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ JUGLANS L.	38

3.1	Морфолого-анатомічне дослідження кори горіха чорного (<i>Juglans nigra</i> L.) з використанням методу люмінесцентної мікроскопії	39
3.2	Морфолого-анатомічне дослідження листя горіха чорного (<i>Juglans nigra</i> L.) з використанням методу люмінесцентної мікроскопії	46
	ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ	55
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	56
	ДОДАТКИ	67

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

БАС - біологічно активні сполуки;

БХ - паперова хроматографія;

ВЕРХ - високоефективна рідинна хроматографія;

ВООЗ - Всесвітня організація охорони здоров'я;

ДФУ - Державна фармакопея України;

ЛРС - лікарська рослинна сировина;

НД - нормативна документація;

НФаУ - Національний фармацевтичний університет;

СЗ - стандартний зразок;

ТШХ - тонкошарова хроматографія;

УФ - ультрафіолетовий;

ВСТУП

Актуальність проблеми. В умовах сучасного функціонування фармацевтичної галузі на різних етапах виробничого процесу є численна кількість лікарських засобів. Серед усього асортименту ЛЗ особливе місце посідає група лікарських рослинних препаратів. Зазначена категорія фармацевтичних агентів поєднує в собі широту терапевтичної дії та мінімальних ризик появи побічних ефектів. Значне місце посідають рослинні препарати під час терапії хронічних нозологій, оскільки в даному випадку потрібен тривалий прийом лікарських засобів.

Сучасний стан фармацевтичної науки в галузі фармакогнозії характеризується певним вичерпанням потенціалу відомих офіційних лікарських рослин. Однією з причин цього є недостатня увага, що приділяється вченими в галузі фармакогнозії новим і маловивченим видам рослинної сировини.

Одним із перспективних видів сировини рослинного походження є представники роду Горіх (*Juglans* L.) родини Горіхові (*Juglandaceae*). Представляють інтерес горіх волоський (*Juglans regia* L.), горіх чорний (*Juglans nigra* L.) і горіх сірий (*Juglans cinerea* L.). Представники роду Горіх є потенційними джерелами важливого класу біологічно активних сполук - нафтохінонів - представники якого (юглон, гідроюглон) зумовлюють високу антибактеріальну, протигрибкову та протизапальну активність.

Представники роду Горіх є цінними рослинами і широко застосовуються в деревообробній та харчовій промисловості. Однак зазначені види поки що не знайшли широкого застосування в науковій медицині. Таким чином, проведення комплексного фармакогностичного вивчення особливостей анатомо-морфологічної діагностики, а також ідентифікації та кількісного визначення основних груп БАР сировини представників роду Горіх, які б відповідали сучасним вимогам фармакопейного аналізу, є актуальним науковим завданням.

Мета роботи – фармакогностичне дослідження Горіха чорного, встановлення показників доброякісності.

Задачі дослідження. Для реалізації поставленої мети необхідно вирішити такі завдання:

-Розробка методик якісного аналізу кори та листя *Juglans nigra* L. методом тонкошарової хроматографії та спектрофотометрії.

-Розробка методик кількісного визначення флавоноїдів у корі та листі *Juglans nigra* L. з використанням диференціальної спектрофотометрії.

-Морфолого-анатомічне дослідження листя та кори горіха чорного.

Об'єкт дослідження. фармакогностичне вивчення кори та листя *Juglans nigra*.

Предмет дослідження. Вивчення біологічно активних речовин кори та листя *Juglans nigra*, показники доброякісності кори та листя *Juglans nigra*.

Методи дослідження: якісний склад і кількісний вміст БАР визначали за фармакопейними методами: тонкошаровою хроматографією (ТШХ), високоефективною рідиною хроматографією (ВЕРХ), специфічними якісними реакціями, спектрофотометричним методом, статистичними - обробка результатів експериментальних досліджень.

Практичне значення отриманих результатів. У результаті проведених досліджень показано можливість розширення асортименту ЛРС за рахунок використання кори та листя *Juglans nigra*.

Елементи наукових досліджень. Досліджено морфолого-анатомічні ознаки кори та листя *Juglans nigra*, це дослідження підтвердило наявність класичних структур. У результаті вивчення хімічного складу сировини видів *Juglans nigra* розширено уявлення про компонентний склад.

Апробація результатів дослідження та публікації. Результати дослідження були представлені на VI Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції "Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження" (12 квітня 2024 г.) у Національному

фармацевтичному університеті (м. Харків). За результатами кваліфікаційної роботи опубліковано 1 тезу доповіді.

Структура та обсяг кваліфікаційної роботи. Робота складається зі вступу, анотації українською та англійською мовами, огляду літератури, 3-х розділів власних досліджень, загальних висновків, списку використаної літератури, який містить 86 джерел, зокрема 54 іноземними мовами, і додатків. Зміст роботи викладено на 54 сторінках основного тексту та ілюстровано 7 таблицями і 19 малюнками.

РОЗДІЛ 1. ПРЕДСТАВНИКИ РОДУ ГОРІХ (JUGLANS L.) - ПЕРСПЕКТИВНІ ДЖЕРЕЛА НОВИХ ВИДІВ ЛІКАРСЬКОЇ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1. Представники роду Горіх перспективні джерела біологічно активних сполук

Нині значну роль у підвищенні ефективності терапії захворювань, спричинених різними мікроорганізмами, відіграє великий асортимент і застосування антибіотиків [79]. Однак антибіотикотерапія також має свої недоліки. Доведено, що часте застосування зазначеної групи препаратів збільшує частоту появи резистентних штамів мікроорганізмів [79]. У XXI столітті проблема антибіотикорезистентності набула особливої значущості в усьому світі. Резистентність до антибіотиків має величезне соціально-економічне значення і в розвинених країнах світу розглядається як загроза національній безпеці.

Згідно з оцінками міжнародних експертів [16, 79], антимікробна резистентність є причиною понад 700 тисяч смертельних випадків щорічно, зокрема в Європі - 22 тисячі випадків. За оцінкою Центру з контролю і профілактики захворювань (CDC), тільки в США щорічно резистентними штамми інфікуються близько 2 млн. осіб, з яких 23 тис. помирають [16].

Крім того, прийом антибіотиків може призвести до появи різних побічних ефектів, зокрема алергічних реакцій, зниження імунітету, а також збільшення грибкових уражень в організмі [48, 59]. У зв'язку з цим, важливою та актуальною проблемою сучасної фармації є пошук нових типів антибактеріальних препаратів.

Вирішення проблеми антибіотикорезистентності може бути здійснене за використання БАС рослинного походження, зокрема тих, що містять похідні хінону [6, 29, 37, 40].

У рослинному світі поширений особливий клас похідних хінону - нафтохінони. Близько 200 різних похідних 1,4-нафтохінону виявлено в різних органах вищих рослин [75, 76]. Серед похідних нафтохінонів особливий інтерес становлять похідні юглону, що містяться в рослинах родини Juglandaceae: 1,4-нафтохінон, юглон, 2-метил-1,4-нафтохінон, 2,3-диметилюглон [24, 37, 40].

Крім того, з огляду на те, що вищевказані види рослинної сировини містять не тільки похідні нафтохінонів, а й інші БАС, зокрема, поліфенольні сполуки та ненасичені жирні кислоти, що можуть чинити антиоксидантну та протизапальну дію.

Перспективним джерелом нафтохінонів можуть бути представники роду Горіх (*Juglans* L.) - рослини родини Juglandaceae, які за літературними даними [28, 49, 53, 82, 86] містять юглон, гідроюглон та інші потенційно ефективні БАС. У різних країнах ведуться дослідження в галузі інтродукції таких рослинних об'єктів: *Juglans nigra* L., *Juglans regia* L., *Juglans cinerea* L., *Juglans mandshurica* Maxim., *Juglans cordiformis* Maxim., *Juglans rupestris* Englm. Це дає змогу використовувати цю сировину також і з фармакогностичною метою [70, 71, 72, 73].

1.2. Ботанічна характеристика видів роду *Juglans*

Згідно з літературними даними рід *Juglans* L. включає в себе більше 20 видів, які виділені в чотири секції: секція Юглани - *Juglans*, представниками є горіх волоський *Juglans regia* L., *Juglans sigillata* Dode; секція Піссокарони - *Rhysocaryon*, представниками є горіх південний *Juglans australis* Griseb., горіх каліфорнійський *Juglans californica* S. Wats..., горіх Гіндса *Juglans hindsii* Jeps. ex R.E.Sm., горіх дрібноплідний *Juglans microcarpa* Berland .., горіх чорний *Juglans nigra* L. та ін.; секція Кардіокаріони - *Cardiocaryon*, представниками якої є горіх айлантолистий *Juglans ailantifolia* Carrière, горіх маньчжурський

Juglans mandshurica Maxim. та секція Трахікаріони - *Trachycaryon*, представником якої є горіх сірий *Juglans cinerea* L. [38].

Звичайним місцезростанням багатьох видів роду Горіх є ущелини та річкові долини, широколистяні ліси змішаного складу (висота над рівнем моря 1500-1800 м). Представники зростають поодинокі або невеликими групами. Ареал природного зростання в теплопомірних районах Євразії, Північної Америки та в горах Південної Америки (рис. 1) [1, 2, 14, 56, 76].

Основні представники роду *Juglans* L. мають відмінності в морфологічному відношенні [70, 86].

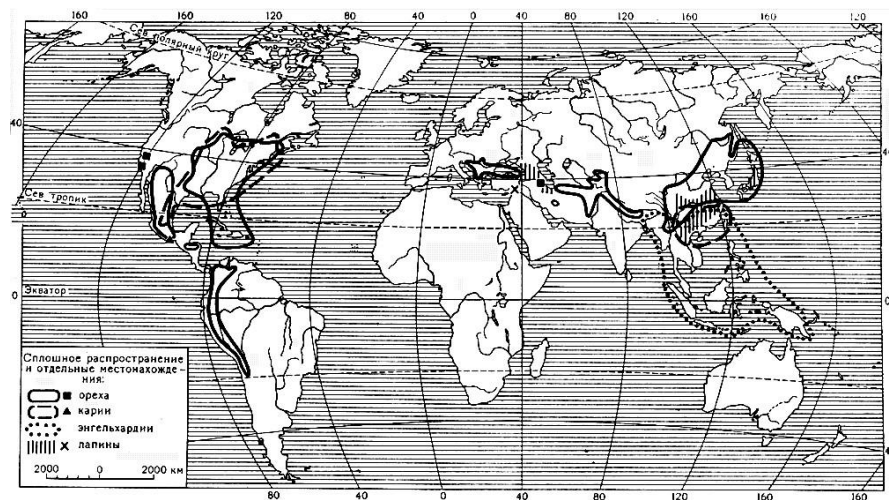


Рисунок 1.1 - Карта ареалів основних родів родини Горіхові.

Горіх волоський (*Juglans regia* L.) – дерево заввишки до 30-35 м і в діаметрі до 2 м. Має стрункий стовбур із незначною кроною, поодинокі за довжиною низькі, досить гіллясті з потужною шатроподібною кроною. Пагони сірозеленого, пізніше попелястого кольору гладенькі, але мають чечевички. Кора сірого кольору в місцях з глибокими тріщинами [76, 78].

Довжина листя - 20-40 см. Складний листок складається з 5-11 листочків (довжина 5-10 см) яйцевидної або еліптичної форми з цільним краєм, розташованих на коротких черешках. Основа листочків деякою мірою нерівнобока, верхівка їх загострена. Листочки здебільшого голі, трохи опушені в кутах жилок з нижнього боку [10, 41, 70, 78]. Плід - несправжня кістянка Форма плодів куляста, яйцеподібна або еліптична. Колір плодів

темно-зелений. Діаметр плоду від 6 до 8 см. Ендокарпій за структурою круглий або яйцеподібний, з 2 гладкими ребрами і товстою шкаралупою [70, 78].

Горіх чорний (*Juglans nigra* L.) – є деревним представником, що росте в Північній Америці. У висоту та діаметр сягає до 50 м і до 2 м відповідно. Має стовбур із темно-коричневою корою та глибокими тріщинами. Бруньки голі [23, 33, 47]. Довжина листя 30-60 см. Складний листок складається з 13-23 листочків (довжина 6-10 см) довгасто-яйцеподібної форми. Листочки опушені знизу і розташовані на коротких черешках. Плоди за формою кулясті або грушоподібні, не опушені. Діаметр плоду до 6,5 см. Ядро горіха їстівне [9, 16, 17].

Горіх сірий (*Juglans cinerea* L.) – рослина деревної форми життя родом із Північної Америки висотою до 30 м і діаметром до 1 м. Кора сірого кольору з великими борозенками. Пагони та бруньки опушені.

Довжина листя 50-70 см. Складний листок складається з 11-19 листочків зі значною опушеністю. Форма листочків видовжено-яйцеподібна. Плід - кістянка. За формою плід видовжено-яйцеподібний, має гостру верхню частину. Плід достатньо опушений і клейкий. Ядро горіха жирне та їстівне.

1.3. Хімічний склад перспективних видів роду Горіх

На даний момент як горіх волоський, так і інші види вищевказаного роду, не зареєстровані в якості офіційного РС. Однак їхній хімічний склад вивчений досить добре і представлений різними групами БАС [17, 49, 52, 71]. Провідною групою БАС видів роду Горіх є похідні нафтохінонів (юглон та інші), що локалізуються в усіх органах рослин роду *Juglans* L. [23, 27, 28, 49]. У корі виду *Juglans regia* L. виявлено нафтохінони (юглон, регіолон), дубильні речовини, алкалоїди (берберин), стероїди (β -ситостерин), тритерпени (бетулін, бетулінова кислота); у корі горіха сірого виявлено нафтохінони (юглон), а в корі горіха чорного - алкалоїди (югландин), нафтохінони (юглон), тритерпени [6, 28, 76].

Більш детально представлено хімічний склад листя представників роду Горіх (табл. 1,2). У листі горіха волоського провідною групою є нафтохінони: юглон, гідроюглону глюкозид, гідроюглон, β -гідроюглон [3, 6, 16, 28, 71, 75].

Досить широко представлена група флавоноїдів, зокрема, кверцетин, авікулярин (кверцетину 3-арабінозид), гіперозид (кверцетину 3-галактозид), кверцитрин (кверцетину 3-рамнозид), кемпферол, югланін (кемпферолу 3-арабінозид), антоціани (похідні ціанідину), а також група фенолкарбонових та гідроксикоричних кислот: галова, елагова, саліцилова, п-гіроксibenзойна, ванілінова, гентизинова, протокатехова, хлорогенова, кавова, п-кумарова, п-гідроксифенілмолочна, ферулова, синапова [28, 34, 43, 53].

Крім того, у складі листя *Juglans regia* L. виявлено компоненти ефірної олії монотерпенової та сесквітерпенової природи: борнілацетат, гумулен, лонгіфолен, камфен, γ -кадінен, δ -кадінен, капроновий альдегід, Δ^3 карен, каріюфілен, α -пінен, β -пінен, α -терпінеол, α -фелландрен, хамазулен [17, 28, 44].

Як супутні речовини в листі горіха волоського виявлено сапоніни, дубильні речовини, кумарини, алкалоїди (югландин), амінокислоти (аспарагінова кислота, аланін, аргінін, валін, гістидин, гліцин, ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, пролін, серин, тирозин, треонін, триптофан, цистин, цистин, триптофан, цистин, триптофан, триптофан, цистин, пролін, серін, пролін, тирозин, тирозин, треонін, цистин, цистин, цистин, цистин, триптофан, цистин, цистин, триптофан, цистин, фенілаланін), вітаміни (аскорбінова кислота, біотин, інозит, β -каротин, ксантини (віолаксантин, криптоксантин, неоксантин, флавоксантин), лютеїн, ніотинова кислота, пантотенова кислота,), макро- і мікроелементи, органічні кислоти, полісахариди [28, 75].

Листя горіха чорного містить нафтохінони (юглон), флавоноїди (кверцитрин (кверцетин-3-рамнозид), кверцетин 3-O-альфа-D-рамнофуранозид, астрагалін (кемпферол-3-глюкозид), міріцитрин (мірицетин-3-рамнозид), ефірну олію монотерпенової природи (гермакрен D, β -каріюфілен, α -пінен), алкалоїди (югландин), вітаміни (аскорбінова кислота,

каротиноїди, нікотинова кислота, тіамін, піридоксин, токофероли), дубильні речовини, органічні кислоти, макро- і мікроелементи. Склад листя горіха сірого, за даними літератури, вивчений недостатньо [28, 75].

Хімічний склад плодів горіха волоського представлений нафтохінонами (α -гідроюглон, β -гідроюглон, 1,4-нафтохінон, юглон, 5-глюкозид гідроюглону, менадіон, плюмбагін, 2,3-дигідро-5-гідрокси-1,4-нафтохінон, 2,3-дигідро-5-гідрокси-2-метил-1, 4-нафтохінон, 5-гідрокси-3-метил-1,4-нафтохінон, 2,3-диметил-5-гідрокси-1,4-нафтохінон), фенолкарбоновими кислотами (ванілінова, галова, гентизинова, п-гідроксибензойна, п-гідроксифенілмолочна, протокатехова, саліцилова, хлорогенова, елагова), фенілпропаноїдними метаболітами (п-кумарова, синапова, бузкова, ферулова), флавоноїдами (катехіни, проантоціанідини), дубильними речовинами, компонентами жирної олії, стероїдами (β -ситостерин або β ситостерол та його глюкозид - даукостерин), білками, органічними кислотами, полісахаридами, вітамінами (аскорбінова кислота, β -каротин, нікотинова кислота, тіамін, рибофлавін), макро- та мікроелементами. Хімічний склад плодів горіха чорного і горіха сірого також вивчений недостатньо [3, 5, 8, 28, 32, 52, 58, 87].

Таким чином, на сьогоднішній день досить глибоко досліджено хімічний склад листя і плодів горіха волоського. Ступінь фітохімічної розробленості інших представників роду *Juglans* (кора і листя *Juglans nigra* L., *Juglans cinerea* L.) є недостатнім для використання як нових видів лікарської рослинної сировини. Потрібне подальше фітохімічне дослідження різних видів рослинної сировини представників роду *Горіх*.

1.4. Фармакологічні властивості та застосування в медицині представників роду *Горіх*

Різноманітність хімічного складу, зокрема наявність великої кількості фенольних сполук, зумовлюють широкий спектр фармакологічної активності

представників роду Горіх (горіха волоського, горіха чорного і горіха сірого). У роботах із вивчення фармакологічної активності зазначених вище видів можна виокремити такі напрями: дослідження протимікробного, противірусного, протигрибкового, антиоксидантного, протизапального, протипухлинного, кардіо-, нейро-, гепатопротективного, гіполіпідемічного, такого, що впливає на когнітивну функцію, ефектів [23, 30]. Розглянемо деякі з них далі.

Водні екстракти незрілого жому плодів *J. regia* пригнічують ріст грампозитивних бактерій, при цьому золотистий стафілокок був найсприйнятливішою бактерією з мінімальною інгібуючою концентрацією (MIC) 0,1 мг/мл [51].

Юглон, виділений із горіха волоського, інгібує 3 ключові ферменти бактерії *Helicobacter pylori*: цистатіон- γ -синтазу (HrCGS), малонілCoA-трансацिलाзу білка-переносника ацилу (HrFabD) та β -гідроксіацилАСРдегідратазу (HrFabZ) [41].

Гексановий екстракт кори *J. regia* проявляє *in vitro* протимікобактеріальну туберкульозну активність із мінімальною інгібуючою концентрацією (MIK) 100 мкг/мл [22].

Також було виявлено антимикробну активність екстракту листя *J. regia* щодо пропіонової бактерії акне (*Propionibacterium acnes*), золотистого стафілокока (*S. aureus*) та епідермального стафілокока (*S. epidermidis*) [161]. Ефірна олія, отримана з листя *J. regia*, та її основні компоненти (β -пінен, α -пінен, лімонен, каріофілен) виявляли сильну антибактеріальну активність щодо *S. epidermidis*, *Salmonella typhi*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumonia* [155, 159]. [155, 159]. Водні та етанольні екстракти листя *J. regia* оцінювали також і на протизапальну активність. За каррагінан-індукованого набряку задньої лапи в мишей тільки етанольний екстракт *J. regia* виявляв протизапальну активність, не спричиняючи при цьому шлунково-кишкових розладів [29].

Клітини мікроглії типу BV-2, оброблені екстрактом *J. regia* перед стимуляцією LPS, показали зниження продукції оксиду азоту (NO) та експресії індукцибельної NO-синтетази. Також екстракт *J. regia* знижував вироблення фактора некрозу пухлини-альфа (ФНП- α). Таким чином, сировина волоського горіха чинить протизапальну дію в мікроглії, що може бути актуальним у плані профілактики та лікування нейродегенерацій [183]. Водний (2,87 і 1,64 г/кг) і етанольний (2,044 і 1,17 г/кг) екстракти *J. regia* показали антиноцицептивну активність у тестах гарячої пластинки; антиноцицептивний ефект, як вважають, діє через рецептори неопіоїдного типу. Також проводили випробування цих екстрактів на протизапальну активність, що було показано в тесті на ксилол [37].

Ефірну олію з листя *J. regia* аналізували на її антиоксидантну активність з використанням 2 різних аналізів "in vitro": поглинання 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразилу (DPPH) та гідроксильного радикала. Результати показали високу антиоксидантну активність за значень 50% інгібуючої концентрації (IC50) 34,5 і 56,4 мкг/мл відповідно [55].

На моделі окислювального стресу в щурів "in vivo", введення екстракту листя волоського горіха в дозах від 0,2 до 0,4 г/кг маси тіла протягом 4 тижнів сприяло захисту тварин від ушкоджень печінки, спричинених чотирихлористим вуглецем (CCl4). Крім того, в екстракті волоського горіха виявлено підвищений вміст антиоксидантних ферментів: супероксиддисмутази та каталази [27].

Основні флавоноїди, такі як кверцетин-3-рамнозид, кверцетин-3-Оарабінозид, кверцетин-3-ксилозид, похідне кемпферол-О-пентозиду, кверцетин-3-О-галактозид і кемпферол-О-пентозид, виділені з листя *J. regia*, показали значну радикал-поглинаючу активність при зниженні рівня активних форм кисню (АФК) у клітинах RAW264.7. Флавоноїди виявляють потенційну антиоксидантну активність і можуть бути використані для регулювання імунної системи та посилення протипухлинної активності [73].

Юглон, отриманий із хлороформного екстракту коріння *J. regia*, та його синтетичні триазолільні аналоги показали цитотоксичну активність проти різних видів ракових клітин людини, що містяться в легенях (NCI-H322 та A549), молочних залозах (T47D), шкірі (A-431), товстій кишці (Colo-205 та HCT-116) та простаті (PC-3 та DU-145). Синтетичні похідні триазолілу володіють високим рівнем цитотоксичності, але цей ефект є досить специфічним саме для ракових клітин легень. Деякі аналоги навіть продемонстрували вищу активність проти видів ракових клітин NCI-H322 і A549, ніж протираковий препарат BEZ235, який випускається (подвійний інгібітор фосфоінозитид-3-кінази і mTOR) [72].

Аналогічним чином, застосування жому недостиглих плодів волоського горіха та екстракту з кореня *J. regia* сприяло індукції апоптозу в ракових клітинах молочних залоз людини MDA-ME231 і в ракових клітинах передміхурової залози PC-3 шляхом підвищення експресії каспази 3, каспази 8 та гена Вах і пригнічення експресії гена Bcl-2 [10, 35].

Крім вищевказаних видів фармакологічної активності, для *Juglans regia* виявлено також гепатопротекторні властивості [66]. Проводилося дослідження, в якому мишам давали з їжею екзокарпій плодів волоського горіха (WP, 200 мг/кг), що являє собою тонку шкірку навколо ядра горіха. При цьому виявилось, що за його вживання значно зменшуються рівні сироваткової аспаргатамінотрансферази (AST) та аланінамінотрансферази (ALT) у печінці, пошкодженої чотирихлористим вуглецем, однак не чинить такого самого ефекту за пошкодження печінки D-галактозаміном (GalN). Такі компоненти, як теллімаграндини I, II та ругозин C, знижували ушкоджувальну активність тетрахлорметану на гепатоцити, тоді як теллімаграндин I та 2,3-Огексагідроксидифеноілглюкоза зменшували ушкодження, спричинене D-GalN.

Екстракт листя волоського горіха (у діапазоні від 0,2 до 0,4 г/кг маси тіла) проявив захисну активність щодо щурів із пошкодженою тетрахлорметаном печінкою за рахунок зниження сироваткових рівнів ALT,

AST і лужної фосфатази. Юглон, що виділяється з волоських горіхів, захищає печінку від HFD-індукованого ушкодження (ушкодження, спричинене дієтою з високим вмістом жирів) у щурів. Даний ефект здійснюється шляхом гальмування активності запальних цитокінів, таких як TNF- α , IL-1 β і IL6, за допомогою пригнічення toll-подібного рецептора і активації дії NF- κ B [53].

Крім того, згідно з літературними даними повідомлялося про подразнення і гіперпігментацію шкіри, пов'язані з місцевим застосуванням волоського горіха. Хоча й повідомляється, що у морських свинок волоський горіх є сильним сенсibilізатором, у людей контактна алергія зустрічається досить рідко [36].

У мишей напівмаксимальна летальна доза (LD50) при внутрішньоочеревинному введенні водного та етанольного екстракту листя *J. regia* становила 5,5 і 3,3 г/кг відповідно [37].

Згідно з дослідженнями Calabro та співавторів [15], юглон індукував ериптоз (суїцидальну загибель еритроцита), збільшуючи вміст кераміду та знижуючи рівень енергії і блокуючи активацію протеїнкінази C (PKC). У цьому дослідженні відбувалося значне зниження прямого розсіювання еритроцитів протягом 24 год при обробці еритроцитів людини юглоном у дозі 5 мкмоль/л. Крім того, юглон у дозах від 1 до 5 мкмоль/л значно підвищував відсоток зв'язування аннексину V. Аналогічно, у дозі 5 мкмоль/л юглон значно зменшував концентрацію АТФ в еритроцитах, а також збільшував вміст кераміду на поверхні еритроцитів [15].

Незважаючи на широкий спектр фармакологічної активності, види роду Горіх використовуються в офіциальній медицині невеликої кількості країн. Здебільшого зазначені рослини використовують у народній медицині. У традиційній медицині Китайської Народної Республіки листя горіха волоського застосовують як засіб, що має протизапальну, протимікробну, терпку, противірусну, гіпосенсibilізуючу і тонізуючу активності [45, 75]. Сировину горіха сірого в народній медицині Канади застосовують як антимікробний засіб [30].

Німецький препарат "Тонзілгон Н" являє собою водно-спиртовий екстракт коренів алтеї, квіток ромашки, трави хвоща, листя волоського горіха, трави деревію, кори дуба, а також трави кульбаби лікарської, і застосовується як антисептичний, протизапальний засіб для терапії гострих і хронічних захворювань верхніх дихальних шляхів (тонзиліт, фарингіт, ларингіт), а також профілактики ускладнень при респіраторних вірусних інфекціях [13, 54]. "Югланекс" випускається у формі рідкого екстракту плодів волоського горіха для прийому всередину [13, 54]. Володіє капіляррозміцнювальним, венотонізуювальним, антиоксидантним, протизапальним ефектом і застосовується у складі комплексної терапії хронічних захворювань вен [13, 54].

З рослинної сировини *Juglans regia* L. експериментально розроблено екстракти "Чеблін", "Чеблін СК-1", а також "Тодікамп", які володіють антипаразитарною, гепатопротекторною та імуномодулювальною активністю та застосовують під час терапії сифачіозу, ентеробіозу, аскаридозу та гетеракідозу [60, 82].

Рослинну сировину роду *Juglans* L. активно застосовують у гомеопатії, у зв'язку з відомою імуномодулювальною, протигрибковою, антимікробною, антипаразитарною, антиоксидантною та загальнозміцнювальною дією цих рослин [33]. Використовують гомеопатичні супозиторії на основі олійного екстракту навколоплідника горіха чорного [69]. У Республіці Молдова виробляють фітопрепарат "Nucina", до складу якого включено листя *Juglans regia* L.. Зазначений препарат чинить антибактеріальну та протигрибкову дію при ураженнях порожнини рота, глотки, дихальних шляхів [83].

БАД Є.П. Корненої, що містить порошок із листя горіха волоського, має превентивні властивості за йодною недостатністю, а також гепатопротекторну, гіполіпідемічну, гіпохолестеринемічну, гіпоглікемічну, антиоксидантну, антитоксичну активність.

Висновки до розділу 1

1. Рослинна сировина представників роду Горіх (*Juglans L.*) є перспективною для використання в медичній та фармацевтичній практиці.

2. Провідною групою БАС сировини видів роду Горіх є нафтохінони, представлені похідними юглону. Юглон як цільовий агент міститься в усіх видах рослинної сировини представників вищевказаного роду. Хімічний склад також відзначається другою групою сполук - флавоноїди (югланін, авікулярин, гіперозид, кверцетин, кемпферол. У сировині містяться супутні компоненти: фенолкарбонові кислоти, фенілпропаноїди, дубильні речовини, вітаміни та ефірна олія.

3 Широкий склад біологічно активних сполук видів рослинної сировини роду *Juglans L.* зумовлює різноманітність її фармакологічних властивостей. Аналіз робіт вітчизняних і зарубіжних учених дав змогу виявити антимікробну, протизапальну, антиоксидантну, протипухлинну, гепатопротекторну дію горіха волоського, горіха чорного та горіха сірого, що свідчить про перспективність подальшого вивчення видів вищевказаного роду.

4. У результаті аналізу літературних джерел щодо питань стандартизації, виявлено суперечливість у підходах до контролю якості рослинної сировини представників роду Горіх. Зазначена обставина свідчить про необхідність подальшого дослідження хімічного складу сировини та розробки уніфікованих методів стандартизації сировини видів роду Горіх.

5. Відсутність даних щодо нормативної документації в галузі контролю якості зазначених видів сировини обмежує її застосування у фармацевтичній та медичній практиці. У зв'язку з цим актуальним є проведення комплексних фармакогностичних досліджень, спрямованих на створення проектів фармакопейної статті для нових видів рослинної сировини.

РОЗДІЛ 2. РОЗРОБКА ПІДХОДІВ ДО СТАНДАРТИЗАЦІЇ СИРОВИНИ КОРИ ТА ЛИСТЯ ГОРІХА ЧОРНОГО (*JUGLANS NIGRA* L.)

2.1. Розробка методик якісного аналізу кори та листя горіха чорного методом ТШХ і спекрофотометрії

Проведене попереднє фармакогностичне дослідження дало змогу виокремити та ідентифікувати діагностично значущу сполуку кори горіха чорного - мірицитрин. Його зони адсорбції і виявляються у всіх хроматограмах зразків витягів кори горіха чорного (рис. 2.1). Тому як внутрішнього свідка нами пропонується використовувати стандартний зразок мірицитрину.

При дослідженні витягів із кори горіха чорного методом тонкошарової хроматографії встановлено хроматографічну зону адсорбції на рівні стандартного зразка мірицитрину ($R_f = 0,4$). Після процедури детектування фізичними (характер світіння в ультрафіолетовому світлі) та хімічними (ДСК та спиртовий розчин $AlCl_3$) методами ідентифікується сполука флавоноїдної природи, що за рухливістю та забарвленням відповідає СЗ мірицитрину (рис. 2.1).

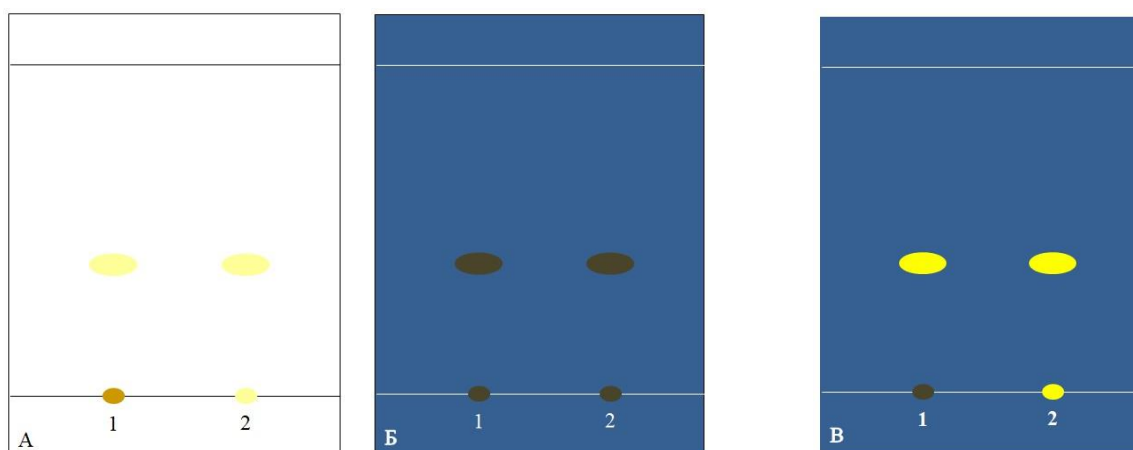


Рисунок 2.1 - Схема хроматограми аналізу водно-спиртових витяжок кори горіха чорного в системі розчинників хлороформ: етанол: вода (25:18:2): А - детекція у видимому світлі; Б - детекція в УФ-світлі за довжини

хвилі 365 нм; В - детекція детекція в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм після обробки спиртовим розчином хлориду алюмінію ($AlCl_3$) *Обозначення: 1 – 80% водно-спиртовое извлечение; 2 – СЗ мирицитрина.*

Методика визначення основних груп біологічно активних сполук (флавоноїдів). Випробуваний розчин кори *Juglans nigra L.*, спиртовий розчин СЗ мірицитрину об'ємом 20 мкл за допомогою скляної мікропіпетки наносять на лінію старту аналітичної хроматографічної платівки з сорбентом (силікагель) та закріплюють спиртом етиловим 96 %. Платівку з нанесеними пробами просушують, занурюють у хроматографічну камеру з елюентною системою хлороформ: етанол: вода (28:15:2) і хроматографують висхідним способом. Після досягнення фронтом елюентної системи 80-90% довжини платівки, її витягують із хроматографічної камери, висушують до видалення слідів елюентів і проглядають у видимому та УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм. Також пластинки обробляють лужним розчином діазобензолсульфо кислоти. Детектування хроматографічних пластин представлено в таблиці 2.1.

Попереднє фармакогностичне дослідження листя горіха чорного дало змогу виокремити та ідентифікувати дві діагностично значущі сполуки листя горіха чорного - мірицитрин та кверцитрин. Зони адсорбції зазначених індивідуальних речовин повинні виявлятися в хроматограмах зразків витягів листя горіха чорного (рис. 2.2). Тому як речовини-свідки ми пропонуємо використовувати СЗ мірицитрину і СЗ кверцитрину.

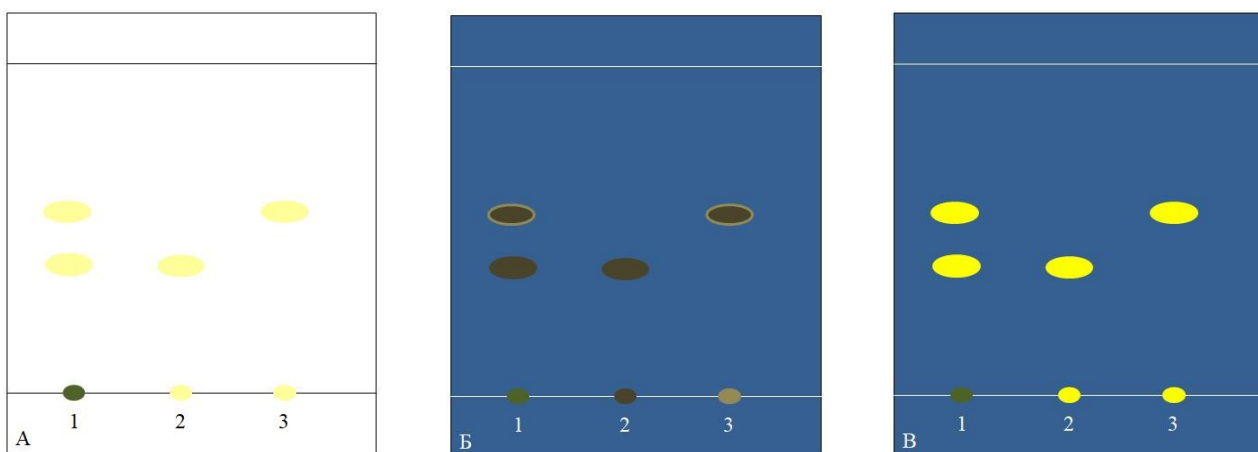


Рисунок 2.2 - Схема хроматограми аналізу водно-спиртового витягу
листя горіха чорного в системі розчинників хлороформ: етанол: вода
(25:18:2): А - детекція у видимому світлі; Б - детекція в УФ-світлі за довжини
хвилі 365 нм; В - детекція детекція в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм після
обробки спиртовим розчином хлориду алюмінію ($AlCl_3$)

Позначення: 1- 80% водно-спиртовий витяг; 2 - СЗ мірицитрину, 3 - СЗ
кверцитрину.

При дослідженні витягів із листя горіха чорного методом тонкошарової
хроматографії встановлено хроматографічні зони адсорбції на рівні
стандартних зразків мірицитрину ($R_f = 0,4$) і кверцитрину ($R_f = 0,65$). Після
процедури детектування фізичними (характер світіння в ультрафіолетовому
світлі) та хімічними (ДСК та спиртовий розчин $AlCl_3$) методами
ідентифікуються біологічно активні сполуки флавоноїдної природи, що за
рухливістю та забарвленням співпадають зі стандартними зразками
мірицитрину та кверцитрину.

*Методика визначення основних груп біологічно активних сполук
(флавоноїдів).* Випробуваний розчин листя *Juglans nigra L.*, спиртові розчини
СО мірицитрину і кверцитрину об'ємом 20 мкл за допомогою скляної
мікропіпетки наносять на лінію старту аналітичної хроматографічної платівки
з сорбентом (силікагель) та закріплюють спиртом етиловим 96 %. Платівку з
нанесеними пробами просушують, занурюють у хроматографічну камеру з
елюентною системою хлороформ: етанол: вода (28:15:2) і хроматографують

висхідним способом. Після досягнення фронтом елюентної системи 80-90% довжини пластинки, її витягають із хроматографічної камери, висушують до видалення слідів елюентів і проглядають у видимому та ультрафіолетовому світлі за довжини хвилі 365 нм. Потім пластинку обробляють 3% спиртовим розчином $AlCl_3$ і переглядають в УФ-світлі при $\lambda=365$ нм. Також пластинки обробляють лужним розчином діазобензолсульфо кислоти. Детектування хроматографічних пластин представлено в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Детектування основних зон адсорбції при аналізі рослинної сировини кори та листя *Juglans nigra* L.

Вид аналізованого зразка	R _f	Детекція у видимому світлі	Детекція в УФ-світлі (λ=365 нм)	Детекція AlCl ₃ і в УФ-світлі (λ=365 нм)	Детекція розчином діазобензолсульфо кислоти
Кора горіха чорного Хроматографічна зона № 1	0,40	Жовта	Темно-коричнева	Яскраво-жовта	Жовто-помаранчева
Листя горіха чорного Хроматографічна зона № 1	0,40	Жовта	Темно-коричнева	Яскраво-жовта	Жовто-помаранчева
Хроматографічна зона № 2	0,65	Жовта	Темно-коричнева зі світлою облямівкою	Яскраво-жовта	Жовто-помаранчева
СЗ мірицитрину	0,40	Жовта	Темно-коричнева	Яскраво-жовта	Жовто-помаранчева
СЗ кверцитрину	0,65	Жовта	Темно-коричнева зі світлою облямівкою	Яскраво-жовта	Жовто-помаранчева

Додатково для визначення автентичності сировини рекомендовано проведення спектрофотометричного аналізу. Випробовувані розчини витяжок кори та листя горіха чорного фотометрували та встановлювали максимуми поглинання (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

Встановлені значення максимумів поглинання випробовуваних розчинів витяжок кори та листя горіха чорного

Умови спектрофотометрії	Кора горіха чорного	Листя горіха чорного
Прямий метод	$\lambda_{\max 1}=270$ нм	$\lambda_{\max 1}=270$ нм
	$\lambda_{\max 2}=360$ нм	$\lambda_{\max 2}=356$ нм
Дифференційний метод	$\lambda_{\max}=416$ нм	$\lambda_{\max}=412$ нм

Таким чином, характер спектрів поглинання витяжок кори і листя горіха чорного дає змогу підтвердити отримані дані тонкошарової хроматографії та використання як стандартних зразків кверцитрину і мірицитрину під час розроблення методик кількісного аналізу.

2.2 Розробка методики кількісного визначення суми флавоноїдів у перерахунку на мірицитрин у корі горіха чорного

З метою розробки методики кількісного визначення суми флавоноїдів у корі горіха чорного за прототип було прийнято методику Чалешторі та співавторів. Аналіз вмісту флавоноїдів у листі *Juglans regia* L. здійснювали в перерахунку на рутин за $\lambda=415$ нм, пробопідготовку сировини проводили шляхом екстрагування 70 % етиловим спиртом [77].

Спираючись на зазначену методику, було визначено основні параметри пробопідготовки. Оптимальні умови екстракції флавоноїдів із кори горіха чорного для методики кількісного визначення суми флавоноїдів включають:

екстрагент - 80 % етиловий спирт; співвідношення "сировина-екстрагент" - 1:30; час екстракції на киплячій водяній бані - 60 хвилин, ступінь подрібнення сировини - 2 мм (табл. 2.3).

Таблиця 2.3

Вплив умов екстракції на ступінь вилучення суми флавоноїдів із кори *Juglans nigra* L.

№ п.п.	Екстрагент	Співвідношення сировина: екстрагент	Час екстракції, хв	Ступінь подрібнення сировини, мм	Зміст суми флавоноїдів у перерахунку на міріцитрин і абсолютно суху сировину (в %)
Вибір екстрагента					
1.	40% етиловий спирт	1:30	60	2	2,49±0,20
2.	50% етиловий спирт	1:30	60	2	2,67±0,23
3.	60% етиловий спирт	1:30	60	2	2,78±0,29
4.	70% етиловий спирт	1:30	60	2	2,95±0,26
5.	80% етиловий спирт	1:30	60	2	3,09±0,27
6.	90% етиловий спирт	1:30	60	2	2,87±0,24
7.	96% етиловий спирт	1:30	60	2	2,68±0,25
Визначення часу екстракції					
8.	80% етиловий спирт	1:30	30	2	2,75±0,22
9.	80% етиловий спирт	1:30	45	2	2,93±0,24
10.	80% етиловий спирт	1:30	60	2	3,14±0,25
11.	80% етиловий спирт	1:30	90	2	2,95±0,28
12.	80% етиловий спирт	1:30	120	2	2,83±0,26

Співвідношення «сировина: екстрагент»					
13.	80% етиловий спирт	1:20	60	2	2,98±0,27
14.	80% етиловий спирт	1:30	60	2	3,12±0,23
15.	80% етиловий спирт	1:50	60	2	3,06±0,28
Ступінь подрібнення сировини					
16.	80% етиловий спирт	1:30	60	1	2,85±0,22
17.	80% етиловий спирт	1:30	60	2	3,17±0,27
18.	80% етиловий спирт	1:30	60	3	2,79±0,29

Методика кількісного визначення суми флавоноїдів у корі горіха чорного.

Аналітичну пробу кори *Juglans nigra* L. подрібнюють до розміру часток, що проходять крізь сито з отворами діаметром 2 мм. У термостійку конічну колбу зі шліфом місткістю 100 мл поміщають близько 1,0 г подрібненої сировини (точна наважка), додають 30 мл спирту етилового 80 % концентрації. Колбу закривають корком і зважують на тарованих вагах із похибкою $\pm 0,01$ г і залишають на 1 годину. Колбу приєднують до зворотного холодильника і нагрівають на киплячій водяній бані (помірне кипіння) протягом 1 години. Після охолодження протягом 30 хв отриманого витягу, колбу закривають тим самим корком, зважують і вміст за необхідності поповнюють екстрагентом до початкового значення. Вміст колби фільтрують через паперовий фільтр червона смуга (розчин А випробовуваного витягу). Випробований розчин: 1,0 мл розчину А випробовуваного витягу поміщають у мірну колбу місткістю 50 мл, додають 2 мл 3 % спиртового розчину алюмінію хлориду та доводять об'єм розчину до мітки спиртом етиловим 96 % концентрації (розчин Б випробовуваного витягу). Оптичну густину розчину Б випробовуваного витягу вимірюють на спектрофотометрі за довжини хвилі 416 нм через 40

хвилин після приготування. Як розчин порівняння використовують розчин, що складається з 1,0 мл розчину А випробовуваного витягу (1:30), доведеного спиртом 96 % до мітки в мірній колбі місткістю 50 мл.

Примітка: Приготування розчину мірицитрину-стандартного зразка. Близько 0,02 г (точна наважка) мірицитрину поміщають у мірну колбу місткістю 50 мл, розчиняють у 20 мл 96 % етилового спирту при нагріванні на водяній бані. Після охолодження вмісту колби протягом 30 хвилин, доводять об'єм розчину 96 % етиловим спиртом до мітки (розчин А мірицитрину). 1,0 мл розчину А розчину СО мірицитрину поміщають у мірну колбу місткістю 25 мл, додають 2 мл 3 % спиртового розчину алюмінію хлориду і доводять об'єм розчину до мітки спиртом етиловим 96 % (випробовуваний розчин Б мірицитрину). Оптичну густину розчину Б вимірювали на спектрофотометрі при довжині хвилі 416 нм через 40 хвилин після приготування. Як розчин порівняння використовують розчин, що складається з 1,0 мл розчину А мірицитрину, доведеного спиртом 96 % до мітки в мірній колбі місткістю 25 мл (розчин порівняння Б мірицитрину).

Вміст суми флавоноїдів у перерахунку на мірицитрин та абсолютно суху сировину у відсотках (X) обчислюють за формулою:

$$x = \frac{A * m_0 * 30 * 50 * 1 * 100 * 100}{A_0 * m * 50 * 25 * (100 - W) } ,$$

де А - оптична густина випробовуваного розчину;

А₀ - оптична густина розчину СО мірицитрину; m - маса сировини, г; m₀ - маса СО мірицитрину, г;

W - втрата в масі при висушуванні, %.

Для цілей кількісного визначення суми флавоноїдів у перерахунку на мірицитрин за відсутності стандартного зразка мірицитрину було експериментально визначено значення показника екстинкції (питомий показник поглинання). Його величина при довжині хвилі 416 нм становить 432.

$$x = \frac{A * 30 * 50 * 100}{m * 432 * (100 - W)},$$

де А - оптична густина випробуваного розчину; m - маса сировини, г;
m₀ - маса СО мірицитрину, г;

432 - питомий показник поглинання (Е1см) СО мірицитрину за 416 нм;

W - втрата в масі під час висушування, %.

Таблиця 2.4

Вміст суми флавоноїдів у зразках кори *Juglans nigra* L.

№ п/п	Номер зразка	Зміст суми флавоноїдів в абсолютно сухій сировині (у %) у перерахунку на мірицитрин
1.	Зразок 1	3,09±0,21
2.	Зразок 2	2,94±0,24
3.	Зразок 3	3,17±0,27
4.	Зразок 4	3,02±0,26

З використанням методики нами проаналізовано низку зразків кори горіха чорного (табл. 2.4). Визначено, що вміст суми флавоноїдів у перерахунку на мірицитрин у корі горіха чорного варіює від 2,94 % до 3,17 %.

2.3. Розробка методики кількісного визначення суми флавоноїдів у перерахунку на мірицитрин у листі горіха чорного

Зазначена раніше методика кількісного визначення суми флавоноїдів також була модифікована і для листя горіха чорного.

Для рослинної сировини листя *Juglans nigra* L. були визначені основні параметри пробопідготовки. Оптимальні умови екстракції флавоноїдів із листя *Juglans nigra* L. методики кількісного визначення суми флавоноїдів включають: екстрагент - 80 % етиловий спирт; співвідношення "сировина-екстрагент" - 1:30; час екстракції на киплячій водяній бані - 30 хв, ступінь подрібнення сировини - 2 мм (табл. 2.5).

Таблиця 2.5

Вплив умов екстракції на ступінь вилучення суми флавоноїдів із листя

Juglans nigra L.

№ п.п.	Екстрагент	Співвідношення сировина: екстрагент	Час екстракції, хв	Ступінь подрібнення, мм	Зміст суми флавоноїдів у перерахунку на міріцитрин н абсолютно суху сировину (%)
Вибір екстрагента					
1.	40% етиловий спирт	1:30	60	2	2,75±0,28
2.	50% етиловий спирт	1:30	60	2	2,82±0,26
3.	60% етиловий спирт	1:30	60	2	2,91±0,25
4.	70% етиловий спирт	1:30	60	2	3,02±0,27
5.	80% етиловий спирт	1:30	60	2	3,11±0,25
6.	90% етиловий спирт	1:30	60	2	3,04±0,29
7.	96% етиловий спирт	1:30	60	2	2,85±0,23
Визначення часу екстракції					
8.	80% етиловий спирт	1:30	15	2	2,86±0,24
9.	80% етиловий спирт	1:30	30	2	3,24±0,26
10.	80% етиловий спирт	1:30	45	2	3,05±0,28
11.	80% етиловий спирт	1:30	60	2	2,86±0,25
12.	80% етиловий спирт	1:30	90	2	2,75±0,21
13.	80% етиловий спирт	1:30	120	2	2,65±0,27
Співвідношення «сировина: екстрагент»					
14.	80% етиловий спирт	1:20	30	2	3,04±0,26
15.	80% етиловий спирт	1:30	30	2	3,22±0,22

16.	80% етиловий спирт	1:50	30	2	3,15±0,28
Ступінь подрібнення сировини					
17.	80% етиловий спирт	1:30	30	1	3,10±0,25
18.	80% етиловий спирт	1:30	30	2	3,28±0,27
19.	80% етиловий спирт	1:30	30	3	3,05±0,23

Методика кількісного визначення суми флавоноїдів у листі горіха чорного. Аналітичну пробу листя *Juglans nigra* L. подрібнюють до розміру часток, що проходять крізь сито з отворами діаметром 2 мм. У термостійку конічну колбу зі шліфом місткістю 100 мл поміщають близько 1,0 г подрібненої сировини (точна наважка), додають 30 мл спирту етилового 80 % концентрації. Колбу закривають мепробкою і зважують на тарованих вагах із похибкою $\pm 0,01$ г і залишають на 1 годину. Колбу приєднують до зворотного холодильника і нагрівають на киплячій водяній бані (помірне кипіння) протягом 3 про 0 хвилин. Після охолодження протягом 30 хв отриманого витягу, колбу закривають тим самим корком, зважують і вміст, якщо потрібно, заповнюють екстрагентом до початкового значення. Вміст колби фільтрують через паперовий фільтр червона смуга (розчин А випробовуваного витягу). Випробований розчин: 1,0 мл розчину А випробовуваного витягу поміщають у мірну колбу місткістю 50 мл, додають 2 мл 3 % спиртового розчину алюмінію хлориду і доводять об'єм розчину до мітки спиртом етиловим 96 % концентрації (розчин Б випробовуваного витягу). Оптичну густину розчину Б випробовуваного витягу вимірюють на спектрофотометрі за довжини хвилі 416 нм через 40 хвилин після приготування. Як розчин порівняння використовують розчин, що складається з 1,0 мл розчину А випробовуваного витягу (1:30), доведеного спиртом 96 % до мітки в мірній колбі місткістю 50 мл.

Вміст суми флавоноїдів у перерахунку на мірицитрин і абсолютно суху сировину у відсотках (X) обчислюють за формулою:

$$x = \frac{A * m_0 * 30 * 50 * 1 * 100 * 100}{A_0 * m * 50 * 25 * (100 - W)},$$

де А - оптична густина випробуваного розчину; А₀ - оптична густина розчину СО мірицитрину; m - маса сировини, г; m₀ - маса СО мірицитрину, г; W - втрата в масі при висушуванні, %.

Для цілей кількісного визначення суми флавоноїдів у перерахунку на мірицитрин за відсутності стандартного зразка мірицитрину було експериментально визначено значення показника екстинкції (питомий показник поглинання). Його величина при довжині хвилі 416 нм становить 432.

$$x = \frac{A * 30 * 50 * 100}{m * 432 * (100 - W)},$$

де А - оптична густина випробуваного розчину; m - маса сировини, г; m₀ - маса СО мірицитрину, г;

432 - питомий показник поглинання (Е1см) СО мірицитрину при 416 нм;

W - втрата в масі при висушуванні, %.

З використанням розробленої методики нами проаналізовано низку зразків листя горіха чорного (табл. 16) .Визначено, що вміст суми флавоноїдів у перерахунку на мірицитрин у листі горіха чорного від 3,02 % до 3,28 %.

Таблиця 2.6

Вміст суми флавоноїдів у зразках листя *Juglans nigra* L.

№ п/п	Номер зразка	Зміст суми флавоноїдів в абсолютно сухій сировині (у %) у перерахунку на мірицитрин
1.	Зразок 1	3,17±0,26
2.	Зразок 2	3,02±0,23
3.	Зразок 3	3,28±0,27
4.	Зразок 4	3,11±0,25

Таким чином, результати проведених досліджень свідчать про раціональність контролю якості кори та листя горіха чорного за допомогою методики визначення суми флавоноїдів у перерахунку на мірицитрин методом спектрофотометрії за аналітичної довжини воли 416 нм.

2.4. Вивчення динаміки накопичення біологічно активних сполук у листі горіха чорного

Під впливом умов середовища вміст БАС протягом вегетаційного періоду рослини може постійно коливатися. Існує необхідність у дослідженні визначення рівня вмісту та динаміки накопичення діючих речовин у досліджуваній сировині для створення рекомендацій щодо раціональної заготівлі лікарської рослинної сировини.

Досліджували зразки листя горіха чорного (*Juglans nigra* L.), зібрані під час вегетаційного періоду (травень-вересень) у Ботанічному саду. Для аналізу отримували водноспиртові випробовувані витяжки листя *Juglans nigra* L., а також СО мірицитрину та оцінювали вміст суми дафлавоноїдів у перерахунку на мірицитрин у листках горіха чорного за умов диференціальної спектрофотометрії за $\lambda = 416$ нм.

Результати проведеного аналізу динаміки накопичення суми флавоноїдів у листі горіха чорного представлено в таблиці 2.7. Аналізуючи отримані результати, можна зробити висновок про те, що кількість флавоноїдів у листках *Juglans nigra* L. варіює протягом вегетаційного періоду. Найбільша концентрація зазначеної групи БАС у листках *Juglans nigra* L. вегетаційного періоду кожного з трьох років припадає на кінець травня і початок червня.

Таким чином, збирання листя горіха чорного рекомендується проводити в період кінця травня і початку червня.

Таблиця 2.7

Результати визначення динаміки накопичення суми флавоноїдів в листі горіха чорного протягом вегетаційного періоду

Найменування зразка (місяць)	Зміст суми флавоноїдів у абсолютно сухій сировині в перерахунку на мірицитрин , %
Травень	3,20±0,27
Червень	3,06±0,29
Початок липня	2,86±0,23
Кінець липня	2,56±0,24
Середина серпня	2,63±0,26
Кінець серпня	2,81±0,24
Середина Вересня	3,02±0,27

Висновки до розділу 2

1. Розроблено методики визначення мірицитрину та кверцитрину у водноспиртових витяжках кори та листя *Juglans nigra* L. методом хроматографії в тонкому шарі сорбенту. Як речовини-свідки рекомендовано використовувати стандартні зразки мірицитрину і кверцитрину.

2. Встановлено максимуми поглинання витягів кори та листя горіха чорного. Для кори та листя *Juglans nigra* L. в умовах диференціальної

спектрофотометрії максимуми поглинання визначено за довжини хвилі 416 ± 2 нм і 412 ± 2 нм відповідно, що відповідають максимуму поглинання розчину СЗ мірицитрину.

3. Розроблено методики кількісного оцінювання вмісту флавоноїдів у перерахунку на мірицитрин для рослинної сировини кори та листя *Juglans nigra* L. в умовах диференціальної спектрофотометрії за $\lambda=416\pm 2$ нм.

4. Вміст суми флавоноїдів у перерахунку на мірицитрин у корі та листі *Juglans nigra* L. варіює в межах від 2,94 % до 3,17 %, і від 3,02 % до 3,28 % відповідно.

5. Вміст мірицитрину в корі *Juglans nigra* L. варіює в межах від 3,08 % до 3,14 %. Вміст мірицитрину і кверцитрину в листках *Juglans nigra* L. варіює в межах від 2,58 % до 2,67 % і 1,36 % до 1,45 % відповідно.

6. Величина числового показника вмісту флавоноїдів у перерахунку на мірицитрин для рослинної сировини кори та листя *Juglans nigra* L. не менше ніж 2,5 % і не менше ніж 3,0 % відповідно. Запроваджено числовий показник вмісту мірицитрину та кверцитрину для зазначених видів сировини: мірицитрину не менше 2,0 % і 1,5 % для кори та листя відповідно; кверцитрину не менше 1,0 % для листя *Juglans nigra* L.

РОЗДІЛ 3. МОРФОЛОГО-АНАТОМІЧНЕ ВИВЧЕННЯ СИРОВИНИ ОКРЕМИХ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ JUGLANS L.

Одним із початкових етапів контролю якості рослинної сировини є визначення її доброякісності методами морфологоанатомічного аналізу. Метою дослідження є можливість окремо діагностувати цільовий вид сировини та домішкових видів. Цей метод діагностики рослинної сировини є одним із ключових у фармацевтичному аналізі [79].

У літературних джерелах міститься інформація про застосування в офіційній і народній медицині перспективних морфологічних органів РС видів роду Горіх - кори, листя і навколоплідників [18, 25, 33, 35, 40]. До Фармакопеї Китайської Народної Республіки 2020 року включено ФС на плоди горіха волоського, в якій міститься розділ про ідентифікацію плодів за морфолого-мікроскопічними ознаками. У нашій країні відсутня нормативна документація, що офіційно регламентує якість РС. За літературними даними відомо, що зарубіжні та вітчизняні вчені активно виявляли інтерес до морфолого-анатомічного дослідження РС представників роду Горіх. У літературі описано зовнішні та анатомо-мікроскопічні ознаки листків [20, 28, 34], кори [19, 28] та навколоплідників *Juglans L.* [7, 21, 55]. Цієї інформації недостатньо для морфолого-анатомічної характеристики кожного виду окремо.

Питання підтвердження автентичності РС представників роду Горіх ґрунтується лише на морфолого-гістологічних особливостях рослин, тому залишається актуальним напрямом. Люмінесцентний мікроскопічний аналіз як один із сучасних і перспективних методів підтвердження автентичності РС дає змогу детектувати локалізацію вторинних метаболітів, що мають діагностичне значення [12, 79].

Для включення рослинної сировини видів роду Горіх до Державної Фармакопеї необхідно доповнити вже існуючі результати морфолого-

анатомічного аналізу з метою проєктів Фармакопейної статті "Горіха чорного кора", "Горіха чорного листя" в частині "Мікроскопічні ознаки".

У цьому розділі представлено результати вивчення морфолого-анатомічних особливостей діагностики кори та листя горіха плода чорного з використанням люмінесцентної мікроскопії.

3.1. Морфолого-анатомічне дослідження кори горіха чорного (*Juglans nigra* L.) з використанням методу люмінесцентної мікроскопії

Вченими було розроблено основні характеристики автентичності кори видів роду *Juglans*, у тому числі й горіха чорного - *Juglans nigra* L [19, 28]. Встановлено, що кора горіха чорного за зовнішніми ознаками являє собою трубчасті, жолобуваті або плоскі шматочки кори завдовжки до 15 см і завширшки 2-3 см.

Зовнішня поверхня беда кори темносірого кольору, грубо шорстка з великими сочевичками і тріщинами. З внутрішнього боку кора світло-жовта, майже біла. На зламі кора рівна не ворсиниста. За зовнішніми ознаками відрізняється від інших видів кори наявністю сильно шорсткої зовнішньої поверхні з тріщинами, світлішого внутрішнього боку [19, 28].



Рисунок 3.1 - Зовнішній вигляд кори роду *Juglans* L.: А - кора горіха чорного (*Juglans nigra* L.); Б - кора горіха волоського (*Juglans regia* L.); В - кора горіха сірого (*Juglans cinerea* L.).

На поперечному зрізі діагностується досить розвинена перидерма, виявляється тонкий корковий шар від темно-коричневого до дочірнього кольору з клітинами неправильної форми та фрагментами відлущеного корка минулого року. При розгляді коркової тканини можуть діагностуватися особливі утворення - чечевички. За рахунок чергування листя серцевинних променів і твердого та м'якого кола лубу в коров'ячій частині можна легко візуалізувати зону флоєми (від камбію до периферії). У ділянці чергування твердого і м'якого кола лубу чітко видно групи луб'яних волокон, клітинні стінки яких за денного світла жовтого кольору. Стінки луб'яних волокон активно товсті, шаруваті, здерев'янілі. У вторинній корі розташовані одно-трирядні серцевинні промені; трапляються групи склеренхімних клітин із потовщеними здерев'янілими шаруватими стінками. Основна паренхіма кори дрібноклітинна. Протопласти клітин пігментовані в бурий, світло-жовтий колір. У клітинах паренхіми, особливо первинної, виокремлюються фрагменти механічної тканини - брахісклеріди, і скупчення друз оксалату кальцію зірчастої форми [19, 28].

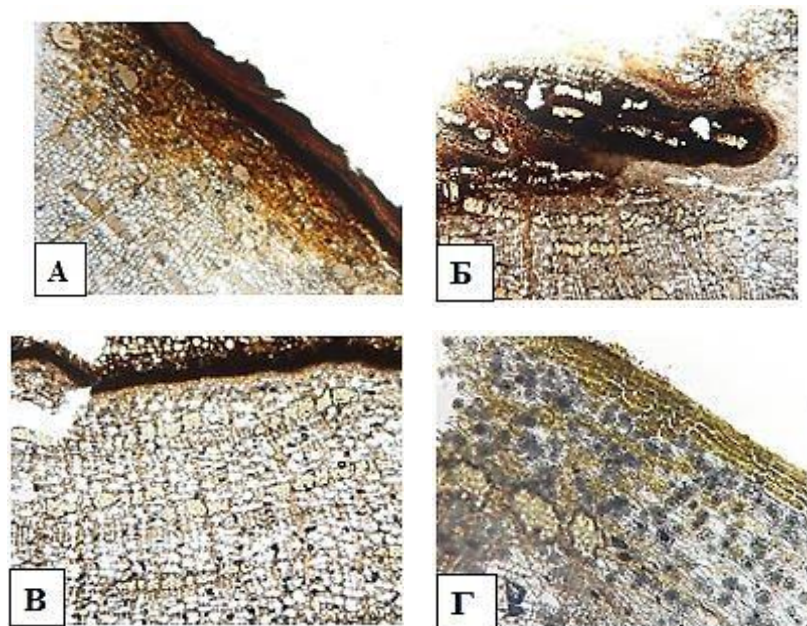


Рисунок 3.2 - Анатомічна будова кори горіха чорного: А - поперечний зріз - перидерма кори (x 40); Б - фрагмент корку (фелеми) - поперечний переріз (x 40);

В - фрагмент луб'яної частини кори (x 40); Г - фрагмент основної паренхіми кори горіха чорного (x 40).

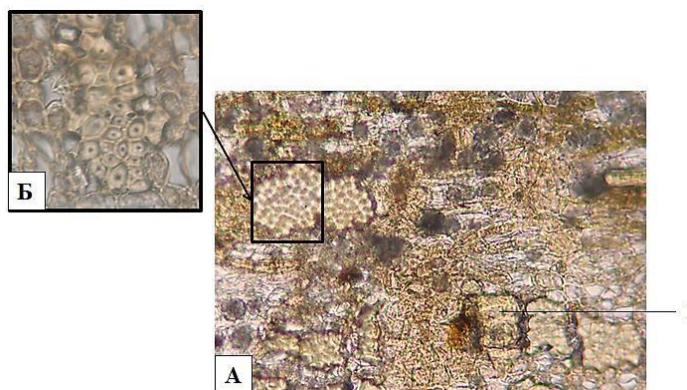


Рисунок 3.3 - Анатомічна будова кори горіха чорного: А - (x100); Б - групи склеренхімних клітин на поперечному зрізі (x400).

Позначення: 1 - брахісклереїди

На першому етапі основного дослідження з використанням методу люмінесцентної мікроскопії проводили вивчення зовнішнього вигляду кристалів юглону, що містяться в корі горіха чорного за літературними даними, а також деяких сполук в дмф флавоноїдної структури за денного світла, а також з використанням УФ-світла.

Аналіз СО юглону показав, що у видимому світлі його кристали мають жовтувато-оранжеве забарвлення. Під час опромінення зразка сполуки УФ-світлом з довжиною хвилі 360 нм і 420 нм юглон має більш яскравий помаранчевий колір люмінесценції.

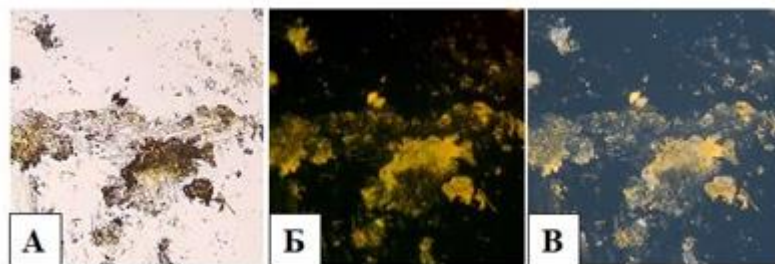


Рисунок 3.4 - Дослідження зовнішнього вигляду кристалів юглону: А - денне світло; Б - опромінення УФ-світлом $\lambda=420$ нм; В - опромінення УФ-світлом $\lambda=360$ нм.

Попередньому мікролюмінесцентному аналізу також піддавалися проби СЗ флавоноїдів: мірицитрину, кемпферолу, кверцетину і кверцитрину. Зазначено, що монозидні форми флавонолів (мірицитрин, кверцитрин) в УФ-світлі за довжини хвилі 420 нм люмінесціюють яскраво-жовтим кольором, на відміну від агліконів. При 360 нм мірицитрин має жовте світіння, а кверцитрин - помаранчеве. Кемпферол у ділянці видимого спектра за $\lambda = 420$ нм має зелено-жовте світіння, а кверцетин має помаранчеву люмінесценцію. За $\lambda = 360$ нм кемпферол люмінесціює зеленим кольором; кверцитрин має жовте світіння. У результаті мікроскопічного дослідження встановлено, що люмінесценція досліджуваних кристалів флавоноїдів найактивніша при опроміненні лампою з довжиною хвилі 360 нм.

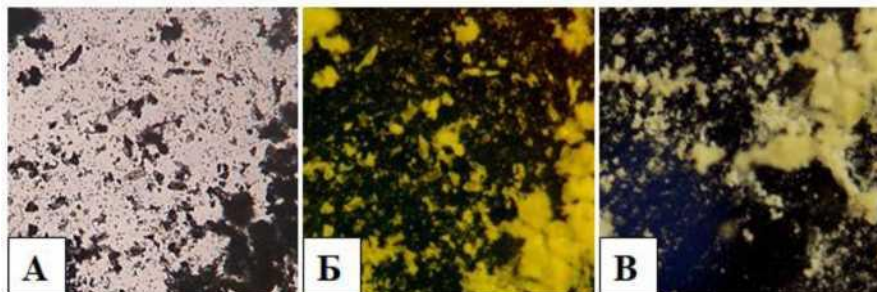


Рисунок 3.4 - Дослідження зовнішнього вигляду кристалів мірицитрину:
А - денне світло; Б - опромінення УФ-світлом $\lambda=420$ нм; В - опромінення УФ-
світлом $\lambda=360$ нм.

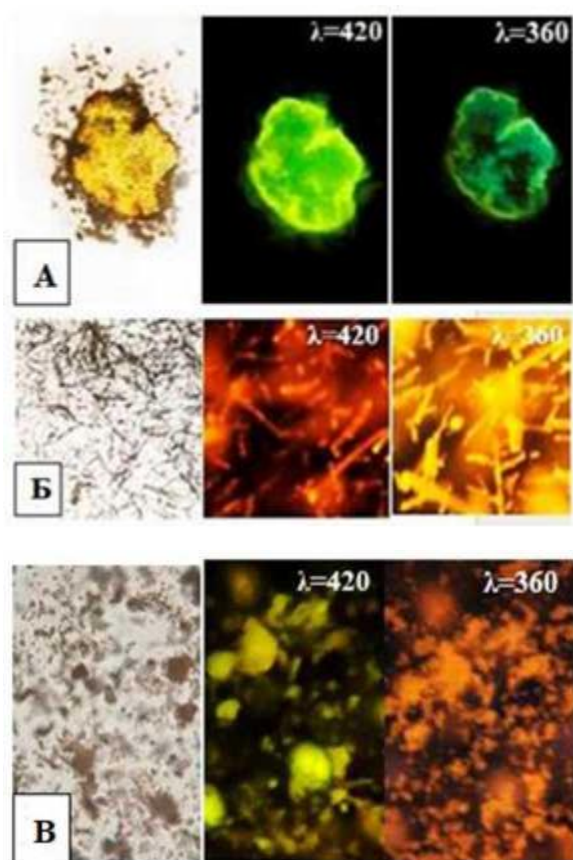


Рисунок 3.5 - Дослідження зовнішнього вигляду кристалів флавоноїдів під мікроскопом: А - кемпферол; Б - кверцетин; В - кверцитрин.

Позначення: денне світло, опромінення УФ-світлом з $\lambda=420$ нм

На подальшому етапі роботи оцінювалося світіння різних анатомічних об'єктів кори горіха чорного. Зокрема, під час опромінення зрізу УФ-світлом з $\lambda = 360$ нм видно яскраве блакитне світіння зони корку і твердого лубу.

У ділянці чергування твердого і м'якого лубу чітко видно групи луб'яних волокон, клітинні стінки яких за денного світла жовтого кольору. Під час опромінення їх УФ-світлом з довжиною хвилі 360 нм вони люмінесціюють світло-блакитним кольором завдяки наявності в стінках лігнінових структур, а

під час опромінення світлом з $\lambda = 420$ нм стінки луб'яних волокон люмінесціюють жовтим, що також характерно для лігніну.

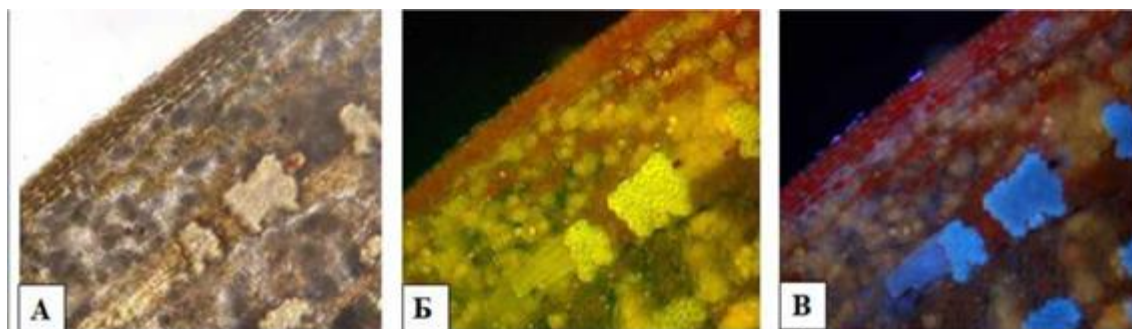


Рисунок 3.6 - Кора горіха чорного - поперечний переріз (x40).

Позначення: А - денне світло; Б - опромінення УФ-світлом $\lambda = 420$ нм; В - опромінення УФ-світлом 360 нм.

При найближчому розгляді (на $\times 400$) на поперечному зрізі об'єкта видно бурий корковий шар із численних рядів клітин. Основна паренхіма кори дрібноклітинна. Протопласти клітин пігментовані у світло-жовтий і світло-помаранчевий колір. Під час реалізації люмінесцентної мікроскопії було виявлено різні особливості світіння в УФ-світлі за $\lambda = 360$ нм. Встановлено, що коркова тканина люмінесціює яскраво-блакитним світінням за рахунок наявності в ній фенольного полімеру суберину і простих фенольних сполук. Під час опромінення коркової тканини світлом з $\lambda = 420$ нм клітинна стінка корка люмінесціює жовтим кольором, залишки протопластів - темнобурим.

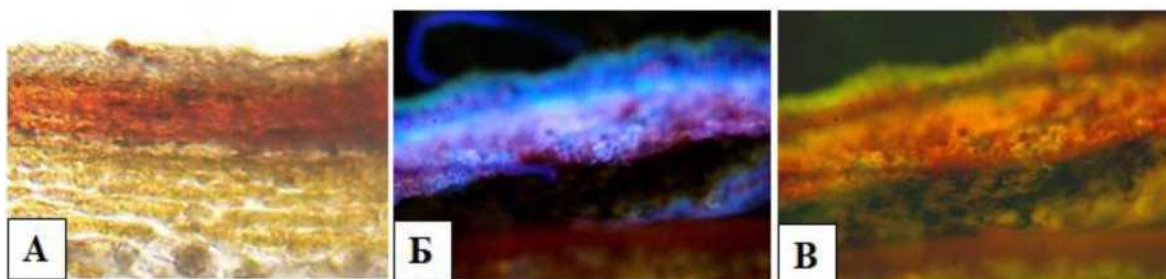


Рисунок 3.7 - Фрагмент корка (фелеми) - поперечний переріз (x 100).

Позначення: А - денне світло; Б - при опроміненні УФ-світлом $\lambda = 420$ нм; В - при опроміненні УФ-світлом $\lambda = 360$ нм.

Основна паренхіма м'якого лубу, представлена тонкостінними клітинами, усередині яких трапляються друзи оксалату кальцію, люмінесціюють слабо переважно за рахунок клітинних стінок. В УФ-світлі вони світло-сірі, при $\lambda = 420$ нм - світло-жовті. В УФ-світлі за $\lambda = 360$ нм протопласти клітин, діагностовані на зрізах, світяться незначно від бурого до червоного в основному за рахунок пігментів фотосинтезу.

В основній паренхімі кори горіха чорного з високою частотою відтворюваності у видимому світлі детектуються скупчення світло-жовтих або безбарвних кристалів. При мікроскопуванні вони виглядають як темні плями, оскільки відбивають світло. В УФ-світлі довжиною хвилі 360 нм детектується характерне жовте й помаранчеве світіння кристалів речовини.

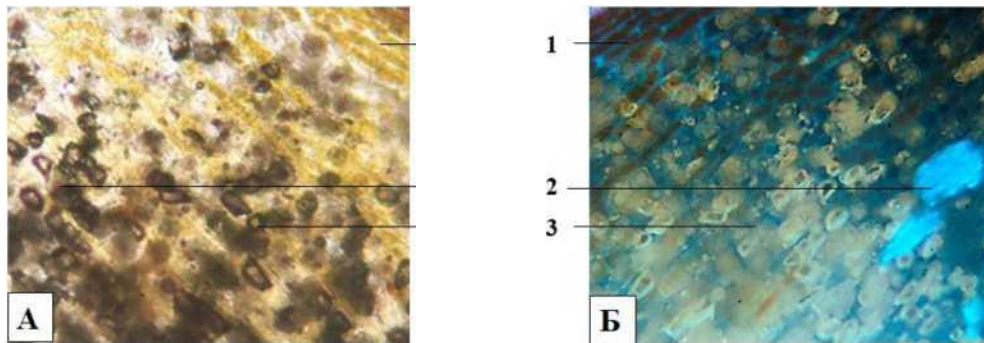


Рисунок 3.7 - Фрагмент основної паренхіми кори горіха чорного - поперечний переріз (x 100). Позначення: А - денне світло; Б - за опромінення УФ-світлом з довжиною хвилі 360 нм. 1 - колленхіма; 2 - луб'яні волокна; 3 - дрібнокристалічні включення

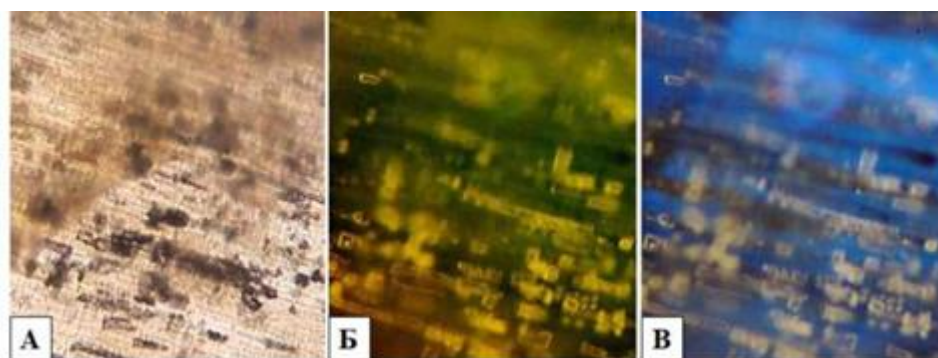


Рисунок 3.8 - Фрагмент основної паренхіми кори горіха чорного - поздовжній переріз (x 100). Позначення: А - денне світло; Б - при опроміненні УФ-світлом з довжиною хвилі 420 нм; В - при опроміненні УФ-світлом з довжиною хвилі 360 нм.

Подібні включення локалізуються і в поздовжньому зрізі кори горіха чорного. Під час опромінення зразків мікропрепаратів УФ-світлом $\lambda=360$ нм і 420 нм виявляється характерне жовте і помаранчеве світіння подібних кристалічних включень. Виявлені особливості люмінесценції відповідають характеру світіння мірицитрину і юглону

3.2. Морфолого-анатомічне дослідження листя горіха чорного (*Juglans nigra* L.) з використанням методу люмінесцентної мікроскопії

Відповідно до літературних даних було підтверджено відповідні діагностичні ознаки. Листки горіха чорного цільні або частково подрібнені, складні, непарнопір'ястого листорозташування, довгочерешкові, завдовжки 20-30 см, завширшки 10 см з пір'ястим жилкуванням. Окремі листові пластинки вузькоюйцеподібною або еліптичною форми із загостреною верхівкою, при основі дещо нерівнобокi із зубчастим краєм. Опушення діагностується з абаксiального боку. Листки з верхнього боку зелені, знизу світліші. [20, 28].

За зовнішніми ознаками відрізняється від інших видів листя формою листових пластин (горіх волоський), наявністю середнього ступеня опушеності з абаксіального боку (горіх сірий).

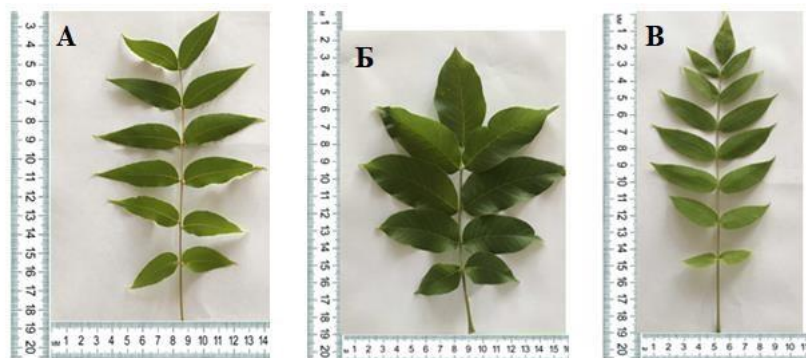


Рисунок 3.9 - Зовнішній вигляд листя роду *Juglans* L.: А - листя горіха чорного (*Juglans nigra* L.); Б - листя горіха волоського (*Juglans regia* L.); В - листя горіха сірого (*Juglans cinerea* L.).

Під час розгляду верхнього боку листової пластинки з поверхні виявляються клітини епідермісу прямокутної мета форми з тонкими і звивистими стінками.

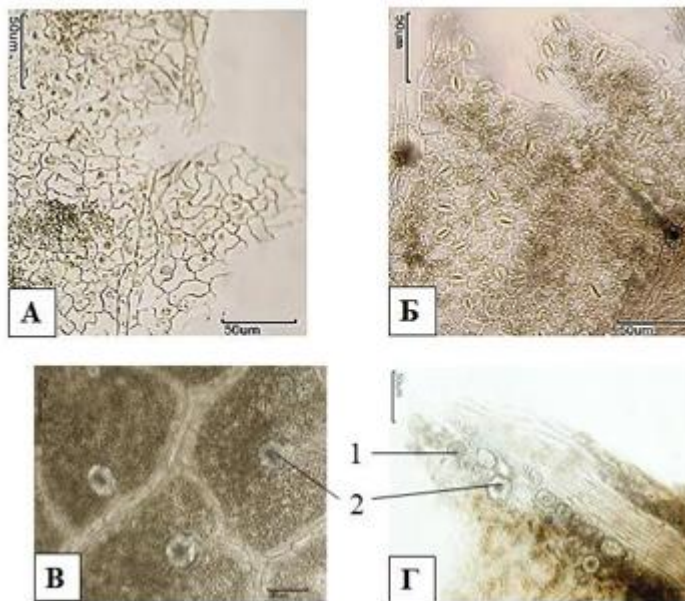


Рисунок 3.10 - Анатомія листової пластинки листка горіха чорного: А - епідерміс верхнього боку листової пластинки (х 400); Б - епідерміс нижнього

боку листкової пластини (x400); В - епідерміс верхнього боку листкової пластини з включеннями (x400); Г - епідерміс жилки нижнього боку листкової пластини з включеннями (x400).

При розгляді нижнього боку листової пластинки виявляються клітини епідермісу зі звивистими тонкими стінками. Продихові апарати листових пластинок аномоцитного типу, а також локалізовані з нижнього боку листка: гіпостоматичний вигляд.

У мікропрепаратах листкової пластинки діагностуються включення оксалату кальцію. Уздовж жилок детектуються призматичні кристали; в мезофілі листка локалізуються гострокінцеві друзи [20, 28].

Крім того, виявляються похідні епідермальних клітин, представлені кількома типами незалізистих волосків і залозистих трихом. Незалізисті - одноклітинні волосинки, а також пучкові волосинки з двома-вісьмома відгалуженнями, розташовані вздовж жилок листкової пластинки [20, 28].



Рисунок 3.11 - Епідерміс листової пластини листка горіха чорного: А - проста волосинка (x 400); Б - пучкова волосинка з двома відгалуженнями (x 400); В - пучкова волосинка з вісьмома відгалуженнями (x 400).

Виявлено залозисті трихоми з чотирьохклітинною голівкою і двоклітинною ніжною; також детектуються волоски з чотирьохклітинною голівкою і шестиклітинною ніжною. Під час забарвлення Суданом III залозисті трихоми забарвлюються в помаранчевий колір [20, 28].

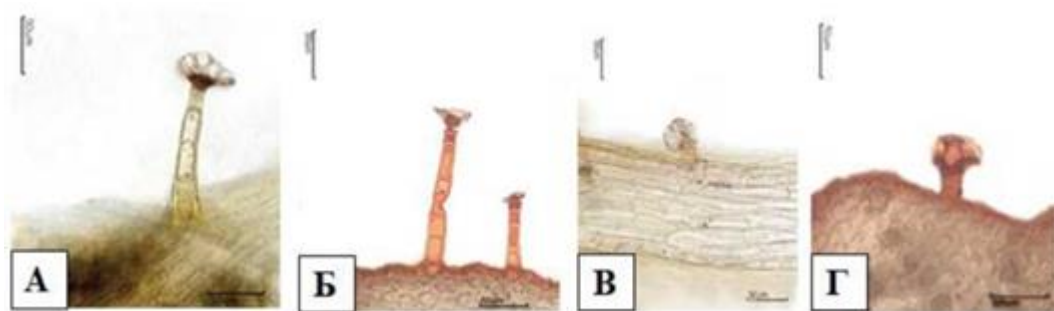


Рисунок 3.12 - Епідерміс листової пластини листка горіха чорного: А - залозисті трихоми з чотириклітинною голівкою та шестиклітинною ніжкою (x 400); Б - забарвлення розчином Судана III (x 400); В - залозисті трихоми з чотириклітинною голівкою та двоклітинною ніжкою (x 400); Г - забарвлення розчином Судана III (x 400).

Крім того, виявлено додаткові діагностичні ознаки під час мікроскопічного аналізу поперечних зрізів листової пластини листка горіха чорного. Головна жилка на поперечному зрізі листової пластинки листка загалом округла за формою, але сплюснена з адаксіального боку. У жилці локалізуються 3 пучки провідних тканин: один основний - у формі півмісяця, що розташовується з абаксіального боку, а також 2 інших з адаксіального боку. Центральна жилка листової пластинки армована механічними тканинами. На поперечному перерізі в медіальній та апікальній частинах листової пластинки під епідермісом добре виражена колленхіма кутникового типу. При цьому в структурі пучків склеренхімна частина виражена дуже слабо або не виражена зовсім. Водночас у базальній частині листової пластинки склерифікація виражена значно. Склеренхіма оточує провідні пучки центральної жилки. Крім того, відзначається значний вміст великих округлих друз у ділянці колленхіми в базальній частині поперечного зрізу листової пластинки.

Анатомічно листові пластинки листка дорзовентрального типу будови, при цьому відзначено значну вираженість складчастої паренхіми.

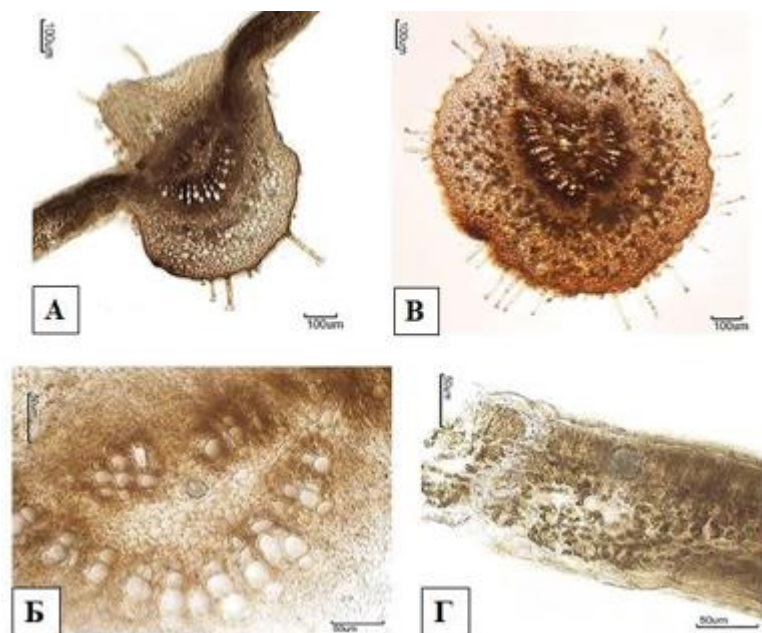


Рисунок 3.13 - Анатомічна будова листкової пластини листка горіха чорного - поперечний зріз: А - центральна жилка листкової пластини (x 100); Б - провідна система центральної жилки (x 400); В - фрагмент поперечного перерізу черешка (x 100); Г - фрагмент бічної жилки.

З використанням люмінесцентної мікроскопії проводили аналіз локалізації біологічно активних сполук, що містяться в РС листя горіха чорного [12]. Для дослідження використовували стандартні зразки юглону, мірицитрину, кверцитрину. Особливості їхньої люмінесценції виявлено в попередньому розділі.

У процесі вивчення препарату верхнього епідермісу листової пластинки листка горіха чорного діагностується люмінесценція кутикули рожевого світла під час опромінення УФ-світлом у 360 нм. Даний колір люмінесценції зумовлений наявністю каротиноїдних структур кутина. Крім того, люмінесценцією червоно-рожевого відтінку за $\lambda=360$ нм володіють хлорофіл і каротиноїди.

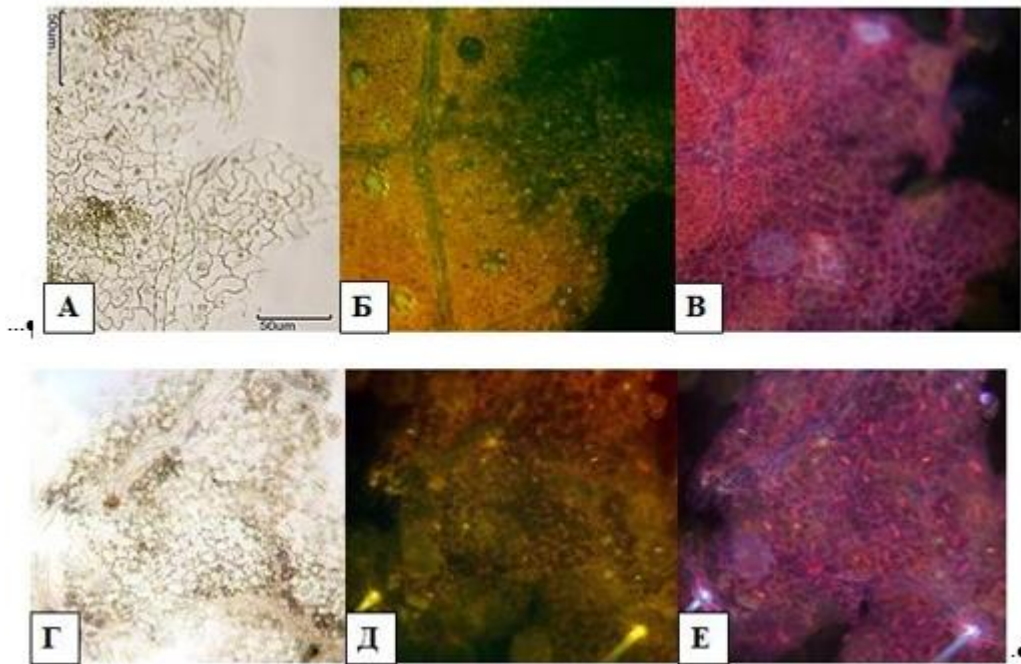


Рисунок 3.14 - Епідерміс листової пластини листка горіха чорного: А - епідерміс верхнього боку листка (x400); Б - за опромінення УФ-світлом з довжиною хвилі 420 нм; В - за опромінення УФ-світлом з довжиною хвилі 360 нм; Г - епідерміс нижнього боку листка (x400); Б - за опромінення УФ-світлом з довжиною хвилі 420 нм; В - за опромінення УФ-світлом з довжиною хвилі 360 нм.

Під час опромінення УФ-світлом за $\lambda=360$ нм препарату нижньої епідермальної тканини листової пластини *Juglans nigra* L. виявляється блакитна люмінесценція структур протопласта. Крім того, в УФ-світлі за $\lambda=360$ нм рожева люмінесценція діагностується в клітинних стінках клітин, що замикають продиховий апарат. Також у мезофілі нижнього боку листової пластини листка локалізуються залозисті трихоми. При опроміненні УФ-світлом з $\lambda=360$ нм і $\lambda=420$ нм відзначається світло-блакитне і яскраво-жовте світіння відповідно.

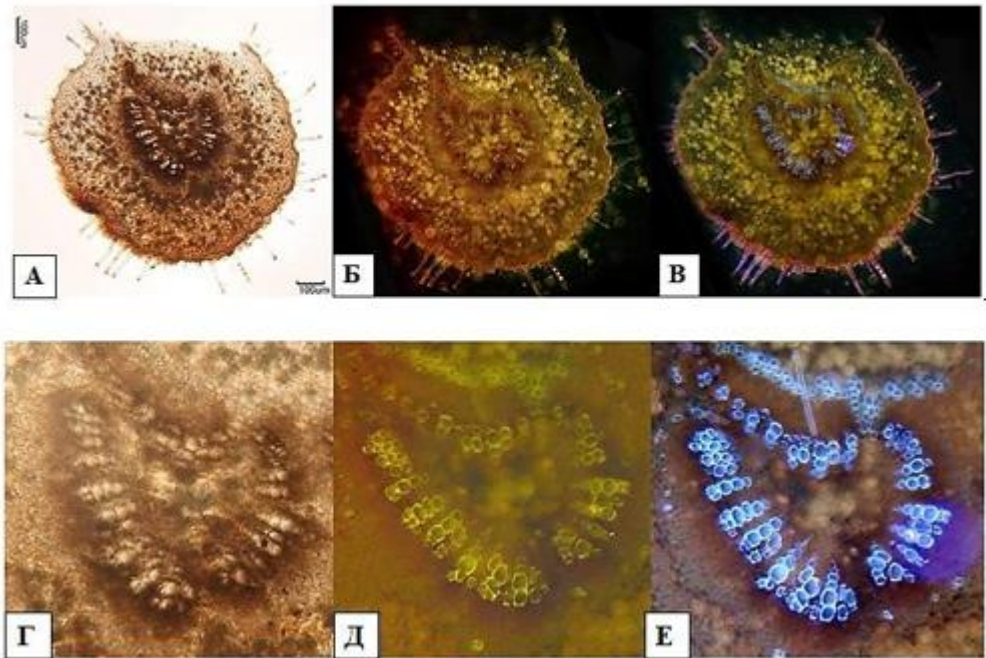


Рисунок 3.15 - Поперечний переріз черешка листової пластини листка горіха чорного: А - денне світло (x 100); Б - за опромінення УФ-світлом з довжиною хвилі 420 нм; В - за опромінення УФ-світлом з довжиною хвилі 360 нм; Г - центральна жилка черешка (x 400); Д - за опромінення УФ-світлом з довжиною хвилі 420 нм; Е - за опромінення УФ-світлом з довжиною хвилі 360 нм.

При розгляді поперечних зрізів листової пластини і черешків (x 100) в УФ-світлі за $\lambda=360$ нм і $\lambda=420$ нм діагностуються оболонки клітин ксилеми і склеренхіми, які зазнали лігніфікації, та які люмінесціюють світло-блакитним і світло-жовтим кольором відповідно завдяки наявності лігнінових структур.

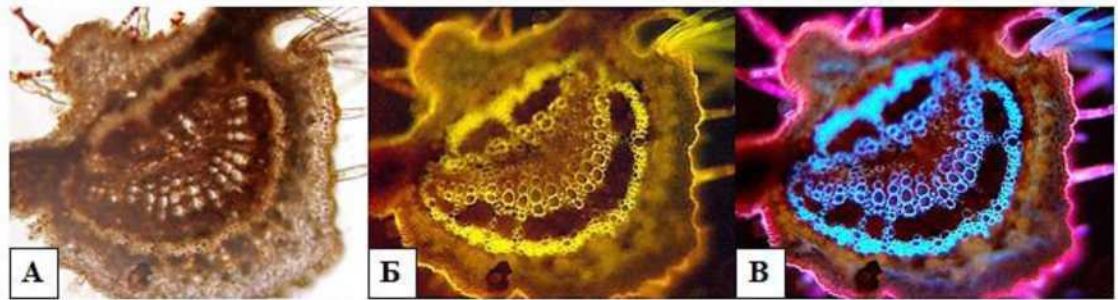


Рисунок 3.16 - Центральна жилка листової пластинки. Позначення: А - денне світло; Б - за опромінення УФ-світлом із довжиною хвилі 420 нм; В - за опромінення УФ-світлом із довжиною хвилі 360 нм.

При дослідженні люмінесценції провідних пучків центральної жилки живця черешка і листової пластинки УФ-світлом за 360 нм у ділянці флоемних тканин детектується оранжево-червона люмінесценція. Природа люмінесценції схожа з раніше виявленим світінням кверцитрину. Крім того, в основній паренхімі центральної жилки черешка і листової пластинки локалізуються кристалічні включення темного кольору. При опроміненні УФ-світлом з довжиною хвилі 360 нм і 420 нм виявляється характерне жовте і помаранчеве світіння кристалічних включень. Особливості люмінесценції вказують на локалізацію в цій тканині мірицитрину.

Висновки до розділу 3

1. Морфолого-анатомічне дослідження кори та листя горіха чорного дало змогу підтвердити наявні літературні дані щодо основних діагностичних ознак, характерних для зазначених видів рослинної сировини: особливості позашкірного вигляду, розташування тканин і локалізації включень.

2. Проведено анатоמו-гістологічне вивчення черешків і листової пластинки листя горіха чорного на поперечних перерізах. До діагностичних особливостей листків горіха чорного можна віднести: обриси центральної жилки

округлої форми, сплющеної з адаксіального боку з 3 пучками провідних тканин: одного основного - у формі півмісяця, а також 2 інших з адаксіального боку. Центральна жилка достатньо армована: склеренхіма оточує провідні пучки центральної жилки, відмічається значний вміст крупних округлих друз у базальній частині листкової пластинки.

3. Дослідження методом люмінесцентної мікроскопії тканин кори горіха чорного виявило, що найбільша концентрація фенольних сполук (юглон, мірицитрин) зосереджена в тканинах основної паренхіми м'якого лубу. Проведений аналіз тканин листя горіха чорного з використанням люмінесцентної мікроскопії дозволив установити локалізацію діагностично значущих сполук: кверцитрин виявляється переважно в ділянці флоемних тканин, а в клітинах основної паренхіми локалізуються кристалічні включення мірицитрину.

ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

1. Порівняльне фітохімічне дослідження рослинної сировини видів роду Горіх (*Juglans* L.) дало змогу виявити присутність у корі та листках горіха чорного, листках горіха волоського та горіха сірого хімічних сполук флавоноїдної природи, що становить інтерес у плані подальшого вивчення сировинної бази роду. Для подальшого дослідження хімічного складу було обрано кору та листя *Juglans nigra* L., як найбільш перспективні джерела біологічно активних сполук флавоноїдної природи.

2. Обґрунтовано доцільність визначення мірицитрину та кверцитрину методом тонкошарової хроматографії для кори та листя *Juglans nigra* L. з використанням як речовин-свідків стандартних зразків мірицитрину (кора та листя), кверцитрину (листя).

3. Проведено оцінку кількісного вмісту флавоноїдів у перерахунку на мірицитрин для рослинної сировини кори та листя *Juglans nigra* L. за умов диференціальної спектрофотометрії за 416 ± 2 нм. Вміст суми флавоноїдів у перерахунку на мірицитрин у корі та листі *Juglans nigra* L. варіює в межах від 2,94 % до 3,17 %, і від 3,02 % до 3,28 % відповідно. Величина числового показника вмісту флавоноїдів у перерахунку на мірицитрин у корі *Juglans nigra* L. - не менше 2,5 %. Величина числового показника вмісту флавоноїдів у перерахунку на мірицитрин у листі *Juglans nigra* L. - не менше 3,0%.

4. Виявлено основні ознаки локалізації домінуючих і діагностично значущих сполук у корі та листі горіха чорного. З використанням методу люмінесцентної мікроскопії виявлено, що найбільша концентрація фенольних сполук (юглон, мірицитрин) міститься в тканинах основної паренхіми м'якого лубу. З використанням методу люмінесцентної мікроскопії виявлено, що кверцитрин виявляється в основному в ділянці флоємних тканин, а в клітинах основної паренхіми локалізуються кристалічні включення мірицитрину.

ДОДАТКИ

Додаток А



МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК ВИЩОЇ ОСВІТИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА ФАРМАКОГНОЗІЇ ТА НУТРИЦІОЛОГІЇ

СЕРТИФІКАТ

№ 45

Цим засвідчується, що

Дудкіна Л. М.

брав(ла) участь у роботі VI Міжнародної
науково-практичної Інтернет-конференції

**"СУЧАСНІ ДОСЯГНЕННЯ ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ НАУКИ
В СТВОРЕННІ ТА СТАНДАРТИЗАЦІЇ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ
І ДІЄТИЧНИХ ДОБАВОК, ЩО МІСТЯТЬ КОМПОНЕНТИ
ПРИРОДНОГО ПОХОДЖЕННЯ"**

(тривалість - 6 годин)
12 квітня 2024 р., м. Харків, Україна

В.о. ректора НФаУ
д. фарм. н., проф.

Проректор з науково-педагогічної
роботи НФаУ, д. фарм. н., проф.

Завідувач кафедри фармакогнозії
та нутриціології НФаУ, д. фарм. н., проф.



Алла КОТВИЦЬКА

Інна ВЛАДИМИРОВА

Вікторія КИСЛИЧЕНКО